نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۱، شماره ۲ ، تابستان ۱۳۹۲، ص. ۲۹۹-۲۹۱

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 11, No. 2, Summer. 2013, p. 291-299

ارزیابی پتانسیل استفاده از برخی ضایعات کشاورزی و جنگلی در تولید اسپاون قارچ دارویی *Ganoderma lucidum*

مریم توانا[۱]- مجید عزیزی[۲*]- محمد فارسی[۳]

تاریخ دریافت:۱۳۹۰/۴/۱۵
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۳/۱۵

چکیده

کیفیت اسپاون در تولید موفقیت آمیز قارچ های دارویی نقش بسیار مهمی ایفا می‌کند. در این تحقیق ابتدا به منظور بهینه سازی شرایط برای رشد میسلیوم قارچ گانودرما، ۴ بستر پایه شامل بذور گندم، جو، ارزن و تراشه چوب درخت نراد به طور جداگانه در دو دمای ۲۵±۱ $^{\circ}C$ و ۲۹±۱ $^{\circ}C$ مورد بررسی قرار گرفتند. در بخش دوم آزمایشات، بذور غلاتی مانند گندم، جو و ارزن با نسبت‌های مختلفی از ضایعات کشاورزی نظیر سبوس گندم (۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد وزنی)، پوست ارزن (۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد وزنی) و همچنین تراشه چوب درخت نراد (۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی) به عنوان ضایعات جنگلی مخلوط شده و هر کدام از مخلوط ها جداگانه مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین در آزمایشی دیگر، از خاک‌اره درختانی نظیر راش، افرا، چنار، اقاقیا، عرعر، توسکا و سپیدار که از جمله‌ی ضایعات جنگلی به شمار می‌روند، به عنوان بستر رشدی استفاده گردید. در آزمایش اول، بالاترین سرعت رشد میسلیوم (۸/۹۲ mm/day) زمانی حاصل شد که از بستر گندم در دمای ۲۹±۱ $^{\circ}C$ استفاده شد. در آزمایش دوم، نتایج نشان داد که با افزودن ۱۰ درصد سبوس گندم به غله گندم بالاترین سرعت رشد میسلیوم (۹/۶۶ mm/day) بدست می آید. نتایج بررسی بسترهای خاک‌اره نیز نشان داد که خاک‌اره اقاقیا با نسبت کربن به نیتروژن (C/N) ۲۵/۸۴، بیشترین سرعت رشد میسلیوم (۹/۳۶ mm/day) را نسبت به انواع دیگر خاک اره داشته و به عنوان اسپاون یا مکمل توصیه می گردد. بررسی های رابطه C/N بسترهای مختلف اسپاون و سرعت رشد میسلیوم، حاکی از آن است که حضور مکمل های حاوی نیتروژن اعم از سبوس یا خاک اره های غنی از نیتروژن، به بهبود رشد میسلیوم این قارچ کمک کرده و در نسبت های C/N بالاتر از ۶۱/۳، به دلیل کاهش میزان نیتروژن، سرعت رشد میسلیوم بطور چشمگیری کاهش می یابد.

واژه های کلیدی: اسپاون، نسبت C/N ، سرعت رشد میسلیوم، ضایعات کشاورزی

مقدمه

قارچ گانودرما لوسیدوم[۴] یکی از قارچ‌های کلاهک دار بسیار ارزشمند جهان بوده که به رنگ های قرمز، قرمز مایل به قهوه‌ای و زرد روشن یافت شده‌است. میوه این قارچ در ژاپن به ریشی[۵] یا مانتاکه[۶] (قارچ ۱۰۰۰۰ ساله) و در چین و کره به نام‌های لینگ چی[۷]، لینگ چو[۸] و لینگ ژی[۹] (قارچ‌های جاودانه و فناناپذیر) معروف است. گونه‌های مربوط به جنس *Ganoderma* (*G. lucidum*، *G. tsuga*، *G. applanatum* و غیره) به لحاظ دارویی قدمت طولانی داشته که تاریخ آن حداقل به ۴ هزار سال قبل بر می‌گردد (۲۵). میوه و میسلیوم این قارچ، حاوی استروئید، لاکتون، آلکالوئید، پلی‌ساکارید، تری ترپن و پروتئین بوده که اثر تقویت کنندگی آن‌ها روی سیستم ایمنی بدن به اثبات رسیده‌است (۱۴). پلی‌ساکاریدها و تری ترپن ها در بین این ترکیبات به دلیل خواص ضد سرطانی آن‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشند (۱۸ و ۲۱). از جمله خواص دارویی این قارچ بسیار

۱و۲- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: azizi@feddowsi.um.ac.ir)
۳- استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

4- *Ganoderma lucidum*
5- Reishi
6- Mannetake
7- Ling chih
8- Ling chu
9- Ling zhi

ارزشمند می‌توان به درمان هپاتیت A، B وC، نفریتیس، آرتروز، دردهای عصبی، بیخوابی، برونشیت، آسم، زخم معده، فشار خون، کلسترول بالا و خصوصاً سرطان معده اشاره کرد (۲۲). محصولات دارویی قارچ *G. lucidum* به صورت شربت، قرص، کپسول، آمپول و تنتور در بازارهای جهانی وجود دارد.

