بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه شاهد

دانشکده علوم پایه

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبیولوژی

جداسازی، شناسائی و بررسی تأثیر باکتریهای محرک رشد قارچ خوراکی در تولید قارچ خوراکی دکمه ای

نگارش

فهیمه زارع‌نژاد

استادان راهنما

دکتر ایرج رسولی دکتر باقر یخچالی

تیر ۱۳۹۰

تقدیر و تشکر

هم اکنون که در سایه ی لطف و عنایت پروردگار متعال توانستم مراحل این پایان‌نامه را به اتمام برسانم، بر خود لازم می‌دانم از زحمات خالصانه‌ی اساتید گرانقدرم، جناب آقای دکتر ایرج رسولی وجناب آقای دکتر باقر یخچالی قدردانی نمایم. از سرکار خانم حورا احمدی دانش و جناب آقای حسن حبیب قمی کارشناسان آزمایشگاه پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری قدردانی می‌نمایم از سرکار خانم علیپور کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه شاهد تشکر می‌نمایم. از سرکار خانم‌ها وجیهه اسکندری و مریم شاه‌علی و آقایان فرازمند و دلدار دانشجویان دکتری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری صمیمانه تشکر می‌نمایم و از تمامی دوستانم که اینجانب را در انجام این پژوهش یاری نموده‌اند، قدردانی به عمل می‌آورم. از شرکت زیست فناوران نجم مرکز رشد زیست فناوری واقع در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک برای فراهم نمودن تجهیزات آزمایشگاهی و حمایت‌های مالی و همچنین تمامی شرکت‌های رشد و پرورش قارچ خوراکی که در فراهم نمودن نمونه ما را یاری دادند، تشکر و قدردانی می‌کنم. از جناب آقای مهندس خوش خبر و دیگر دوستان‌شان در شرکت قارچ پارس شهریار سپاسگذاری می‌نمایم و در نهایت از خانواده عزیزم به خصوص پدر و مادرم به خاطر همه محبت‌ها و خوبی‌هایشان در طی انجام این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تقدیم به

چکیده

قارچ‌های خوراکی ازجمله *آگاریکوس بیسپاروس* بخش مهمی از رژیم غذایی در بسیاری از کشورهای جهان می‌باشند. تشکیل اندام باردهی در این قارچ مستلزم تغییر فاز رویشی به زایشی است. قارچ *آگاریکوس بیسپاروس* به یک لایه خاک پوششی با ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و میکروبیولوژیکی خاصی، برای تحریک و آغاز پریموردیا نیاز دارد. تغییر فاز به طور خاص با کاهش دما و غلظت دی‌اکسیدکربن و همچنین حضور باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* انجام می‌شود. مکانیسم‌های تحریک رشد و توسعه قارچ توسط باکتری‌ها به طور دقیق شناخته نشده است. اما تصور می‌شود که *سودوموناس پوتیدا* از طریق ترشح ترکیبات شبه هورمونی، مصرف ترکیبات تولید شده توسط میسلیوم قارچ، تولید سیدروفور و حل کردن فسفات‌های آلی و معدنی مسئول این فرآیند است. قارچ دکمه‌ای سفید *آگاریکوس بیسپاروس* به عنوان محصولی که می‌تواند در تمام طول سال پرورش داده شود، شناخته شده و از سوی دیگر به علت بازده اقتصادی مناسب، به عنوان یک صنعت موفق درآمده است. بنابراین ارائه هرگونه پیشنهاد عملی و قابل اجرا برای افزایش رشد و بازدهی قارچ خوراکی *آگاریکوس بیسپاروس* لازم و ضروری است. در این پژوهش، وضعیت فلور میکروبی لایه پوششی ۱۴ مزرعه پرورش قارچ خوراکی در سال ۱۳۸۸ مورد بررسی میکروبیولوژیکی قرار گرفت. ۲۷۴ سویه باکتریایی از این نمونه‌ها با کشت بر روی محیط‌های عمومی Luria-Bertani (LB) و اختصاصی S1، به ترتیب جداسازی شدند. آزمون‌های بیوشیمیایی، برای تمامی سویه‌ها انجام شد. رشد در حضور ترکیب فرار 1-octen-3-ol، توان تولید سیدروفور و حل‌کنندگی فسفات‌های آلی و معدنی، در سویه‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که ۹۷٪ از سویه‌ها توانایی رشد در حضور مقادیر بالای ترکیب فرار 1-octen-3-ol را دارند. همچنین، ۳۶٪ و ۵۲٪ از سویه‌ها به ترتیب، توانایی حل کردن فسفات‌های معدنی و آلی، را داشتند. در نهایت با توجه به ویژگی‌های مذکور (بیوشیمیایی، رشد در حضور 1-octen-3-ol، توان تولید سیدروفور و توانایی حل کردن فسفات‌های آلی و معدنی) ۲۷ سویه برای ادامه تحقیقات انتخاب شدند. نتایج آزمون‌های مزرعه نشان داد که سه سویه Bt4، Ps7 و Pd8، با ۱۴٪، ۱۲٪ و ۱۱/۴۳٪، به ترتیب، بیشترین افزایش در تولید و بازدهی کمی و دو سویه Pd12 و Ps7 با ۲۳٪ و ۱۱٪ به ترتیب، بیشترین افزایش در بازده کیفی قارچ *آگاریکوس بیسپاروس* را نسبت به شاهد نشان دادند. این سویه‌ها (Bt4، Ps7 و Pd8) شناسایی مولکولی شدند. DNA کروموزومی سویه‌ها استخراج و ژن‌های 16S rRNA توسط PCR و با استفاده از پرایمرهای عمومی fD1 و rD1 تکثیر و سپس در وکتور پلاسمیدی pTZ57R/T کلون و به باکتری *E.coli* DH5α منتقل شدند. کلون‌های حاصل توسط PCR و تکثیر قطعه DNA وارد شده در پلاسمید مذکور غربال و در

