

بررسی تاثیر ترکیب محیط کشت، pH و دما بر سرعت رشد و وزن میسلیوم قارچ "شی تاکه" در شرایط جامد و مایع

لیلا رازقی یدک^۱ - مجید عزیزی^{۲*} - محمد فارسی^۳ - شادی شاه طهماسبی^۴

تاریخ دریافت: ۸۷/۱/۲۴

تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۵

چکیده

قارچ شی تاکه (*Lentinus edodes*(Berk) Singer/Pegler) از لحاظ تولید مرتبه دوم را در میان قارچ‌های خوراکی مهم دنیا به خود اختصاص داده است. این قارچ به خاطر طعم و مزه بی نظیر و همچنین خواص دارویی مدتهای مدیدی است که مورد توجه ویژه قرار گرفته است. این تحقیق به منظور بهینه‌سازی شرایط محیطی برای تولید قارچ "شی تاکه" اجرا شد. در ابتدا اثر نوع محیط کشت (در چهار سطح)، pH (در سه سطح)، دما (در دو سطح) و تاثیر متقابل آنها بر رشد شعاعی میسلیوم در محیط کشت جامد بررسی شد. سپس تاثیر نوع محیط کشت و pH بر وزن میسلیوم در محیط کشت مایع و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد ارزیابی قرار گرفت. نوع طرح آماری در هر دو آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با ۴ تکرار بود. نتایج حاصله نشان داد که در محیط جامد اثر نوع محیط کشت، pH و دما بر سرعت رشد میسلیوم در سطح ۱ درصد معنی‌دار است. اثر متقابل بین محیط کشت و pH، دما و محیط کشت و pH و دما نیز در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. مقایسه سرعت رشد میسلیوم در محیط‌های کشت جامد نشان داد که بیشترین سرعت رشد (۸/۵۴ میلی‌متر در روز) در محیط‌های دست‌ساز ۱ و ۲ بدست آمد و کمترین سرعت رشد (۶/۲۰ میلی‌متر در روز) در محیط دست‌ساز ۳ مشاهده شد. افزایش دما از ۲۵ به ۲۷ درجه سانتی‌گراد منجر به کاهش معنی‌داری در سرعت رشد گردید. افزایش pH از ۴/۵ به ۶/۵ نیز منجر به کاهش رشد گردید و بیشترین سرعت رشد در pH=۴/۵ مشاهده شد. در محیط کشت مایع نیز تاثیر نوع محیط کشت و pH در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود. بیشترین وزن میسلیوم در محیط مایع متعلق به محیط‌های دست‌ساز بود و برعکس محیط کشت جامد، بهترین عملکرد میسلیوم در pH=۵/۵ بدست آمد.

واژه های کلیدی: شی تاکه، سرعت رشد میسلیوم، رشد رشته‌ای، وزن میسلیوم

مقدمه

این قارچ نه تنها یک غذای خوش طعم با بوی مطبوع است بلکه محتوی موادی است که دارای اثرات دارویی می‌باشند. خواص درمانی این قارچ شامل تقویت سیستم ایمنی بدن در مقابل امراض، کاهش میزان کلسترول خون و اثرات ضد ویروسی (مانند ویروس ایدز) و ضد سرطانی است. لتینان^۶ پلی ساکارید جدا شده از این قارچ یک ترکیب گوگردی دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی می‌باشد (۷).

میسلیوم این قارچ در ابتدا سفید رنگ بوده و سپس طویل شده و با تولید ریشه‌های هوایی، کلنی پنبه‌ای شکل ایجاد می‌کند و با گذشت زمان میسلیوم به رنگ قهوه‌ای شکلاتی در می‌آید (۲). فاکتورهای محیطی مهم موثر بر رشد میسلیوم قارچ "شی تاکه" شامل مواد غذایی (منابع کربن و نیتروژن)، pH محیط کشت و دمای

قارچ "شی تاکه" (*Lentinus edodes*(Berk) Singer/Pegler) از نظر تولید مرتبه دوم را در میان قارچ‌های خوراکی مهم دنیا به خود اختصاص داده است (پایگاه اطلاع رسانی انجمن بین المللی دانش قارچ‌های خوراکی)^۵. این قارچ به نام های قارچ سیاه جنگلی یا نام چینی Shiang-gu نیز شهرت دارد و رایج‌ترین قارچ کشت شده در چین، ژاپن و سایر کشورهای آسیایی است (۱۳ و ۱۴).

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲- دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*) نویسنده مسئول: (Email: Azizi@um.ac.ir)
۳- استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- عضو گروه زیست فناوری قارچ های صنعتی جهاد دانشگاهی واحد مشهد

از شرکت آمریکایی Mycomedia تهیه گردید.

محیط کشت جامد

برای مقایسه محیط کشت‌های MEA^۱، PDA^۲ و CEA^۳ یک آزمایش مقدماتی طراحی و اجرا شد و نتایج بدست آمده نشان داد که در بین این محیط کشت‌ها، محیط کشت MEA از نظر سرعت رشد (۸۱/۶ میلی‌متر در روز) و تراکم رشد نسبت به محیط‌های کشت دیگر برتری دارد. بنابراین محیط MEA به عنوان محیط پایه برای بررسی بیشتر مورد استفاده قرار گرفت و تیمارها شامل ترکیبات محیط کشت‌های مختلف (بر اساس وزن خشک) عصاره‌هایی از مواد زیر بود: (۱) خاک اره ۱۰۰ گرم، ملاس چغندر قند ۴۰ گرم، سبوس گندم ۲۰ گرم، سبوس برنج ۲۰ گرم، کربنات کلسیم ۴ گرم؛ (۲) خاک اره ۱۰۰ گرم، سبوس گندم ۲۰ گرم، سبوس برنج ۲۰ گرم، کربنات کلسیم ۴ گرم؛ (۳) خاک اره ۱۰۰ گرم.