در طب سنتی چین[1] که قدمت آن به ۲۰۰۰ سال قبل بر می‌گردد، می‌گردد، غذاها نقش مهمی را در حفظ و بهبود سلامتی و همچنین جلوگیری از ابتلا به بیماری دارند (۲۳ و ۳۰). حتی با پیشرفت پزشکی غرب در زمینه درمان بیماران سرطانی با روش‌های مدرن مانند جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی، بسیاری از انواع بدخیم سرطان را می‌توان با استفاده از رژیم مناسب غذایی بهبود بخشید. استفاده از رژیم‌های غذایی در آمریکا بطور چشمگیری طی۱۰ سال گذشته افزایش یافته است و بکارگیری این مکمل‌ها و درمان به روش گیاهی برای درمان سرطان رو به افزایش است (۱۰). تحقیقات نشان می دهد که بسیاری از قارچ‌ها نظیر گانودرما، به عنوان مکمل غذایی می‌توانند برای بهبود سلامتی و سیستم ایمنی بدن مفید واقع شوند (۱، ۲ و ۳). مردم به استفاده از قارچ‌های خوراکی–دارویی علاقمندند چرا که به نظر می‌رسد این قارچ‌ها در طی صدها سال در دنیای شرق همراه با شناخت اثرات درمانی آن‌ها استفاده می‌شده‌اند. این در حالیست که بسیاری از جوامع مدرن از ترکیبات داروهای شیمیایی که فواید کاملاً مشخصی برای سلامتی داشته و ضمناً عوارض جانبی نیز داشته‌اند، استفاده می‌کرده‌اند.

یکی از مراحل بسیار مهم در تولید قارچ های کلاهک دار خوراکی و دارویی، مرحله تولید اسپاون[2] می‌باشد. اسپاون، بسترجامد یا مایعی است که توسط توده سفید رنگ میسلیوم حاصله از کشت خالص رقم مورد نظر مایه زنی می‌شود. رشد میسلیوم تا زمانی که کل بستر مواد آلی را فرا گیرد ادامه خواهد داشت. هدف استفاده از اسپاون این است که با کمک آن، میسلیوم رقم مورد نظر روی بستر تولید میوه، سریع تر کلونی تولید می‌کند و همچنین، اسپاون به عنوان یک حمایت کننده غذایی مهم و حاملی برای توزیع مناسب میسلیوم قارچ در بستر رشد می‌باشد. تمام مراحل از کشت خالص قارچ تا تولید اسپاون باید تحت شرایط سترون و سریع انجام شود تا احتمال آلودگی تا حد ممکن کاهش یابد. امروزه اغلب، اسپاون درون کیسه‌های سلوفان قابل اتوکلاو که مجهز به محلی برای تنفس میسلیوم می‌باشند تهیه می‌شود (۲۴). در کشت جامد اسپاون از بسترهایی نظیر بذور غلات (گندم، جو، ارزن، چاودار، سورگوم و غیره)، چوب (داول[3] یا یا میخ چوبی، اسکور[4] و پلوگ[5] یا توپی) و خاکاره به همراه سبوس به به عنوان مکمل استفاده می‌شود (۵). اسپاون قارچ دارویی گانودرما معمولاً از نوع جامد بوده و از بذور غلات، خاکاره یا چوب تهیه می‌شود. اخیراً پیشرفت‌هایی در زمینه تولید اسپاون به روش جامد صورت گرفته‌است که در آن از ضایعات کشاورزی به همراه مکمل‌های دیگر استفاده می‌شود (۲۸). از جمله مکمل‌های قابل استفاده می‌توان به قند سوکروز، سبوس گندم و سبوس برنج اشاره نمود (۶). حضور برخی از مکمل ها نظیر سبوس گندم و برنج و همچنین عصاره مخمر و پپتون برای رشد برخی قارچ ها نظیر *Morchella esculenta* مفید و حتی ضروری هستند (۲۷). برخی از محققین از بذر سورگوم[6] به عنوان اسپاون قارچ *Pleurotus tuberregium* استفاده کردند (۱۷).

نکته قابل توجه دیگر این است که، جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به حدود ۹/۲ میلیارد نفر خواهد رسید که هم اکنون ۶/۷ میلیارد نفر می‌باشد. رشد جهانی جمعیت هر ساله ۸۰ میلیون نفر است و همچنین سالیانه چیزی بالغ بر ۷۰ درصد محصولات کشاورزی و جنگلی به عنوان ضایعات دور ریخته می‌شود (۲۶). با توجه به آمار فوق، تولید قارچ نه تنها این توده عظیم ضایعات لیگنوسلولزی را می تواند به غذا تبدیل کند بلکه قادر است محصولات مغذی قابل توجهی تولید کرده که اثرات زیادی بر بهبود سلامت انسان‌ها نیز دارد. امروزه کمبود غذا، کاهش کیفیت سلامت و افزایش زوال محیط زیست سه مشکل اساسی هستند که در اثر افزایش جمعیت ایجاد شده است.

تولید قارچ‌های دارویی از یک سو و همچنین استفاده از مواد ارزان قیمت برای تولید اسپاون از سوی دیگر بسیار پر اهمیت می‌باشد. با توجه به اینکه در ایران تا کنون هیچ گونه فعالیتی در زمینه تولید این قارچ بسیار ارزشمند صورت نگرفته است، و همچنین سالیانه مقادیر زیادی از ضایعات کشاورزی تولید و بلا استفاده می‌ماند، با این شرایط و در دسترس بودن نیروی تحصیل کرده جویای کار در بخش کشاورزی، امکان تولید وسیع این قارچ را می‌توان فراهم کرد. این تحقیق نیز به منظور بکارگیری ضایعات کشاورزی نظیر سبوس گندم، پوست ارزن و همچنین تراشه و خاکاره چوب درختان جنگلی به عنوان مکمل برای بهبود رشد میسلیوم قارچ گانودرما صورت گرفت.