یکی از کلون‌هایی که قطعه را دریافت کرده بود، وجود ژن 16S rRNA توسط PCR و با استفاده از پرایمر-های fD1 و rD1 تأیید شد. تأیید نهایی کلونینگ ژن، توسط تعیین توالی انجام شد. توالی ژن 16S rRNA در بانک ژن مرکز اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) ثبت شد. کد دسترسی به این ژن‌ها در این سایت عبارتند از Bt4 (HQ613735) و Ps7 (HQ613736) می‌باشد.

در نهایت سویه‌های *سودوموناس پوتیدا* Bt4، Ps7، Pd8 و Pd12 به عنوان مایه تلقیح برای افزایش تولید و بازدهی (کمی و کیفی) محصول قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) معرفی شدند که از اهداف پژوهش حاضر بود.

کلمات کلیدی: *آگاریکوس بیسپاروس*، قارچ، باکتری‌های محرک رشد قارچ و *سودوموناس پوتیدا*

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جدول.....ح
فهرست شکل.....د
مقدمه.....۱

بخش اول: بررسی منابع

۱-۱- قارچ خوراکی دکمه ای آگاریکوس بیسپاروس..... ۵
۱-۱-۱- مورفولوژی قارچ خوراکی دکمه‌ای ۸
۱-۱-۱-۱- کلاهک..... ۸
۱-۱-۱-۲- تیغه..... ۸
۱-۱-۱-۳- ساختمان تیغه..... ۹
۱-۱-۱-۴- پایه یا ساقه..... ۱۰
۱-۱-۱-۵- پرده عمومی..... ۱۰
۱-۱-۲- بیولوژی قارچ خوراکی دکمه ای..... ۱۱
۱-۱-۳- بیولوژی کاربردی قارچ..... ۱۲
۱-۱-۴- ارزش غذایی قارچ های خوراکی..... ۱۳
۱-۱-۴-۱- پروتئین..... ۱۴
۱-۱-۴-۲- ویتامین..... ۱۵
۱-۱-۴-۳- عناصر معدنی..... ۱۶
۱-۱-۴-۴- کربوهیدرات و چربی..... ۱۶
۱-۱-۵- موارد مصرف قارچ ها..... ۱۶
۱-۱-۶- چرخه زندگی قارچ های خوراکی..... ۱۷
۱-۲- کمپوست قارچ خوراکی دکمه ای..... ۱۹
۱-۲-۱- ترکیب کمپوست..... ۲۰
۱-۲-۲- مکمل های آلی و معدنی کمپوست..... ۲۱
۱-۲-۳- کمپوست سازی..... ۲۲