مواد فوق در یک لیتر آب به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده و سپس عصاره حاصل توسط پارچه‌ی ملامل صاف گردید و سپس به هر کدام از عصاره‌های (۱) و (۲)، ۱۰ گرم دکستروز و ۲۰ گرم آگار اضافه شد. عصاره (۳) به محیط کشت تجاری MEA اضافه گردید و محیط کشت MEA تجاری (۴) نیز برای مقایسه مورد استفاده قرار گرفت. سپس pH هر کدام از محیط کشت‌ها در سه pH متفاوت ۴/۵، ۵/۵ و ۶/۵ تنظیم گردید. بعد از جامد شدن محیط‌های کشت، در زیر هود لامینار تمام پتری دیش‌ها با استفاده از پرگنه‌هایی با قطر مساوی ۵ میلی‌متر تلقیح شدند و سپس ظروف به دو گروه تقسیم شدند، یک گروه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و گروه دوم در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در دو اتاقک رشد متفاوت قرار داده شدند. سپس به منظور اندازه‌گیری رشد شعاعی میسلیوم‌ها، بطور روزانه دو قطر عمود بر هم پرگنه روی پتری دیش با کولیس ورنیه اندازه‌گیری گردید.

محیط کشت مایع

در آزمایش دوم برای ارزیابی بیومس و تراکم میسلیوم قارچ مورد نظر از محیط کشت مایع استفاده شد، بدین منظور مراحل قبل (بدون آگار) دقیقاً تکرار شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از هر محیط کشت در ویال‌هایی با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر توزیع گردید. پس از آن در زیر هود استریل پرگنه‌هایی با قطر مساوی ۵ میلی‌متر و با حداقل آگار به داخل ویال‌ها مایه کوبی و به مدت ۱۸ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاقک رشد آنکوبه گردید. پس از گذشت ۱۸ روز محتویات ویال خارج شده و به دقت میسلیوم‌ها از محیط کشت جدا گردید. سپس با قرار

مناسب می‌باشند. غلظت اکسیژن و pH محیط کشت نیز فرآیندهای متابولیکی و در نتیجه توانایی آنها را برای استفاده از مواد غذایی بعنوان کربن، نیتروژن، ویتامین و مواد معدنی را تحت تاثیر قرار میدهد (۴).

رشد رشته‌ای قارچ‌ها بوسیله اندازه‌گیری رشد شعاعی هیف‌های آنها با گذشت زمان روی محیط کشت‌های جامد تخمین زده می‌شود. سرعت رشد میسلیوم تحت شرایط متفاوت محیطی، متفاوت است (۴). بنابراین بررسی شرایط رشد مناسب برای رشد رشته‌ای قارچ از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۳). طیف گسترده‌ای از محیط کشت‌ها برای قارچ‌ها استفاده می‌شوند. اغلب متخصصین اولویت را برای انتخاب محیط کشت بر اساس تجربه و ویژگی‌های گونه قارچ قرار می‌دهند (۱۲). در شرایط آزمایشی، محیط‌های کشت جامد (آگار) مناسب می‌باشد، چون در حالت وحشی قارچ‌ها معمولاً از مواد جامد مثل چوب، پس مانده‌های بافت‌های گیاهی و حیوانی یا خاک استفاده می‌کنند (۵).

در تحقیقی مونتینی و همکاران اثر متقابل بین نژادهای *L.edodes* و محیط کشت‌های مختلف را با استفاده از بررسی چشمی دیجیتال به وسیله مشخص کردن حرکت و قدرت رشد میسلیوم در شرایط دقیق بررسی نمودند و دریافتند که سرعت رشد میسلیوم نژادهای "شی‌تاکه" در محیط کشت‌های غنی شده کمتر در حالی که قدرت رشد آنها در این محیط بیشتر بود (۱۰).

پروسر بهترین رشد میسلیوم‌ها (با اندازه‌گیری قطر شعاعی میسلیوم *L.edodes* روی محیط کشت‌های جامد) را در pH اندکی کمتر از ۵ گزارش نمود (۱۱).

پیرنیا در بررسی تاثیر دما و pH بر رشد میسلیوم قارچ دکمه‌ای، مناسب‌ترین pH را برای رشد میسلیوم این قارچ محدوده‌ی ۶/۵-۵/۵ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد را مناسب‌ترین دما برای رشد میسلیوم در محیط کشت عصاره مالت آگار اعلام کرد (۱). بررسی منابع موجود نشان می‌دهد که در ایران به غیر از تجارب فردی، تاکنون اقدامی در جهت پرورش و تولید تجاری این قارچ و گزارش علمی از نتایج بدست آمده منتشر نشده است.