مواد و روش ها

این تحقیق در قالب سه آزمایش جداگانه طراحی و اجرا گردید. در بخش اول، به منظور تعیین بستر مناسب و دمای بهینه برای رشد میسلیوم، ۴ بستر پایه شامل بذور گندم، جو، ارزن و تراشه چوب

1- Traditional Chinese Medicine (TCM)
2- Spawn
3- Dowel
4- Skewer
5- Plug
6- *Sorghum bicolor*

درخت نـراد در دو دمـای ۲۵±۱ °C و ۲۹±۱ °C مـورد بررسـی قـرار گرفتند. ابتدا بذور گندم، جو و ارزن به مدت ۳-۲ ساعت در آب خیس گذاشته شده و سپس به مدت نیم ساعت جوشانده شدند. تراشه چـوب به خاطر بافت زبر آن، ابتدا ۲۴ ساعت در آب خیسانده شد و سپس بـه مدت ۲ ساعت جوشانده شد. نهایتاً مـواد جوشـانده شـده را در صـافی ریخته و به منظور حذف رطوبت سطحی و سـرد شـدن روی روزنامـه پهن گردید تا رطوبت بسترها به حدود ۶۷-۶۵ درصد برسد. در بخش دوم از تولید اسپاون، بذور غلات گندم و جو با نسبت‌های مختلفـی از ضایعات کشاورزی شامل سبوس گندم (۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد وزنـی) و پوست ارزن (۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد وزنی) و همچنین تراشه چوب نـراد (۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۶۰ درصد وزنی) به عنوان ضـایعات جنگلـی مخلـوط شدند. همانند مرحله قبـل بـذور غـلات آمـاده شـد و پوسـت ارزن و سبوس گندم به مدت نـیم سـاعت فقـط در آب خیسـانده شـده و بـه منظور رسیدن به رطوبت ۶۷-۶۵ درصد (۷) روی روزنامه پهن شـدند. حدود ۱/۲ درصد سولفات کلسیم به هر کدام از تیمارها اضافه گردیـد. گچ یا سولفات کلسیم، جزء مواد لاینفک در تولیـد اسـپاون بـه شـمار می‌رود و مانع چسبیدن مواد اسپاون به یکـدیگر شـده و آن‌هـا را بـه صورت جدا از هم نگه می‌دارد. علاوه بر این، گچ محیط اسیدی مورد نیاز برای رشد میسلیوم این قارچ را فراهم مـی کنـد (۱۵). در بخـش سوم، از ضایعات جنگلی نظیر خاک‌اره‌های درختان راش، افـرا، چنـار، اقاقیا، عرعر، توسکا و سپیدار مشابه مراحل قبل آماده گردیـد و حـدود ۰/۶ درصد سولفات کلسیم به هر کدام از خاک‌اره‌ها اضافه شد.

هر کدام ازبسترهای تهیه شـده بـه طـور جداگانـه بـه لولـه‌هـای آزمایش با قطر ۱۸ میلی‌متر و طول ۱۸ سانتیمتر منتقل شد به طـوری که حدود یک چهارم قسمت بالایی لوله بـه منظـور تهویـه و تـنفس میسلیوم قارچ خالی گذاشته شد و سپس دهانه لوله توسط پنبه فشرده کاملاً پوشانده شد. از هر تیمار، ۴ لوله تهیه گردید و هر لوله به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد. لوله‌های حاوی بسترهای مـورد نظـر در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۴۰ دقیقه اتوکلاو گردیدند. بعد از سرد شدن لوله‌هـای حـاوی بسـتر اسـپاون، مایـه زنـی توسـط پرگنه‌های حاوی میسلیوم قارچ به قطر ۷ میلی‌متر کـه توسـط چـوب پنبه سوراخ کن از محیط PDA[1] جدا شده بـود، در شـرایط اسـتریل و زیر هود لامینار صورت گرفت. به هر لولـه یـک پرگنـه منتقـل شـد. بلافاصله بعد از مایه زنی، دهانه لوله‌ها توسط پنبه فشرده استریل شده کاملاً پوشانده شـد تـا از ورود هـر گونـه آلـودگی و کـاهش رطوبـت جلوگیری شود.

تیمارهای بخش اول به دو گروه مساوی تقسیم شده و بـه مـدت ۱۴ روز به دو دمای ۲۵±۱ °C و ۲۹±۱ °C و شـرایط تاریـک منتقـل شدند. تیمارهای بخش دوم و سوم، بعد از مایه زنی بـه مـدت ۱۴ روز به دمای ۲۹±۱ °C و تاریکی منتقل شدند.

میزان نیتروژن کل در محیط کشت های آزمایشی بـا اسـتفاده از دستگاه کجلدال و میزان کربن آلی به روش اکسیداسیون مرطوب[2] بر اساس روش والکلی-بلک (۱۹۳۴) تعیین گردید.

سرعت رشد خطی میسـلیوم بـه روش سـی و یانـگ (۲۰۰۴) در لوله‌های آزمایش و بـر حسـب میلـی‌متـر در روز[3] انـدازه گیـری شـد. تیمارهای مرحله اول از طریق آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلـوک کامل تصادفی[4] و تیمارهای مرحله دوم و سوم در قالـب طـرح کـاملا تصادفی[5] مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای هر کدام از تیمارها ۴ ۴ تکرار در نظر گرفته شـد. از نـرم افزارهـای Excel و JMP جهـت آنالیز داده‌ها استفاده گردید. مقایسه میـانگین تیمارهـای آزمایشـی بـا استفاده از آزمون LSD در سطح یک درصد انجام شد.