۱-۲-۳-۱ هوادهی در فازI کمپوست سازی..... ۲۴
۱-۲-۳-۲- پایان کمپوست سازی در فاز II..... ۲۴
۱-۲-۴- میکروبیولوژی کمپوست..... ۲۶
۱-۲-۵- کشت قارچ خوراکی دکمه ای..... ۲۹
۱-۲-۵-۱ انتخاب سویه/گونه قارچی مناسب..... ۳۰
۱ -۲-۵-۱-۱- منابع کشت..... ۳۰
۱-۲-۵-۲- تهیه بذر قوی و خوب. ۳۱
۱-۲-۵-۲-۱- حفظ بذر..... ۳۳
۱-۲-۵-۲-۲- آماده سازی بذر مادر..... ۳۳
۱-۲-۵-۲-۳- آماده سازی بذر کشت دادنی..... ۳۴
۱-۲-۵-۲-۴- حفظ کیفیت بذر..... ۳۴
۱-۲-۵-۳-خاک دهی..... ۳۵
۱-۲-۵-۴-پاستوریزه کردن خاک پوششی..... ۳۶
۱-۲-۵-۵-زمان خاکدهی..... ۳۶
۱-۲-۵-۶-محصول‌دهی و برداشت..... ۳۷
۱-۲-۶- تأثیر میکروارگانیسم‌ها بر روی لایه پوششی قارچ دکمه‌ای..... ۳۹
۱-۲-۷- بیماری‌ها و آفات قارچ‌ها..... ۴۲
۱-۲-۷-۱-بیماری‌های قارچی..... ۴۲
۱-۲-۷-۲-بیماری‌های باکتریایی..... ۴۴
۱-۲-۷-۳-آفات قارچ خوراکی..... ۴۶
۱-۲ اهداف پژوهش..... ۴۸

بخش دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد..... ۵۰
۲-۱-۱- مواد شیمیایی..... ۵۰
۲-۱-۲- آنتی‌بیوتیک‌ها..... ۵۰
۲-۱-۳- باکتری..... ۵۱
۲-۱-۴- آغازگرها (پرایمرها)..... ۵۱
۲-۱-۵- پلاسمیدها..... ۵۲
۲-۱-۶- کیت‌های آزمایشگاهی..... ۵۲
۲-۱-۷- آنزیم ها..... ۵۲

۲-۱-۸- مارکرها ۵۳
۲-۱-۹- محلول‌ها ۵۳
۲-۱-۹-۱-محلول‌های لازم جهت استخراج پلاسمید (مقیاس کوچک) ۵۳
۲-۱-۹-۲-محلول‌های لازم برای الکتروفورز DNA روی ژل آگاروز ۵۴
۲-۱-۹-۲-۱- محلول TAE ۵۴
۲-۱-۹-۳-محلول ذخیره IPTG (Isopropyl-β- Thiogalactopyranoside) ۵۵
۲-۱-۹-۴-محلول ذخیره X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) ۵۵
۲-۱-۹-۵-بافر PCR ۵۵
۲-۱-۹-۶-محلول مورد استفاده درآزمون تولید سیدروفور ۵۵
۲-۱-۹-۷-محلول‌های مورد نیاز برای تهیه سلولهای باکتریایی مستعد (Competent Cell) ۵۶
۲-۱-۱۰- محیط‌های کشت باکتری ۵۶
۲-۱-۱۰-۱-محیط کشت مایع LB (Luria-Bertani) ۵۶
۲-۱-۱۰-۲-محیط کشت جامد LB Agar ۵۶
۲-۱-۱۰-۳-محیط کشت LBAgar حاوی Amp، X-Gal و IPTG ۵۷
۲-۱-۱۰-۴-محیط کشت .S1 ۵۷
۲-۱-۱۰-۵-محیط کشت Starch agar ۵۷
۲-۱-۱۰-۶-محیط کشت ژلاتین مغذی ۵۸
۲-۱-۱۰-۷-محیط کشت اسپربر ۵۸
۲-۱-۱۰-۸-محیط کشت CAS-Agar ۵۹
۲-۱-۱۱- محیط نگهداری باکتری‌ها ۶۰
۲-۱-۱۲- وسایل و دستگاه‌ها ۶۰
۳-۱ روش‌ها ۶۱
۲-۱-۱۳- نمونه برداری از خاک ۶۱
۲-۱-۲- جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌ها ۶۱
۲-۱-۲-۱-جداسازی کل باکتری‌ها ۶۱
۲-۱-۲-۲-جداسازی سودوموناس‌ها ۶۱
۲-۱-۳- بررسی برخی ویژگی‌های مورفولوژیک سویه‌ها ۶۲
۲-۱-۴- تعیین هویت باکتری‌ها ۶۲
۲-۱-۴-۱-بیوشیمیایی ۶۲
۲-۲-۴-۱-۱-بررسی رشد سویه‌ها در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد ۶۲