در این بررسی به منظور تعیین شرایط محیطی بهینه‌ی رشد میسلیوم قارچ شی‌تاکه، در مرحله‌ی اول اثر محیط کشت، pH و دما و تاثیر متقابل آنها با اندازه‌گیری رشد شعاعی میسلیوم قارچ روی محیط کشت جامد بررسی شد و در مرحله‌ی دوم تاثیر محیط کشت و pH بر عملکرد میسلیوم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت مایع بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

کلید آزمایش‌ها در آزمایشگاه گروه زیست فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی مشهد انجام گرفت. نژاد قارچ CS-2 بود که

1 - Malt Extract Agar
2- Potato Dextrose Agar
3- Compost Extract Agar

می‌شود، لذا در آزمایش اول تاثیر محیط کشت، pH و دماهای مختلف بر رشد میسلیم‌های قارچ‌های مختلف در حالت جامد بررسی شد. نتایج آنالیز واریانس (جدول ۱) و بررسی تاثیر نوع محیط کشت بر سرعت رشد شعاعی میسلیم قارچ‌های مختلف نشان داد که نوع محیط کشت تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بر سرعت رشد شعاعی میسلیم دارد. مقایسه میانگین سرعت رشد شعاعی میسلیم در شکل ۱ آمده است. همانطور که مشخص است بیشترین سرعت رشد ۸/۵۴ میلی‌متر بر روز در محیط کشت ۱ (M1) و کمترین سرعت رشد در محیط کشت دست‌ساز ۳ (M3) با ۶/۲۰ میلی‌متر بر روز مشاهده شد و بین محیط کشت ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

دادن میسلیم‌ها بر روی کاغذ صافی نسبت به حذف رطوبت باقیمانده اقدام شد. در نهایت وزن میسلیم‌های تولید شده با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۰۱ تعیین گردید. هر دو آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. نتایج حاصله پس از ارزیابی و مقایسه آماری با نرم افزار MSTAT-C مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

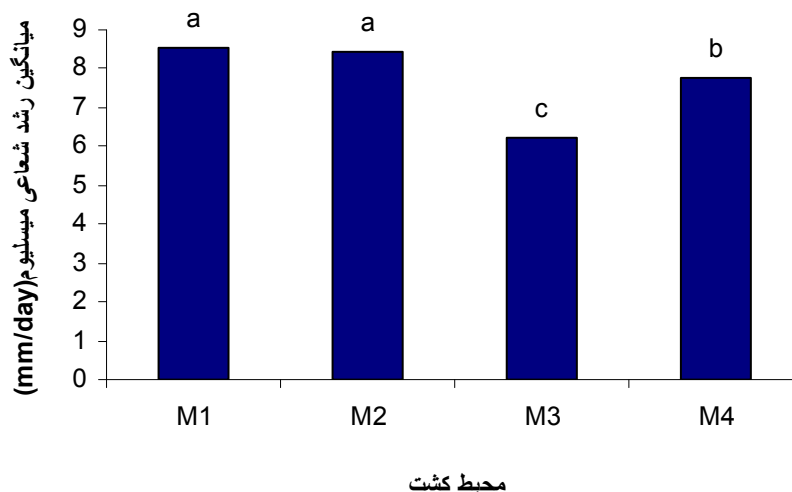
تاثیر نوع محیط کشت بر رشد شعاعی میسلیم
از آنجایی که تاثیر عوامل محیطی بیشتر در محیط جامد بررسی

جدول (۱) - تجزیه واریانس برای رشد شعاعی میسلیم قارچ‌های مختلف در محیط کشت جامد

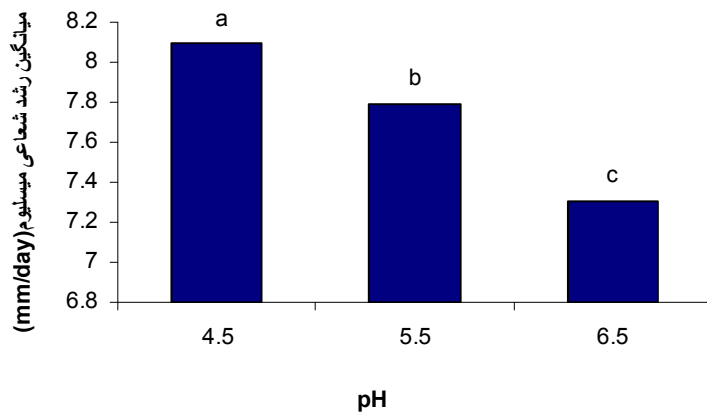
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۳	۲۷/۹۱۶**
pH	۲	۵/۱۲۳**
دما	۱	۷/۰۶۳**
محیط کشت × pH	۶	۱/۸۳۰**
محیط کشت × دما	۳	۰/۹۴۳**
pH × دما	۲	۰/۴۵۰**
pH × محیط کشت × دما	۶	۰/۱۰۶ ^{ns}
خطا	۷۲	۰/۰۸۶
ضریب تغییرات (%)		۳/۷۹

** معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۱

^{ns} بی معنی در سطح احتمال ۰/۰۱ و ۰/۰۵



شکل (۱) - تاثیر محیط کشت‌های مختلف بر رشد شعاعی میسلیم قارچ‌های مختلف (M1: محیط کشت دست‌ساز ۱ محتوی عصاره خاک اره + ملاس چغندر قند + سیوس گندم + سیوس برنج + کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست‌ساز ۲ محتوی خاک اره + سیوس گندم + سیوس برنج + کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره + محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA). حروف مشابه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.