نتایج

بررسی رشد میسلیوم در آزمایش اول اسپاون غلات

در بخش اول آزمایش اسپاون، رشـد میسـلیوم قـارچ گانودرمـا در بسترهای مختلف گندم، جو، ارزن و تراشـه چـوب درخـت نـراد در دو دمای ۲۵±۱ °C و ۲۹±۱ °C مورد بررسی قرار گرفت. نتـایج تجزیـه واریانس تأثیر نوع محیط کشت و دما در جدول ۱ آمده‌است.

جدول ۱- تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط کشت و دما بر سرعت رشد میسلیوم در مرحله اول آزمایش اسپاون

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت	۳	۳۷/۵۳۶**
دما	۱	۱۶۶۸/۸۳۷**
محیط کشت×دما	۳	۰/۸۸۶**
خطا	۲۱	۰/۳۳۰
ضریب تغییرات (٪)		۱۱/۴۲

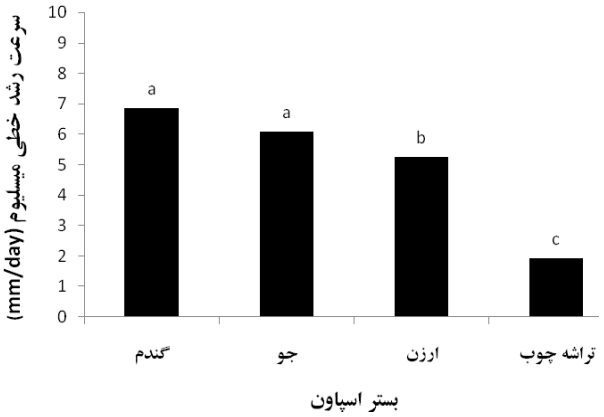
** – معنی دار در سطح احتمال یک درصد.

تأثیر نوع محیط کشت بر سرعت رشد خطی میسلیوم

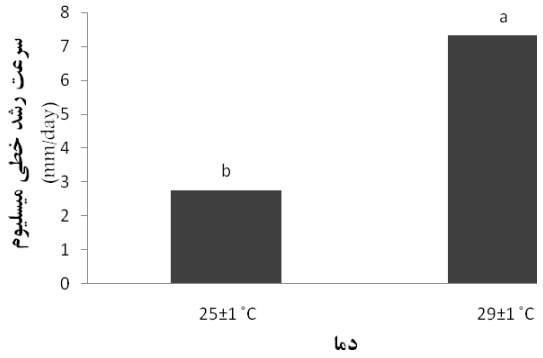
نتایج آنالیز واریانس جدول ۱ نشان داد که نوع محیط کشت‌هـای استفاده شـده بـر سـرعت رشـد میسـلیوم معنـی‌دار بـود ($p \leq ۰/۰۱$). بطوری که در شـکل۱ مشـاهده مـی شـود، بیشـترین سـرعت رشـد میسلیوم مربوط بـه غلـه گنـدم (۶/۸۵ میلـی‌متـر در روز) و کمتـرین سرعت رشد میسلیوم مربوط به تراشه چوب نـراد (۱/۹۳ میلـی‌متـر در روز) می باشد.

1- Potato Dextrose Agar

2- Wet oxidation method
3- mm/day
4- CRBD
5- CRD



شکل۱- اثر نوع بستر اسپاون بر سرعت رشد خطی میسلیوم قارچ گانودرما



شکل۲- اثر دما بر سرعت رشد خطی میسلیوم قارچ گانودرما

تأثیر دما بر سرعت رشد خطی میسلیوم

نتایج آنالیز واریانس جدول ۱ نشان می دهد که دما تأثیر معنی داری بر سرعت رشد میسلیوم این قارچ داشته ($p \leq ۰/۰۱$)، به طوری که افزایش دما از ۲۵ به ۲۹ ˚C باعث افزایش رشد گردیده است.

میانگین سرعت رشد میسلیوم در دمای ۲۹±۱ ˚C در بسترهای مختلف ۷/۳۱۴ میلی‌متر در روز و در دمای ۲۵±۱ ˚C برابر ۲/۷۵ میلی‌متر در روز بود (شکل ۲). این اختلاف حدود ۳ برابر بوده که بسیار قابل توجه‌است. با توجه به نتایج بدست آمده بهترین دما جهت رشد بهینه میسلیوم قارچ گانودرما، دمای ۲۹±۱ ˚C توصیه می‌شود.

اثر متقابل نوع محیط کشت و دما بر سرعت رشد خطی میسلیوم

با توجه به جدول ۱ اثر متقابل نوع محیط کشت و دما بر سرعت رشد میسلیوم قارچ گانودرما معنی دار است ($p \leq ۰/۰۱$).

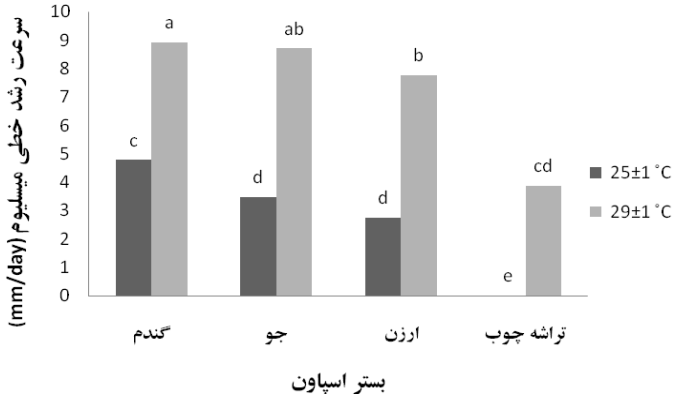
همانطور که در شکل ۳ مشخص است بیشترین سرعت رشد در هر دو دما توسط غله گندم بدست آمد. سرعت رشد خطی میسلیوم برای گندم در دمای ۲۵±۱ ˚C و ۲۹±۱ ˚C به ترتیب ۴/۷۸ و ۸/۹۲ میلی‌متر در روز بود و کمترین سرعت رشد در محیط کشت تراشه چوب نراد در دو دمای آزمایشی (عدم رشد در دمای ۲۵±۱ ˚C و ۳/۸۷ میلی‌متر در روز در دمای ۲۹±۱ ˚C) مشاهده شد. بین غله گندم و جو در دمای ۲۹±۱ ˚C و همچنین غله ارزن و جو در دمای ۲۵±۱ ˚C اختلاف معنی داری وجود نداشت.