۲-۲-۴-۱-۲-بررسی رشد سویه‌ها در دمای۴ درجه سانتی‌گراد..... ۶۲
۲-۲-۴-۱-۳-تست کاتالاز..... ۶۳
۲-۲-۴-۱-۴-تست اکسیداز..... ۶۳
۲-۲-۴-۱-۵-هیدرولیز نشاسته (بررسی توان تولید آمیلاز)..... ۶۳
۲-۲-۴-۱-۶-هیدرولیز ژلاتین (برسی توان تولید ژلاتیناز)..... ۶۴
۲-۱-۴-۲-سایر خصوصیات MGPB ها..... ۶۴
۲-۲-۴-۲-۱-توان رشد در محیط حاویoctan-3-ol-1..... ۶۴
۲-۲-۴-۲-۲-بررسی توان حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی نامحلول..... ۶۴
۲-۲-۴-۲-۳-بررسی توان تولید فسفاتاز..... ۶۵
۲-۲-۴-۲-۴-بررسی توان تولید سیدروفور..... ۶۵
۲-۲-۴-۲-۵-بررسی توان تولید فلورسانس..... ۶۶
۲-۲-۴-۳-آزمایش‌های مزرعه..... ۶۶
۲-۲-۴-۳-۱-آماده سازی مایه تلقیح..... ۶۶
۲-۲-۴-۳-۲-آماده سازی سالن پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای..... ۶۶
۲-۲-۴-۳-۳- برداشت قارچ..... ۶۸
۲-۲-۴-۴-شناسایی مولکولی..... ۶۹
۲-۲-۴-۴-۱- استخراج DNA کروموزومی..... ۶۹
۲-۲-۴-۴-۲- تکثیر اختصاصی مولکول DNA واکنش‌های زنجیرهای پلیمراز..... ۷۲
۲-۲-۴-۴-۲-تهیه ژل آگاروز..... ۷۸
۲-۲-۴-۴-۵-۱-خالص سازی محصول PCR از روی ژل با استفاده از کیت..... ۷۹
۲-۲-۴-۴-۵-۲-خالص سازی محصول PCR با استفاده از کیت..... ۸۰
۲-۲-۴-۴-۶-اتصال قطعه DNA (ژن 16s rRNA) به پلاسمید..... ۸۰
۲-۲-۴-۴-۷-انتقال پلاسمید نوترکیب به *E.coli* (ترانسفورماسیون)..... ۸۱
۲-۲-۴-۴-۹-۱-روش شوک حرارتی..... ۸۲
۲-۲-۴-۴-۱۰-غربال کردن کلون‌های واجد پلاسمید نوترکیب..... ۸۳
۲-۱-۵- نرم‌افزارهای استفاده شده در این تحقیق..... ۸۵

بخش سوم: نتایج

۳-۱- بررسی وضعیت میکروبی لایه پوششی چند مزرعه پرورش قارچ..... ۸۷
۳-۲-بررسی توان رشد سویه‌های جداشده از محیط LB بر روی محیط S1..... ۹۰
۳-۳-۱- بررسی ویژگی‌های اکسیدازی و کاتالازی سویه‌های رشد یافته در محیط S1..... ۹۱

۳-۱-۲- بررسی توان رشد در دمای ۴ درجه و عدم رشد در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد.....۹۲
۳-۳-۳- بررسی هیدرولیز نشاسته و ژلاتین در سویه‌های رشد یافته در محیط اختصاصی S1.....۹۴
۳-۳-۴- بررسی توان رشد سویه‌ها در محیط حاوی 1-octen-3-ol.....۹۶
۳-۳-۵- بررسی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی در محیط اسپربر.....۹۶
۳-۳-۶- بررسی توان تولید فسفاتاز در محیط LB حاوی BCIP.....۹۷
۳-۳-۷-بررسی توان تولید سیدروفور سویه‌ها در محیط CAS آگار.....۹۹
۳-۴-۱- شرایط سالن پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای.....۱۰۲
۳-۴-۲- خصوصیات باکتری‌های مورد استفاده در آزمون‌های در مزرعه پرورش قارچ.....۱۰۲
۳-۴-۳- بررسی اثر سویه‌ها بر روی محصول از قارچ دکمه‌ای در فلاش اول.....۱۰۳
۳-۴-۴- بررسی اثر سویه‌ها بر روی محصول از قارچ دکمه‌ای در فلاش دوم.....۱۰۴
۳-۴-۵-بررسی اثر سویه‌ها بر روی محصول از قارچ دکمه‌ای در فلاش سوم.....۱۰۶
۳-۴-۶- بررسی اثر سویه‌ها بر روی محصول از قارچ دکمه‌ای در سه برداشت.....۱۰۸
۳-۴-۷- بررسی وضعیت رشد محصول نسبت به شاهد.....۱۱۰
۳-۴-۸- بررسی اثر سویه‌ها بر روی بازده کیفی محصول قارچ دکمه‌ای در فلاش اول، دوم و سوم۱۱۲
۳-۴-۹- مقایسه بازده کمی و کیفی محصول قارچ در سه برداشت نسبت به شاهد.....۱۱۴
۳-۵-۱- کلونینگ و تعیین توالی ژن کدکننده 16S rRNA از سویه‌های Bt4، Ps7 و Pd8.....۱۱۵
۳-۵-۲- توالی‌یابی ژن 16S rRNA سویه Bt4.....۱۱۶
۳-۵-۳- توالی‌یابی ژن 16S rRNA سویه Ps7.....۱۱۷
۳-۵-۴- توالی‌یابی ژن 16S rRNA سویه Pd8.....۱۱۸
۳-۵-۶- نامگذاری سویه‌های مورد بررسی.....۱۱۹