شکل (۲) - تاثیر pH های مختلف بر رشد شعاعی میسلیم قارچ شی تا که در محیط کشت جامد

مشاهده شد. با افزایش دما از ۲۵ به ۲۷ درجه سانتی گراد سرعت رشد میسلیم کاهش می یابد.

تریشو (۱۵) اپتیمم دما را برای رشد میسلیم قارچ دکمه‌ای در محیط این ویترو 24 ± 1 درجه سانتی گراد اعلام کرد. پیرنیا (۱) دمای ۲۵ درجه سانتی گراد را برای رشد میسلیم قارچ دکمه‌ای بهینه اعلام کرد. هاس گاوا و همکاران (۶) با بررسی تاثیر دما بر رشد قارچ شی تا که به این نتیجه رسیدند که دماهای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی گراد رشد میسلیم را در محیط کشت مایع افزایش می دهند.

درجه حرارت منجر به افزایش سرعت فعالیت‌های متابولیکی می گردد. علاوه بر این سنتز ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه یا دیگر متابولیت‌ها نیز متأثر از درجه حرارت می باشد. به نظر می رسد که کاهش رشد قارچ‌ها در دماهای بالا مستقیماً مربوط به عدم توانایی آنها در سنتز یک چنین مواد ضروری باشد.

اثر متقابل pH و دما بر سرعت رشد شعاعی میسلیم

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که اثر متقابل دما و pH بر سرعت رشد شعاعی میسلیم قارچ شی تا که در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است. مقایسه میانگین سرعت رشد شعاعی میسلیم حاصل از تیمارهای متقابل دما و pH در شکل ۳ آمده است. همانطور که مشخص است بیشترین رشد شعاعی در $pH = 4/5$ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، $8/43$ میلی متر بر روز بوده که این نتیجه با نتیجه پروسر (۱۱) که بهترین رشد میسلیم را در pH کمتر از ۵ اعلام کرده بود، مطابقت دارد. کمترین سرعت رشد شعاعی میسلیم در $pH = 6/5$ و دمای ۲۷ درجه سانتی گراد ($6/96$) بود. با افزایش pH از $4/5$ به $6/5$ شاهد کاهش سرعت رشد در هر دو دما هستیم. در $pH = 5/5$ بین دماهای مختلف از این نظر اختلاف معنی داری وجود نداشت در حالیکه در pH های $4/5$ و $6/5$ این اختلاف در دماهای مختلف معنی دار بود و در هر pH سرعت رشد شعاعی میسلیم در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد کمتر از دمای ۲۵ درجه سانتی گراد است.

تاثیر pH بر رشد شعاعی میسلیم

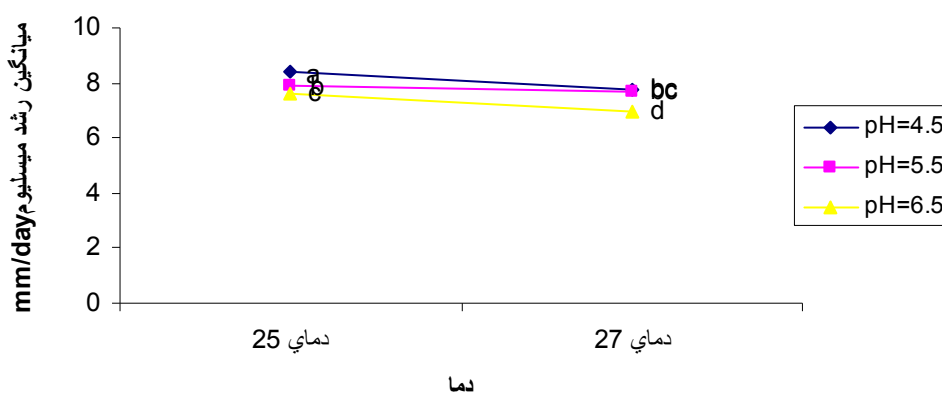
نتایج آنالیز واریانس تاثیر pH محیط کشت بر سرعت رشد شعاعی میسلیم قارچ شی تا که نشان می دهد که pH محیط کشت تاثیر معنی داری در سطح احتمال ۱٪ بر سرعت رشد شعاعی میسلیم دارد.

مقایسه میانگین سرعت رشد شعاعی میسلیم در شکل ۲ آمده است با افزایش pH از $4/5$ به $6/5$ سرعت رشد شعاعی میسلیم کاهش معنی داری می یابد، به طوری که بیشترین سرعت رشد شعاعی برابر با $8/09$ میلی متر بر روز در $pH = 4/5$ و کمترین سرعت رشد شعاعی در $pH = 6/5$ با $7/30$ میلی متر بر روز اتفاق افتاد. تریشو (۱۵) اپتیمم pH را برای رشد میسلیم قارچ دکمه‌ای $6/8$ ذکر نمود در حالیکه $pH = 6$ نیز به عنوان بهترین pH برای رشد میسلیم قارچ خوراکی گزارش شده است (۲)، پیرنیا (۱) بهترین pH را برای رشد میسلیم قارچ دکمه‌ای در محیط کشت جامد $6/5$ بدست آورد.