بررسی رشد میسلیوم در آزمایش دوم اسپاون غلات

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، در هر سه غله مورد آزمایش، تیمارهای استفاده شده اثر معنی داری بر سرعت رشد میسلیوم دارند ($p \leq ۰/۰۱$). نسبت کربن به نیتروژن (C/N) تیمارهای مختلف در جدول ۳ آمده‌است.

در بین تیمارهای استفاده شده برای غله گندم، تیمار حاوی۱۰ درصد سبوس گندم با نسبت C/N=۱۸/۴۳، بیشترین سرعت رشد

خطی میسلیوم (۹/۶۶ میلی‌متر در روز) و تیمار حاوی ۶۰ درصد پوست ارزن با نسبت C/N=۲۳/۱۸ کمترین سرعت رشد (۵/۹۷ میلی‌متـر در روز) را نشان داد (شکل ۴).

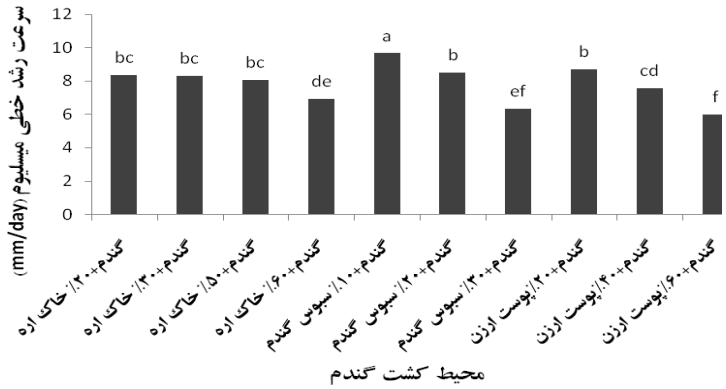


شکل۳- اثر متقابل دما و نوع محیط کشت بر سرعت رشد خطی میسلیوم قارچ گانودرما

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر نوع محیط کشت بر سرعت رشد میسلیوم در مرحله دوم آزمایش اسپاون

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
محیط کشت گندم	۹	۵/۱۷۲**
خطا	۳۰	۰/۱۶۹
ضریب تغییرات (٪)		۵/۲۵
محیط کشت جو	۹	۶/۲۸۲**
خطا	۳۰	۰/۲۳۰
ضریب تغییرات (٪)		۶/۱۵
محیط کشت ارزن	۶	۲/۴۲۹**
خطا	۲۱	۰/۲۲۵
ضریب تغییرات (٪)		۶/۰۲

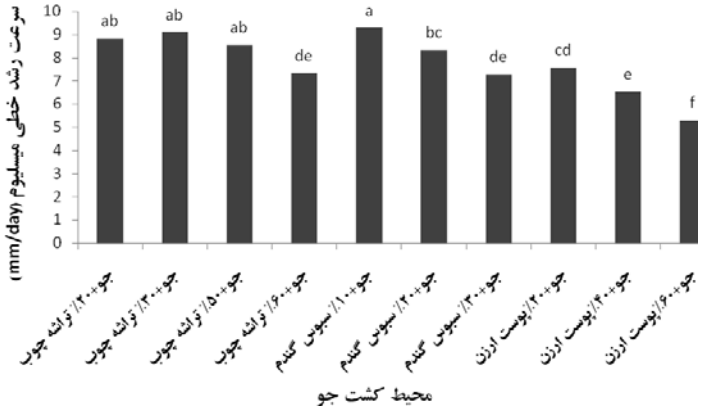
**- معنی دار در سطح احتمال یک درصد.



شکل٤- تأثیر تیمارهای مختلف بر سرعت رشد خطی میسلیوم در محیط کشت گندم

جدول۳- نسبت کربن به نیتروژن در تیمارهای مختلف اسپاون غلات

تیمار	گندم	جو	ارزن	تراشه چوب
بدون تیمار	۱۸/۴	۲۸	۳۱/۹	۱۳۹
تراشه چوب ۲۰٪	۴۲/۵	۵۰/۲	۵۳/۳	
تراشه چوب ۳۰٪	۵۴/۶	۶۱/۳	۶۴	
تراشه چوب ۵۰٪	۷۸/۷	۴۸/۸	۸۵/۴	
تراشه چوب ۶۰٪	۹۰/۸	۹۴/۶	۹۶/۱	
سبوس گندم ۱۰٪	۱۸/۴	۲۷/۱	۳۰/۶	
سبوس گندم ۲۰٪	۱۸/۴	۲۶/۱	۳۹/۲	
سبوس گندم ۳۰٪	۱۸/۵	۲۵/۲	۲۷/۹	
پوست ارزن ۲۰٪	۲۰	۲۷/۷	–	
پوست ارزن ۴۰٪	۲۱/۶	۲۷/۳	–	
پوست ارزن ۶۰٪	۲۳/۲	۲۷	–	