بخش چهارم: بحث

۴-۱- بحث..... ۱۲۲

پیشنهادها.....۱۲۹
مراجع مورد استفاده.....۱۳۰

ضمائم.....۱۳۶

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱ - تجزیه تقریبی قارچ خوراکی *آگاریکوس بیسپاروس* بر اساس وزن تر..... ۱۳
جدول ۱-۲- میزان پروتئین به دست‌آمده از پرورش قارچ، گاو گوشتی و ماهی در واحد سطح..... ۱۴
جدول ۱-۳- ترکیبات اسید امینه‌ای قارچ خوراکی *آگاریکوس بیسپاروس* برحسب میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم وزن خشک..... ۱۴
جدول ۱-۴ - موارد استفاده از قارچ‌ها..... ۱۷
جدول ۲-۱-نام و مشخصه سویه *E. coli* استفاده شده در تحقیق..... ۵۱
جدول ۲-۲-فهرست آغازگرهای استفاده شده در تحقیق..... ۵۱
جدول ۲-۳- فهرست پلاسمیدهای استفاده شده در تحقیق..... ۵۲
جدول ۲-۴- مواد لازم برای تهیه ۱ لیتر محیط S1..... ۵۷
جدول ۲-۵- مواد لازم برای تهیه ۱ لیتر محیط کشت Starch agar..... ۵۸
جدول ۲-۶-مواد لازم برای تهیه ۱ لیتر محیط کشت ژلاتین مغذی..... ۵۸
جدول ۲-۷-مواد لازم برای تهیه ۱ لیتر محیط کشت اسپربر..... ۵۸
جدول-۲-۸- شرایط دمایی و زمانی PCR برای تکثیر ژن 16sRNA سویه‌های مختلف..... ۷۶
جدول ۲-۹- ترکیب و مقادیر واکنش PCR در حجم ۵۰µl..... ۷۷
جدول -۳-۱- تعداد و نام ایزوله‌های جداشده از محل‌های جمع‌آوری نمونه..... ۸۷
جدول-۳-۲- بررسی کمی جمعیت باکتری‌ها در محیط‌های LB و S1 و نسبت *سودوموناس* به کل باکتری-ها..... ۸۹
جدول-۳-۳- رشد سویه‌های جداشده از محیط LB بر روی محیط S1..... ۹۰
جدول-۳-۴- ویژگی‌های اکسیدازی و کاتالازی سویه‌های رشد یافته در محیط S1..... ۹۱
جدول-۳-۵- ویژگی رشد سویه‌ها در دمای ۴ و ۴۱ درجه سانتی‌گراد در سویه‌های رشد کرده در محیط S1..... ۹۳
جدول-۳-۶- ویژگی‌های هیدرولیز نشاسته و ژلاتین در سویه‌های رشد کرده در محیط S1..... ۹۵
جدول- ۳-۷-ویژگی‌های رشد سویه‌ها در محیط‌های حاوی 1-octen-3-ol، BCIP و محیط اسپر..... ۹۷
جدول- ۳-۸- ویژگی‌های باکتری‌های محرک رشد در محیط CAS-Agar..... ۱۰۰
جدول ۳-۹- شرایط سالن پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای..... ۱۰۱
جدول -۳-۱۰-ویژگی‌های سویه‌های *سودوموناس پوتیدا*..... ۱۰۲
جدول- ۳-۱۱- سویه‌های منتخب برای آزمایش در مزرعه..... ۱۰۳
جدول ۳-۱۲- میانگین وزن محصول متناسب با هر سویه در فلاش اول..... ۱۰۳