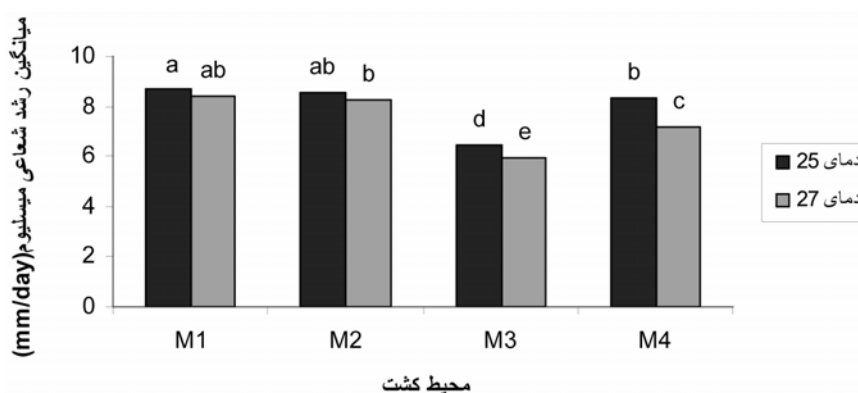
اثر pH بر رشد قارچ‌ها نتیجه‌ی مجموعه اثراتی است که pH بر عوامل متعدد کنترل رشد اعمال می کند. بطوریکه رشد در pH پایین ممکن است در نتیجه‌ی افزایش دسترسی قارچ‌ها به یونهای مثل آهن باشد در حالیکه رشد در pH بالا ممکن است مربوط به افزایش فعالیت‌های آنزیمی باشد. غلظت اکسیژن و pH محیط کشت از طریق تاثیر بر فرآیندهای متابولیکی قارچ‌ها و در نتیجه توانایی آنها برای استفاده از مواد غذایی به عنوان کربن، نیتروژن، ویتامین و مواد معدنی رشد را تحت تاثیر قرار می دهند (۸ و ۶).

تاثیر دما بر سرعت رشد شعاعی میسلیم

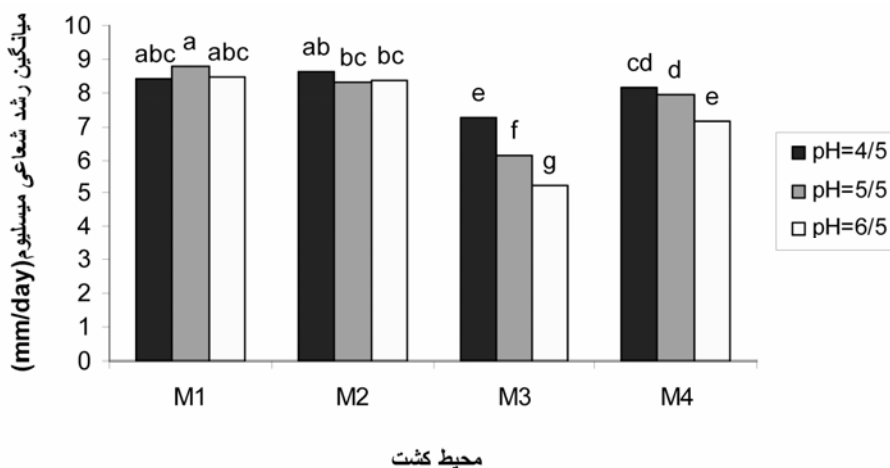
نتایج آنالیز واریانس تاثیر دما بر سرعت رشد شعاعی میسلیم قارچ شی تا که نشان می دهد که دما تاثیر معنی داری در سطح احتمال ۱٪ بر سرعت رشد شعاعی میسلیم داشته است. بیشترین سرعت رشد شعاعی $8/00$ میلی متر بر روز در ۲۵ درجه سانتی گراد و کمترین سرعت رشد در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد با $7/45$ میلی متر بر روز



شکل (۳) - اثر متقابل pH و دما بر سرعت رشد شعاعی میسلوم قارچ شی تا که در محیط کشت جامد (حروف مشابه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی دار ندارند).



شکل (۴) - اثر متقابل محیط کشت و دما بر رشد شعاعی میسلوم قارچ شی تا که در محیط کشت جامد (M1: محیط کشت دست ساز ۱ محتوی عصاره خاک اره + ملاس چغندر قند + سیبوس گندم + سیبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست ساز ۲ محتوی خاک اره + سیبوس گندم + سیبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره + محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA). حروف مشابه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی دار ندارند.



شکل (۵) - اثر متقابل pH و محیط کشت بر رشد شعاعی میسلوم قارچ شی تا که در محیط کشت جامد (M1: محیط کشت دست ساز ۱ محتوی عصاره خاک اره + ملاس چغندر قند + سیبوس گندم + سیبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست ساز ۲ محتوی خاک اره + سیبوس گندم + سیبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره + محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA). حروف مشابه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

همانطور که مشخص است تاثیر pH های مختلف در محیط کشت های دست ساز ۱ و ۲ معنی دار نیست. همچنین سرعت رشد شعاعی میسلیم در هر دو محیط کشت مزبور در pH های مختلف بیشتر از دو محیط کشت دیگر (محیط کشت های ۳ و ۴) است. از آنجایی که در محیط کشت جامد اندازه گیری قطر کلنی تنها در دو قطر علامت گذاری شده بر روی پتری دیش انجام می شود و میزان تراکم مورد توجه نیست و اینکه وزن میسلیم معیار دقیق تری برای ارزیابی رشد است لذا نتایج در محیط کشت مایع هم بررسی شد. نتایج تجزیه واریانس تاثیر محیط کشت مایع و pH در جدول ۲ آمده است. نتایج نشان می دهند که اثر نوع محیط کشت، pH های مختلف و اثر متقابل آنها در سطح احتمال ۵ درصد معنی دار است.