شکل۵- تأثیر تیمارهای مختلف بر سرعت رشد خطی میسلیوم در محیط کشت جو

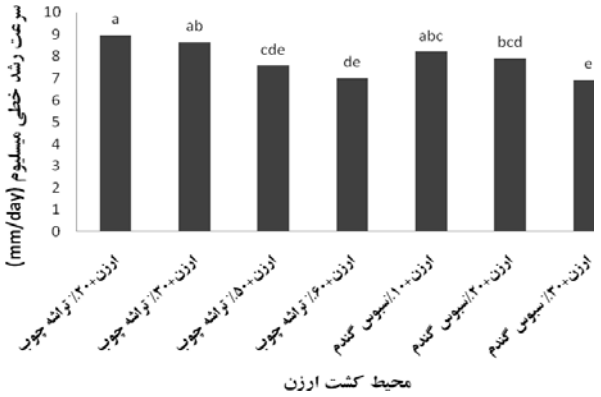
در بین تیمارهای غله جو نیز مانند گندم، تیمار ۱۰ درصد سبوس گندم با نسبت C/N=۲۷/۰۶ و سرعت رشد میسلیوم ۹/۲۷ میلی‌متر در روز بیشترین، و تیمار ۶۰ درصد پوست ارزن با نسبت C/N=۲۷/۰۲ و سرعت رشد ۵/۳ میلی‌متر در روز، کمترین سرعت رشد را داشتند (شکل ۵). کاهش و افزایش سرعت رشد در تیمارهای بکار برده شده در دو غله گندم و جو مشابه بود. در مجموع اضافه کردن پوست ارزن نسبت به تراشه نراد باعث کاهش بیشتری در رشد میسلیوم شد، به طوری که با افزودن ۲۰، ۴۰ و ۶۰ درصد پوست ارزن، سرعت رشد به ترتیب به ۷/۵۷، ۶/۵۲ و ۵/۲۹ میلی‌متر در روز کاهش یافت.

در بین تیمارهای تقویت کننده برای غله ارزن، تیمار ۲۰ درصد تراشه چوب نراد میسلیوم بیشترین سرعت رشد (۸/۹۶ میلی‌متر در روز) و تیمار ۳۰ درصد سبوس گندم کمترین سرعت رشد (۶/۹۲ میلی‌متر در روز) را نشان دادند (شکل ۶).

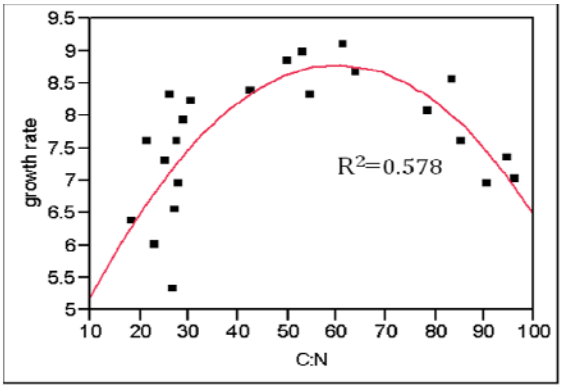
با مقایسه رابطه نسبت C/N و سرعت رشد میسلیوم در تیمارهای مختلف مشاهده می گردد که با افزایش نسبت تا حد ۶۱/۳ سرعت رشد افزایش نشان داده اما بعد از آن افزایش بیشتر نسبت C/N باعث کاهش سرعت رشد میسلیوم می شود (شکل ۷).

بررسی رشد میسلیوم در آزمایش اسپاون خاکاره

نتایج آنالیز واریانس جدول ۴ نشان می دهد که نوع محیط کشت بر رشد خطی میسلیوم این قارچ تأثیر معنی دار داشته است ($p\leq$۰/۰۱). خاکاره اقاقیا با نسبت کربن به نیتروژن ۲۵/۸۴، بیشترین سرعت رشد میسلیوم (۹/۳۶ میلی‌متر در روز) و خاکاره راش با نسبت کربن به نیتروژن ۵۷۰/۰۹، کمترین سرعت رشد (۳/۹۶ میلی‌متر در روز) را نشان دادند (شکل ۸). بین خاکاره‌های اقاقیا، افرا و عرعر اختلاف معنی دار مشاهده نشد. با افزایش نسبت C/N سرعت رشد خطی میسلیوم قارچ گانودرما کاهش می‌یابد (شکل ۸). نسبت C/N خاک اره‌های راش، سپیدار، توسکا، چنار، عرعر، افرا و اقاقیا به ترتیب ۵۷۰/۰۹، ۳۴۲/۷۶، ۳۰۳/۲۴، ۱۱۷/۱۵، ۴۷/۹۷، ۴۷/۸۹ و ۲۵/۸۴ و سرعت رشد میسلیوم به ترتیب برابر با ۳/۹۶، ۵/۴۲، ۵/۷۸، ۶/۶۹، ۸/۲۷، ۸/۷۸ و ۹/۳۶ میلی‌متر در روز بدست آمد.