جدول ۳-۱۳- میانگین وزن محصول متناسب با هر سویه در فلاش دوم..... ۱۰۵
جدول ۳-۱۴- میانگین وزن محصول متناسب با هر سویه در فلاش سوم..... ۱۰۷
جدول ۳-۱۵- میانگین وزن محصول هر سویه در فلاش ۱، ۲ و۳ ..... ۱۰۹
جدول ۳-۱۶- درصد رشد کمی قارچ تولید شده در سویه‌ها نسبت به شاهد..... ۱۱۱
جدول ۳-۱۷- میانگین درصد وزن خشک و بازده کیفی محصول در سه برداشت.....۱۱۳

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱-طرح شماتیک از بلوک‌های تیمار شده با سویه ۶۷
شکل ۳-۱-نسبت سودوموناس به کل باکتری ها در لایه پوششی قارچ پارس شهریار..... ۹۰
شکل ۳-۲- شدت رنگ آبی تولید شده در کلنی‌های با توان تولید فسفاتاز در محیط حاوی BCIP..... ۹۷
شکل ۳-۳- تولید سیدروفور در سویه ها (هاله شفاف نارنجی رنگ)..... ۹۹
شکل ۳-۴- درصد بازده کمی قارچ در برداشت اول نسبت به شاهد..... ۱۰۴
شکل ۳-۵- درصد بازده کمی قارچ در برداشت دوم نسبت به شاهد..... ۱۰۶
شکل۳-۶- درصد بازده کمی قارچ در برداشت سوم نسبت به شاهد..... ۱۰۸
شکل ۳-۷- درصد بازده کمی قارچ در برداشت اول، دوم و سوم نسبت به شاهد..... ۱۱۰
شکل ۳-۸-بازدهی قارچ تولید شده در سویه‌ها نسبت به شاهد..... ۱۱۲
شکل ۳-۹- مقایسه بازده کمی وکیفی سویه‌ها در سه برداشت نسبت به شاهد..... ۱۱۴
شکل ۳-۱۰- الکتروفورز محصول PCR ژن 16s rRNA با آغازگرهای fD1 و rD1 . ..... ۱۱۵
شکل ۳-۱۱- توالی جزئی ژن 16S rRNA سویه Bt4 ..... ۱۱۶
شکل ۳-۱۲- توالی جزئی ژن 16S rRNA سویه Ps7 ..... ۱۱۷
شکل ۳-۱۳- توالی جزئی ژن 16S rRNA سویه Pd8 ..... ۱۱۸
شکل ۳-۱۴- درخت فیلوژنی توالی نوکلئوتیدی 16s rRNA مربوط به سویه‌های Bt4 وPs7. ..... ۱۲۰

مقدمه

تأمین نیازهای غذایی، یک ضرورت مهم هر کشوری است. با افزایش روزافزون جمعیت، برآورده‌کردن نیازهای غذایی با کشاورزی سنتی میسر نیست. با توجه به بحران‌های غذایی، پیشرفت قابل توجه در فنآوری تولید غذا، برای بهبود وضعیت حاد غذا، بسیار مهم است.

داشتن مقدار زیاد کالری به تنهایی نمی‌تواند نشان دهنده تغذیه مناسب و استاندارد باشد، چرا که ماده غذایی باید مواد معدنی، ویتامین‌ها و انواع پروتئین‌ها را داشته باشد تا انرژی کافی را تأمین نماید. کمبود پروتئین نه تنها در آینده مشکل‌ساز خواهد بود، بلکه به عنوان نیاز کنونی بشر شایان توجه است. اگر چه قسمت اعظم پروتئین توسط گیاهان سبز تولید می‌شود، اما مقدار آن در گیاهان، به استثنای چند مورد، نسبت به وزن کل گیاه پایین است. قارچ‌ها دارای ترکیباتی غنی از پروتئین، کربوهیدرات، املاح با ارزش و ویتامین‌ها هستند و از نظر ارزش غذایی، بعد از گوشت و قبل از سبزی‌ها قرار می‌گیرند.