تاثیر نوع محیط کشت بر وزن میسلیم در محیط کشت مایع

بیشترین وزن میسلیم ۱۱/۳۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر در محیط کشت ۳ و کمترین وزن در محیط کشت ۲ برابر با ۴/۰۵۳ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد (شکل ۶) و بین محیط کشت ۱ و ۳ اختلاف معنی داری وجود نداشت. بنابراین بهترین محیط کشت برای تراکم میسلیم، محیط کشت ۳ توصیه می گردد.

اثر متقابل محیط کشت و دما بر سرعت رشد شعاعی میسلیم

اثر متقابل دما و محیط کشت بر سرعت رشد شعاعی میسلیم قارچ شی تا که که در سطح احتمال ۱٪ معنی دار بود. بیشترین سرعت رشد شعاعی در محیط کشت ۱ و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ۸/۶۶ میلی متر بر روز بود و کمترین سرعت رشد شعاعی میسلیم در محیط کشت ۳ و دمای ۲۷ درجه سانتی گراد (۵/۹۵) مشاهده شد (شکل ۴). در محیط کشت تجاری MEA (محیط کشت M4) و محیط کشت تجاری غنی شده با عصاره خاکاره (محیط کشت M3) اختلاف بین دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و ۲۷ درجه سانتی گراد معنی دار بود ولی در محیط کشت های دست ساز ۱ و ۲ این اختلاف معنی دار نبود، اگرچه سرعت رشد در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد کمتر از ۲۵ درجه سانتی گراد بود.

اثر متقابل محیط کشت و pH بر سرعت رشد شعاعی میسلیم

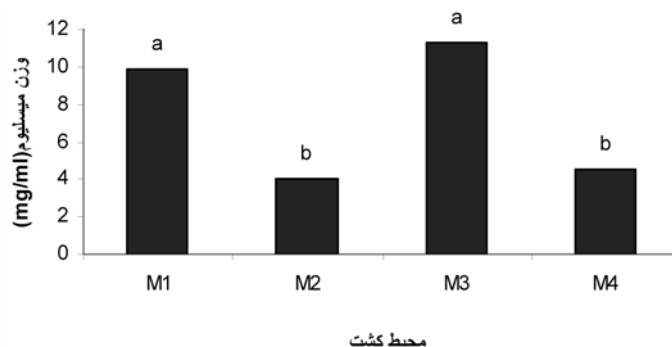
اثر متقابل pH و محیط کشت بر سرعت رشد شعاعی میسلیم قارچ شی تا که نشان می دهد که در سطح احتمال ۱٪ معنی دار شده است. بیشترین رشد شعاعی در محیط کشت ۱ و pH= ۵/۵ و برابر ۸/۷۶ میلی متر بر روز بود و کمترین سرعت رشد شعاعی میسلیم در محیط کشت ۳ و pH=۶/۵ برابر با ۵/۲۳ میلی متر بر روز مشاهده شد (شکل ۵).

جدول (۲) - تجزیه واریانس وزن میسلیم در آزمایش محیط کشت مایع

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۳	۰/۰۴۹*
pH	۲	۰/۰۱۰*
محیط کشت × pH	۶	۰/۰۰۱*
خطا	۲۴	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات (%)		۱۶/۰۰

نوع آزمون: چند دامنه ای دانکن

* معنی دار در سطح احتمال ۰/۰۵



شکل (۶) - اثر محیط کشت بر وزن میسلیم قارچ شی تا که در محیط کشت مایع (M1: محیط کشت دست ساز ۱ محتوی عصاره خاک اره + ملاس چغندر قند + سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست ساز ۲ محتوی خاک اره + سبوس گندم + سبوس برنج + کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره + محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA). حروف مشابه در سطح ۵ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

به طوری که در محیط کشت جامد pH بهینه ۴/۵ بود ولی در محیط کشت مایع بیشترین وزن میسلیم در pH=۵/۵ بدست آمد که دلیل این امر به نظر می رسد به علت سهولت دسترسی مواد در محیط کشت مایع نسبت به جامد باشد.

اثر متقابل محیط کشت و pH بر وزن میسلیم در محیط کشت مایع

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می دهد که اثر متقابل محیط کشت و pH بر وزن میسلیم قارچ شی تا که در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار است. مقایسه میانگین وزن میسلیم در شکل ۸ آمده است. همانطور که مشخص است بیشترین تراکم میسلیم در محیط کشت ۳ و pH=۵/۵ با ۱۳/۱۲۱ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین آن در محیط کشت ۲ و pH=۴/۵ با ۲/۲۸۱ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است به طوری که اختلاف بیشترین وزن و کمترین وزن برابر با ۱۰/۸۳۹ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است. شکل ۸ نشان می دهد که محیط کشت های ۱ و ۳ در هر سه pH، ۴/۵، ۵/۵ و ۶/۵ دارای وزن بیشتری بوده اند.