شکل٦- تأثیر تیمارهای مختلف بر سرعت رشد خطی میسلیوم در محیط کشت ارزن

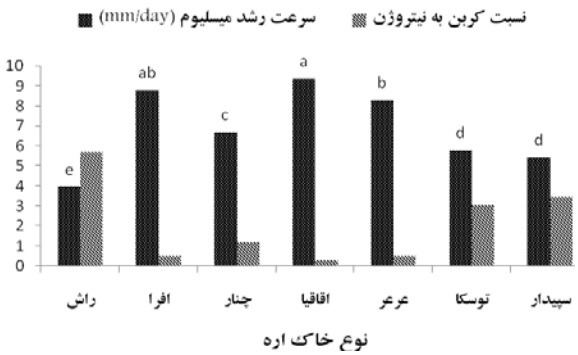


شکل۷- رابطه بین نسبت C:N و سرعت رشد میسلیوم (میلی متر در روز) در بخش دوم اسپاون غلات

جدول٤- تجزیه واریانس تأثیر خاک‌اره‌های مختلف روی رشد خطی میسلیوم قارچ گانودرما

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین تغییرات
محیط کشت	۶	۱۵/۷۲۱**
خطا	۲۱	۰/۲۲۶
ضریب تغییرات (٪)		۶/۹۰

** – معنی دار در سطح احتمال یک درصد



شکل۸- رابطه بین نسبت C:N و سرعت رشد میسلیوم قارچ گانودرما در بسترهای خاک اره (مقادیر مربوط به نسبت کربن به نیتروژن به عدد ۱۰۰ تقسیم شده است)

بحث

با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق، بهترین دما جهت رشد بهینه میسلیوم قارچ گانودرما، دمای ۲۹±۱ °C و مناسب ترین غله محیط کشت، گندم توصیه می‌شود. اکثر محققین قارچ گانودرما نیز در دنیا از گندم به عنوان اسپاون تجاری استفاده می‌کنند (۸). نتایج بخش دوم آزمایشات حاکی از آن است که اضافه کردن حاوی۱۰ درصد سبوس گندم به بستر غله گندم سبوس گندم باعث افزایش چشمگیری در سرعت رشد خطی میسلیوم (۹/۶۶ میلی‌متر در روز) گردید افزودن پوست ارزن در نسبت بالای ۶۰ درصد به بستر غله جو، کمترین سرعت رشد (۵/۲۹ میلی‌متر در روز) را حاصل نمود و این نتایج با یافته‌های ارکل (۹) مبنی بر اینکه سبوس گندم با دارا بودن نیتروژن قابل توجه، باعث بهبود رشد این قارچ می‌شود مطابقت دارد. همچنین با افزایش درصد سبوس گندم به ۲۰ و ۳۰، سرعت رشد کاهش یافت. طی گزارشی رینسانکا (۲۰) اعلام کرد که حضور بیش از حد سبوس برنج در بستر رشدی قارچ *Grifola frondosa* باعث کاهش تولید میوه و رشد میسلیوم می‌گردد. در تحقیقی دیگر للی و جانسن (۱۶) نیز عنوان کردند که حضور بیش از حد نیتروژن باعث مرگ میسلیوم می‌شود. با افزایش درصد تراشه چوب نیز سرعت رشد میسلیوم کاهش می‌یابد. اضافه کردن تراشه چوب باعث افزایش نسبت C/N یا به عبارت دیگر باعث کاهش میزان نیتروژن کل می‌گردد. با مقایسه بین سرعت رشد میسلیوم و نسبت C/N محیط کشت‌های مختلف مشاخص گردید که با افزایش این نسبت تا حد ۶۱/۳ سرعت رشد افزایش نشان داده اما بعد از آن افزایش بیشتر نسبت C/N باعث کاهش سرعت رشد میسلیوم شد. در بین خاکاره های بکار برده شده در این تحقیق، خاکاره اقاقیا بهترین ماده زمینه‌ای برای رشد بهینه این قارچ بود. نسبت C/N پایین و یا به عبارت دیگر، بالا بودن درصد نیتروژن در این خاکاره دلیل اصلی افزایش سرعت رشد میسلیوم می‌باشد.این نتیجه با یافته‌های سی و همکاران (۲۰۰۶) و همچنین چانگ (۴) مبنی بر اینکه حضور نیتروژن به رشد میسلیوم قارچ گانودرما کمک می کند، مطابقت دارد.

محققین از مواد مختلفی به عنوان بستر و یا مکمل قارچ گانودرما بهره جسته اند. گنزالز و همکاران (۱۱) گزارش دادند که پوست بذر آفتابگردان می‌تواند به عنوان منبع اصلی انرژی و مواد غذایی استفاده شود و ۵ درصد عصاره مالت رشد میسلیوم این قارچ را افزایش می‌دهد. در تحقیقی دیگر، از تفاله چای به عنوان مکمل بستر خاکاره در تولید میوه قارچ گانودرما استفاده شد و نتایج نشان داد که تفاله چای با تأمین محیط اسیدی، باعث افزایش عملکرد و کفایت بیولوژیکی این قارچ می گردد (۱۸). با توجه به اینکه میانگین سرعت رشد بدست آمده در این تحقیق نسبت به تحقیقات صورت گرفته توسط دیگر محققین (۱۳)، بیشتر بود، می‌توان نتیجه گرفت که برخی ضایعات کشاورزی و جنگلی، مکمل مناسبی برای تولید اسپاون غلات بوده و حتی پتانسیل آن را دارند که جایگزین این مواد گردند.

قدردانی

از خانم مهندس شادی شاه طهماسبی، عضو گروه زیست فناوری قارچ‌های صنعتی جهاد دانشگاهی واحد مشهد، به خاطر مساعدت‌هایی که داشته اند سپاسگزاری می شود.