تنها با ۱/۴ کاه و کلش سالیانه جهان، می‌توان حدود ۳۰۰ میلیون تن قارچ تازه تولید کرد. این مقدار ، روزانه ۲۵۰ گرم قارچ تازه برای ۴۱۰۰ میلیون نفر را تأمین می‌کند. قارچ دکمه‌ای سفید *آگاریکوس بیسپاروس* به عنوان محصولی که می‌تواند در تمام طول سال پرورش داده شود، شناخته شده است [نیتا بهل، ۲۰۰۰].

قارچ دکمه‌ای *آگاریکوس بیسپاروس* دارای دو فاز رویشی و زایشی در چرخه زندگی‌اش می‌باشد. تغییر از فاز رویشی به فاز زایشی (تشکیل اندام باردهی)، در کمپوست کلونیزه شده پوشیده شده با خاک پوششی، اتفاق می‌افتد. لایه پوششی دارای ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و میکروبیولوژیکی خاصی است که آغاز و توسعه اندام زایشی را تحریک می‌کند [Wright et al. 1975; Noble et al. 2003].

مرحله تشکیل پین ۴ الی ۵ روز طول می‌کشد. در طی این مرحله ، میسلیوم به حالت انقباض درمی‌آید و تدریجاً شروع به تشکیل پین می‌کند. اگر چه فاکتورهای دخیل در آغاز و توسعه قارچ به طور دقیق شناخته نشده، با این حال عواملی چون آب و هوا، صفات مشخصه نژاد، باکتری‌ها، خاک پوششی و ..... را می‌توان در این فرآیند دخیل دانست.

اهمیت غلظت دی‌اکسیدکربن و دما به خوبی اثبات شده بطوری‌که غلظت‌های پایین دی‌اکسیدکربن فرآیند آغاز را تسریع می‌کند و بالعکس. همچنین درجه حرارت هوا باید ۱۸ درجه سانتی‌گراد باشد. کنترل درجه حرارت و غلظت دی‌اکسیدکربن از اهمیت زیادی در فرآیند آغاز و توسعه قارچ برخوردار است [Tschierpe et al. 1964].

در گذشته مطالعات زیادی در رابطه با تأثیر باکتری‌ها در تشکیل قارچ انجام گرفته است. این تحقیقات نشان داده است که حضور میکروفلورای مناسب در خاک پوششی برای تشکیل قارچ ضروری می‌باشد. یکی از مهمترین باکتری‌های ساپروفیتی *سودوموناس پوتیدا* تشخیص داده شده‌است [Hayes et al. 1969; Rainey et al. 1990]. اگر خاک پوششی استریلیزه شده تحت شرایط کاملاً استریل برای کشت استفاده شود، تعداد کم قارچ ظاهر می‌گردد و یا ممکن است اصلاً قارچی تولید نشود [Park et al. 1969] . لیکن چنانچه سوسپانسیون باکتری بر روی خاک پوششی پاشیده شود، تشکیل قارچ حالت طبیعی خواهد داشت. ضد-عفونی خیلی شدید خاک پوششی دارای تأثیر بازدارنده در تشکیل قارچ می‌باشد. پس از خاکدهی، ترکیبات مختلف متابولیکی میسلیوم در حال رشد، عاملی برای رشد و تکامل باکتری‌ها به حساب می‌آید. حجم خیلی زیاد فرآورده‌های متابولیکی (ترکیبات هشت کربنه 1-octen-3-ol، استالدئید، اتیل الکل و ....) مانع تشکیل قارچ می‌گردد. *سودوموناس پوتیدا* مازاد این مواد را جذب می‌نماید، به طوری‌که برای تشکیل قارچ مانعی وجود نداشته باشد. بنابراین یکی از مکانیسم‌های تحریکی آغاز و توسعه قارچ متابولیزه کردن این ترکیبات هشت کربنه می‌باشد که به عنوان خود-محدودگر عمل می‌کنند [Noble et al. 2009].

از مکانیسم‌های احتمالی تحریکی رشد و توسعه قارچ به تولید سیدروفور توسط باکتری‌ها می‌توان اشاره کرد. باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* دارای سیستم جذب آهن با تمایل بالا می‌باشند. این باکتری‌ها، در رقابت برای آهن در شرایط محدودیت آن، موفق‌تر عمل کرده و با تشکیل کمپلکس سیدروفور-Fe^{3+}، آن را از دسترس سایر رقبا و باکتری‌های بیماری‌زا خارج می‌کنند [Marugg et al. 1989; Paulitz 1991].