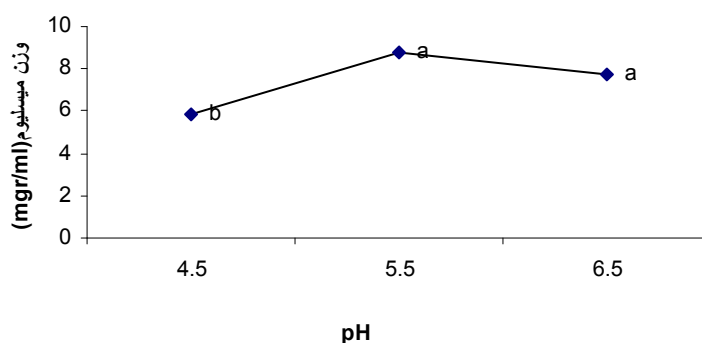
از آنجایی که سرعت رشد میسلیم در محیط جامد سریعتر می باشد، بنابراین برای تولید اسپان و میوه قارچ شی تا که محیط جامد به مایع برتری دارد.

با توجه به کلیه نتایج بدست آمده می توان اظهار نمود که جهت تولید مواد موثره دارویی از این قارچ محیط کشت مایع به جامد ارجحیت دارد و به منظور بهینه سازی تولید مواد موثره در محیط کشت مایع نیاز به اجرای تحقیقات دیگر می باشد.

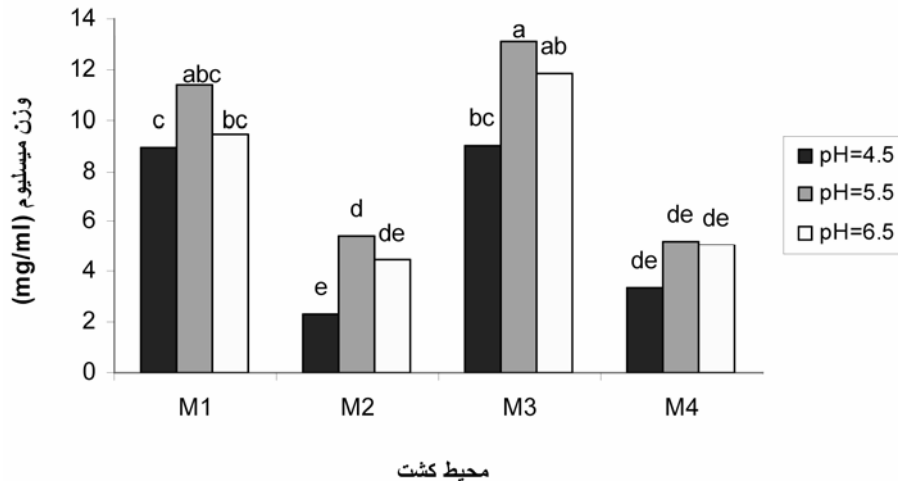
موتینی و همکاران (۱۵) اعلام کردند که سرعت رشد میسلیم شی تا که در محیط کشت های غنی شده کمتر است در حالیکه قدرت رشد در محیط های مذکور بیشتر است. آنها فاکتور محدودکننده برای رشد میسلیم شی تا که را نیتروژن عنوان کردند و دلیل کاهش سرعت رشد در محیط های غنی شده را وجود نیتروژن موجود در موادی مثل سبوس گندم و سبوس برنج دانستند در حالیکه این مواد قدرت رشد بیشتری را باعث شدند. نتایج بدست آمده در این تحقیق با یافته های بخش دوم آنها مطابقت دارد بطوریکه بیشترین سرعت و وزن میسلیم (قدرت) در محیط کشت های دست ساز ۱ و ۳ (غنی شده) به دست آمد که محیط کشت ۱ دارای عصاره سبوس گندم و برنج و محیط کشت ۳ حاوی MEA بود.

اثر pH بر تراکم (وزن) میسلیم در محیط کشت مایع

نتایج آنالیز واریانس تاثیر pH محیط کشت بر وزن میسلیم قارچ شی تا که نشان می دهد که pH محیط کشت تاثیر معنی داری در سطح احتمال ۵٪ بر وزن میسلیم داشته است. بیشترین وزن میسلیم (۸/۷۷ میلی گرم بر میلی لیتر) محیط کشت در pH=۵/۵ و کمترین وزن میسلیم (۵/۸۹ میلی گرم بر میلی لیتر) در pH=۴/۵ مشاهده شد. با افزایش pH از ۴/۵ به ۵/۵ و ۶/۵ وزن میسلیم افزایش معنی داری یافت ولی بین pH=۵/۵ و pH=۶/۵ اختلاف معنی دار نبود. اگرچه با افزایش pH از ۵/۵ به ۶/۵ عملکرد میسلیم کاهش یافت. بهترین pH برای تراکم میسلیم در محیط کشت مایع pH=۵/۵ بدست آمد. هاس گاوا و همکاران (۶) pH بهینه برای رشد میسلیم را در محیط کشت مایع ۳/۵-۳/۰ اعلام کردند. نتایج مربوط به pH در دو محیط کشت جامد و مایع متفاوت بود



شکل (۷) - اثر pH بر تراکم (وزن) میسلیم قارچ شی تا که در محیط کشت مایع (حروف یکسان دارای اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۰/۰۵ نمی باشند).