منابع

1- Adejumo, T. O. and B. O. Awonsnya. 2005. Proximate and mineral composition of edible mushroom species from southwestern Nigeria. Afri. J. Biotech. 4(10):1084-1087.
2- Anon. 2006. Resins. Online at: http://www.resins-wikipedia, the free encyclopedia (accessed 7 June 2006), 01: 18.
3- Anon. 2007. Mushrooms may be active against fowl parasite. Thisday, 11(4280): 9 -36.
4- Chang, S. T. 1995. *Ganoderma* -The leadr production and technology of mushroom nutriceuticals. In Proc 6th Int Symp Recent Adv *Ganoderma lucidum* research.(ed. B. K. Kim. H. I. Kim and Y.S. Kim), pp. 43-52. The pharmaceutical Society of Korea, Seoul, Korea.
5- Chen, A. W. 2004. Growing *Ganoderma* Mushroom. Mushroom Growers Handbook 1. MushWorld-Heineart Inc. Haeng-oon Bldg. 150-5 Pyungchang-dong, Jongno-gu. Part III Chapter 11. Seul Korea pp110-849.
6- Chen, H. M. 1998. Reutilization of waste materials from a rice distillery for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. M.Sc. thesis, Tunghai University, Taiwan.
7- Chen, A. W. and P. G. Miles. 1996. Cultivation of *Ganoderma* bonsai. In Proc. 2nd Int. Conf. Mush. Biol. Mush. Prod. (ed. D. J. Royse), University Park, Pennsylvania.
8- Erkel, E. 2009a. Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate sources. African Journal of Agricultural Research. 4 (11): pp. 1331-1333.
9- Erkel, E. 2009b. The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Journal of Food, Agriculture & Environment .7 (3&4): pp. 8 4 1-8 4 4 .
10- Gao, Y., S. H. Zhou, G. Chen, X. Dai, and J. Ye. 2002. A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) P.

Karst. Extract (ganopoly) in patients with advanced cancer. Int. J. Med. Mushrooms, 4 (3): 207–214.
11- Gonzalez-Matute, R., D. Figlas, R. Devalis, S. Delmastro, and N. Curvetto. 2002. Sunflower seed hulls as a main nutrient source for cultivating *Ganoderma lucidum*. Micologia Aplicada Int, 14:19–24.
12- Hsieh, C., M. H. Tseng, and C. J. Liu. 2006. Production of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (CCRC 36041) under limitations of nutrients. Enzyme and Microbial Technology, 38 :109–117.
13- Hsieh, C. and F. Yang. 2004. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. Bioresour Technol, 91:105–109.
14- Huie, C. W., and X. Di. 2004. Chromatographic and electrophoretic methods for Lingzhi pharmacologically active components. J. Chromatogr. B 812: 241–257.
15- kananen, D. L. and J. K. McDaniel. 2000. Speciality Mushroom Spawn. United States patent, Paten numner, 6:041,544.
16- Lelley, J. I. and A. Janssen. 1993. Productivity improvement of oyster mushroom substrate with a controlled release of nutrient. Mushroom News. 41:6–1324.
17- Oghenekaro, A. O., J. A. Okhuoya, and E. O. Akpaja. 2008. Growth of *Pleurotus tuberregium* (Fr) Singer on some heavy metal-supplemented substrates. African Journal of Microbiology Research, (2): 268-271.
18- Ooi, L. S. M., V. E. C. Ooi, and M. C. Fung. 2002. Induction of gene expression of immunomodulatory cytokines in the mouse by a polysaccharide from *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (*aphyllophoromycetideae*). Int. J. Med. Mush, 4: 27–35.
19- Peksen, A. and G. Yakupoglu. 2009. Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. World J.Microbiol. Biotechnol, 25:611-618.
20- Rinsanka, T. 1980. Cultivation Technique of Edible Fungus, "*Grifola frondosa*" (Fr.) S.F. Gray (Maitake no Saibaiho). Journal of the Hokkaido Forest Products Research Institute, 13-14.
21- Sasaki, T., Y. Arai, T. Ikekawa, G. Chihara, and F. Fukuoka. 1971. Antitumor polysaccharides from some polyporaceae, *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat and Phellinus linteus (Berk. et Curt) Aoshima. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 19: 821–826.
22- Shiao, M. S, K. R. Lee, L. J. Lin, and C. T. Wang. 1994. Natural products and biological activities of the Chinese medical fungus, *Ganoderma lucidum*. In: Ho CT, Osawa T, Huang MT, Rosen RT, editors. Food phytochemicals for cancer prevention. II. Teas, spices, and herbs. Washington, DC: American Chemical Society, p: 342–54.
23- Sliva, D. 2006. *Ganoderma lucidum* in cancer research. Leuk. Res, 30: 767–768.
24- Stamets, P. and J. S. Chilton. 1983. Mushroom Cultivator: A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home. Agarikon Press, Washington.
25- Stanley, G., K. Harvey, V. Slivova, J. Jiang, D. Sliva. 2005. *Ganoderma lucidum* suppresses angiogenesis through the inhibition of secretion of VEGF and TGF-b1 from prostate cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun, 330: 46–52
26- Training Manual on Mushroom Cultivation Technology. Asian and pacific centre for agricultural engineeging and machinery (APCAEM). A-7/F china international science and technology convention centre. NO. 12, YUMIN ROAD, CHAOYANG DISTRICT, BEIJING 100029, P.R. CHINA. www.unapcaem.org.
27- Volk, T. J. and T. J. Leonard. 1989. Physiological and Environmental Studies of Sclerotium Formation and Maturation in Isolates of "*Morchella crassipes*". Applied and Environmental Microbiology, 55: 3095-3100.
28- Wagner, R., D. A. Mitchell, G. L. Sassaki, M. A. L. A. Amazonas, and M. Berovic. 2003. Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the Production of bimass, ganoderic asid and polysaccharides. Food. Technol. Biotechnol, 41(4): 371-382.
29- Walkley, A. and I. A. Black. 1934. An Examination of Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. Soil Sci, 37:29-37.
30- Yun, T. K. 1999. Update from Asia: Asian studies on cancer chemoprevention. Ann N Y Acad Sci, 889:157-192.