لذا شناسایی مکانیسم‌های تحریکی باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* و به دنبال آن افزایش بازدهی کمی و کیفی تولید قارچ دکمه‌ای *آگاریکوس بیسپاروس* از مهمترین اهداف این پژوهش بود. در این تحقیق میکروفلور ۱۴ مزرعه پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید از نظر ویژگی‌های مصرف ماده فرار 1-octen-3-ol، توانایی حل‌کنندگی فسفات‌های آلی و معدنی و توانایی تولید سیدروفور مورد بررسی قرار گرفتند. پس از گروه‌بندی آن‌ها از نظر ویژگی‌های مذکور و تلقیح در مزرعه پرورش قارچ، سویه‌های برتر از نظر توالی 16s rRNA بررسی مولکولی شدند. در نهایت چهار سویه، به عنوان سویه‌های برتر برای تلقیح در مزرعه پرورش قارچ خوراکی *آگاریکوس بیسپاروس* (افزایش بازدهی کمی وکیفی، بسته به هدف) انتخاب شدند.

در سال ۱۳۸۹ در ایران، سطح زیر کشت قارچ خوراکی دکمه‌ای *آگاریکوس بیسپاروس* ، ۴۱ هکتار و قارچ تولید شده از این سطح معادل، ۴۸۰۰۰ تن بوده است [انجمن قارچ‌های خوراکی ایران]. در این پژوهش با افزایش ۱۴ درصدی رشد قارچ خوراکی، میزان تولید سالیانه آن در کشور در حدود ۵۵۰۰۰ تن تخمین زده شده است.

مهمترین اهداف این پژوهش عبارت بودند از :

۱. شناسایی میکروفلور خاک پوششی چندین مزرعه پرورش قارچ خوراکی *آگاریکوس بیسپاروس*

۲.دستیابی به سویه‌های برتر از نظر رشد در حضور ماده فرار 1-octen-3-ol

۳.شناسایی سویه‌های برتر از نظر خصوصیات محرک رشد قارچ

۴.دستیابی به سویه‌های برتر از نظر افزایش تولید محصول قارچ دکمه‌ای در شرایط مزرعه

۵.در نهایت معرفی سویه‌های برتر در افزایش رشد و بازدهی قارچ خوراکی *آگاریکوس بیسپاروس*

فصل ۱-

بررسی منابع

۱-۱- قارچ خوراکی دکمه‌ای *آگاریکوس بیسپاروس*

قارچ‌ها دارای یک بخش رویشی به نام میسلیوم و یک بخش زایشی به نام ماش‌روم[۱] می‌باشند. میسلیوم، شامل یک سری رشته‌های انشعاب‌دار و تارهای شبه طناب[۲] بوده ودر میان خاک، کمپوست و یا مواد لیگنوسلولزی دیگر که قارچ‌ها می‌توانند در روی آن رشد کنند، دیده می‌شود. بعد از یک دوره رشد و تحت شرایط مطلوب، میسلیوم بالغ شده و ساختار زایشی ماش‌روم را به وجود می‌آورد.

ماش‌روم یک قارچ[۳] یک اندام زایشی مجزایی است که ممکن است به اندازه کافی بزرگ باشد تا با چشم غیر مسلح دیده و با دست چیده شود. بنابراین، ماش‌روم‌ها الزاماً بازیدیومیست‌های هوایی یا گوشتی و یا خوراکی نیستند و می‌توانند از آسکومیست‌ها نیز باشند.

ماش‌روم‌ها می‌توانند در ۴ گروه طبقه‌بندی شوند :

۱- آنهایی که گوشتی و خوراکی‌اند و در گروه قارچ‌های خوراکی قرار می‌گیرند. مانند *آگاریکوس بیسپاروس*[۴]

۲- قارچ‌هایی که کاربردهای دارویی دارند و به عنوان قارچ‌های دارویی در نظر گرفته می‌شوند مانند *گانودرما لوسیدوم*[۵]

۳- آن‌هایی که سمی‌اند و به عنوان قارچ‌های سمی در نظر گرفته می‌شوند مانند *آمانیتا فالوئیدز*[۶]

۴- گروه ناشناخته که شامل تعداد زیادی از قارچ‌هایی‌اند که ویژگی‌های آن‌ها کمتر شناخته شده است و به عنوان قارچ‌های دیگر گروه‌بندی می‌شوند*.

---

[1] -Mushroom
[2] - cord
[3] - Macro fungus
[4] - *Agaricus.bisporus*
[5] -*Ganoderma lucidum*
[6] -*Amanita phaloiedes*
*-www.Unapcaem.org