شکل (۸) - اثر متقابل محیط کشت و pH بر وزن میسلیم قارچ شی تا که در محیط کشت مایع (M1: محیط کشت دست‌ساز ۱ محتوی عصاره خاک اره+ملاس چغندر قند+سبوس گندم+سبوس برنج+کربنات کلسیم؛ M2: محیط کشت دست‌ساز ۲ محتوی خاک اره+سبوس گندم+سبوس برنج+کربنات کلسیم؛ M3: عصاره خاک اره+ محیط تجاری MEA؛ M4: محیط تجاری MEA). حروف مشابه در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

منابع

- ۱- پیرنیا ن. ۱۳۷۸. مطالعه تاثیر pH، دما و غلظت‌های مختلف هورمون 2-4-D بر رشد میسلیم قارچ خوراکی *Agaricus bisporus*، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد، ۸۵ص.
- ۲- محمدی گل تپه الف.، پورجم الف. ۱۳۸۲. اصول پرورش قارچ‌های خوراکی، دفتر نشر آثار علمی دانشگاه تربیت مدرس.
- 3- Aneja K.R. 2001. Experiment in microbiology plant pathology tissue culture and mushroom production technology, 568Pp
- 4- Chang S.T., Miles P.G. 1989. Edible mushrooms and their cultivation Boca raton Florida, P. 189-223.
- 5- Griffin D.H. 1994. Growth, In: Fungal Physiology. 2. ed. Wiley - Liss, New York, P 458.
- 6- Hasegawa R.H, kasuya M.C.M., and vanetti M.C.D. 2005.growth and antibacterial activity of *lentinula edodes* in liquid media supplemented with agricultural wastes,Electronic journal of biotechnology, vol.8 No.2
- 7- Hatvani N. 2001. Antibacterial effect of culture fluid of *Lentinula edodes* mycelium grown in submerged liquid culture, Elsevier, international journal of antimicrobial agents, 71-74.
- 8- Khan S.M., Mirza J.H., and Khan M.A. 1991. Studies on shiitake mushrooms (*Lentinula edodes* (Berk) Pegler. XIII Internationa Congress on the Science and Cultivation of Edible Fungi. Dublin. P. 503-508.
- 9- Miller M.W, Joang S.C. 1987. Commercial cultivation of shiitake in sawdust filled plastic. In:wuest,P.J; Royse,D.J; Beelman,R.B(Eds), Developments in crop science,Vol.10, cultivation edible fungi. Elzevier, Amesterdam, pp.421-426.
- 10- Montini R.M.C, Passos J.R.S., and Eira A.F. 2006. Digital Monitoring of mycelium growth kinetics and vigor of shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler on agar medium, Brazilian Journal of Microbiology, 37: 90-95.
- 11- Prosser J.I. (1994). Kinetics of filamentous growth and branching. In: Gow, A. R., GADD, G. M. The growing fungus. Chapman & Hall, London, P. 301-335.
- 12- Royse D.J. and Sanchez-Vazquez J.E. 2000. influence of substrate wood chip particle size on shiitake (*lentinela edodes*) Yield. Bioresource technology, 76:229-233.
- 13- Shiomi H.F., Minhoni M.T.A., Machado J.O. and Filho A.C. 2007. Thermal and mechanical shocks affecting the first flush of production of *Lentinula edodes* on *Eucalyptus saligna* logs, Brazilian Journal of microbiology, 38: 200-203.
- 14- Smith J.E , Rowan N.J., and sullivan R. 2002. Medicinal mushroom.
- 15- Treshow C. 1944. Nutrition of cultivated mushroom,Dansk botanisk arkiv,Vol.11,180.



Evaluation effect of media formulation, pH and temperature on " shiitake " mycelium growth analysis on solid and liquid culture conditions

L. Razeghi Yadak¹ – M. Azizi^{2*} – M. Farsi³ – Sh. Shahtahmasebi⁴

Abstract

Shiitake mushroom [*Lentinulus edodes*(Berk) Singer/Pegler] has the third production class among the most important edible mushrooms. For a long time this mushroom has draw attention due to its unique flavor and taste and also therapeutic properties. The research conducted to optimizing the environmental conditions for shiitake production. In the first experiment the effect of four medium types in solid form, three medium pH (4.5, 5.5 and 6.5) and two temperatures regimes (25 and 27 °C) were evaluated on mycelium radial growth of the mushroom. In second experiment the effect of medium types and pH was evaluated on mycelium yield in liquid form at 25 °C. The experimental design in both media was factorial on the basis of completely randomized design with 4 replications. The obtained results of the first experiment showed that medium type, pH and temperature significantly affect mycelium growth rate at $p \leq 0.01$. Interaction between medium \times pH, temperature \times medium and pH \times temperature also was significant at $p \leq 0.01$. The highest growth rate (8.548mm/day) was detected on 1 and 2 "hand making" media and the lowest one (6.201mm/day) was observed on 3 hand making media. The higher temperature (27 °C) cause the lower the mycelium growth rate. Increasing the medium pH from 4.5 to 6.5 also decreased mycelium growth rate and the highest growth rate was observed at pH=4.5. In second experiment (liquid medium), medium type and pH also affect mycelium yield significantly ($p \leq 0.05$). The highest mycelium yield was belong to hand making media and on the contrary with first experiment, the best mycelium yield was obtained on pH=5.5.

Key words: Shiitake, Mycelium growth rate, Mycelium filamentous growth, Mycelium yield

1 - Msc student of Horticulture, Ferdowsi University of Mashhad

2- Associate Prof. of Medicinal Plants Production & Processing Departement of Horticulture, College of Agriculture , Ferdowsi University of Mashhad and member of research group of Industrial Fungi Biotechnology, Jihade Daneshgahi, Mashhad
(* - Corresponding author Email: Azizi @ um.ac.ir)

3- Professor of Biotechnology in Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad,

4- Member of Research Group of Industrial Fungi Biotechnology, Jihade Daneshgahi, Mashhad