Journal of Horticultural Science
Vol. 24, No. 2, Fall- Winter 2010-2011, P. 265-275
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۲، نیمسال دوم ۱۳۸۹ ، ص. ۲۷۵-۲۶۵
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

بررسی نقش قارچ‌های گرمادوست در کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید

محمد فارسی[۱*] - پریسا طاهری[۲] - اسدا... کردیانی[۳]

تاریخ دریافت:۸۹/۵/۱۱
تاریخ پذیرش:۸۹/۱۰/۷

چکیده

در فرایند کمپوست‌سازی برای قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید علاوه بر اینکه واکنش‌های شیمیایی ترکیبات پیچیده موجود در کاه و کلش را به ترکیبات ساده و قابل جذب برای قارچ خوراکی و میکروارگانیسم‌های گرمادوست تبدیل می‌کنند، میکروارگانیسم‌های گرمادوست معینی شامل آکتینومیست‌ها، قارچ‌های گرمادوست و باکتری‌های گرمادوست یک محیط انتخابی برای رشد میسلیوم قارچ تولید می‌نمایند. میکروارگانیسم‌های گرمادوست، ازت و مواد معدنی را در طی فرآیند کمپوست‌سازی در خود انباشته کرده و در نهایت بیوماس میکروبی آنها به عنوان منبع غذایی به مصرف قارچ دکمه‌ای خوراکی (*Agaricus bisporus*) می‌رسد. این پژوهش به منظور شناسایی قارچ‌های گرمادوست مؤثر در بهبود رشد میسلیوم این قارچ انجام شد. برای این منظور قارچ‌های گرمادوست از کمپوست جداسازی و توسط مارکرهای ITS1، ITS4 و 5/8S rDNA شناسایی شدند. سپس اثر آنها بر تسریع و تحریک رشد میسلیوم قارچ *A. bisporus* مورد بررسی قرار گرفت. قارچ های گرمادوست شناسایی شده، ایزوله‌های تیپ ۲ *Scytalidium thermophilum* بودند. حضور این قارچها در محیط کشت باعث چند برابر شدن رشد میسلیوم *A. bisporus* شد. مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که میسلیوم قارچ خوراکی از میسلیوم های قارچ *S. thermophilum.* تغذیه می‌کند. فراهم نمودن ترکیبات و شرایط محیطی کمپوست برای رشد بهینه این قارچ، به طور مؤثری باعث افزایش عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای خواهد شد.

واژه های کلیدی: کمپوست‌سازی، بیوماس میکروبی *Agaricus bisporus* ، ITS1، ITS4، *Scytalidium thermophilum*

مقدمه

فرایند کمپوست‌سازی در قارچ خوراکی دکمه ای سفید شامل دو مرحله میباشد. در مرحله اول واکنش های شیمیایی رخ می‌دهند و ترکیبات پیچیده موجود در کاه و کلش به ترکیبات ساده و قابل جذب برای قارچ خوراکی و میکروارگنیسم‌های گرمادوست تبدیل می‌شود. در مرحله دوم تجزیه میکروبی مواد آلی و سنتز پروتئین‌های میکروبی رخ می دهد. در این مرحله، میکروارگانیسم‌های گرمادوست معینی شامل آکتینومیست‌ها، قارچ‌های گرمادوست و باکتری‌های گرمادوست یک محیط مطلوب برای رشد میسلیوم قارچ تولید می‌کنند و در عین حال سوبسترای نامناسبی برای ارگانیسم‌های رقابت‌کننده بوجود می آورند. در واقع هدف اصلی کمپوست‌سازی آماده کردن یک محیط غذایی است که رشد میسلیوم قارچ را تقویت نموده و از رشد سایر ارگانیسم‌ها ممانعت نماید (۲و۲۶).

در طی آماده‌سازی کمپوست، میکروارگانیسم‌ها حدود ۴۰ درصد از ماده خشک کمپوست را تجزیه نموده و صرف تکثیر خود می نمایند. از آنجایی که میکروارگانیسم‌ها مواد معدنی را در حین کمپوست‌سازی در خود جمع می‌کنند، بیوماس میکروبی یک منبع خوب از نیتروژن و مواد معدنی برای رشد قارچ محسوب می‌شود (۶). یکی از خصوصیات مهم کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای، انتخابی بودن آن است، به طوریکه برای قارچ دکمه‌ای مفید و برای قارچ‌های رقیب مضر باشد. بخشی از انتخابی بودن کمپوست به جنبه‌های میکروبی و بخش دیگر به جنبه‌های شیمیایی آن مربوط می‌شود. قارچ‌های گرمادوست نقش حیاتی در انتخابی کردن کمپوست تولید شده برای رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای ایفاء می‌کنند (۱۰).

استانک (۱۹) دریافت که رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای روی محیط کشتی که با *Pseudomonas* sp. و *Streptomyces* sp. به صورت مخلوط تلقیح شده باشند، رضایت بخش است. در حالی‌که با یک گونه به تنهایی، این نتیجه به دست نمی‌آید. رنارد و کایلوکس (۱۳) گزارش کردند که روی کمپوستی که با *Scytalidium thermophilum* و

۱و ۳- به ترتیب استاد و دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email:mohfarsi@yahoo.com)
۲- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

Archive of SID
www.SID.ir

Humicola grisea تیمار شده بود قارچ خوراکی دکمه‌ای رشد بهتری نشان داد. رز و هاریس (۱۴) گزارش کردند که آماده‌سازی کمپوست با مخلوطی از نیتروژن آلی و تلقیح با اسپور قارچهای گرمادوست *H. grisea* و *S. thermophilum* ، فرآیند کمپوست‌سازی را تسریع می‌کند. قارچ گرمادوست *S. thermophilum* به طور شدید باعث تحریک رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای در محیط این ویترو می‌شود (۲۱و۲۳). استراتسما و همکاران (۲۵) ۲۲ گونه قارچ گرمادوست را از کمپوست قارچ خوراکی جداسازی کردند وگزارش دادند که ۹ جنس مختلف باعث بهبود رشد قارچ خوراکی می‌شود. با ادامه آزمایشهای بیشتر، فقط دو جنس یعنی *S. thermophilum* و *Myriococcom thermophilum* باعث بهبود رشد *Agaricus bisporus* شدند، محصول قارچ خوراکی دکمه‌ای از کمپوستی که با این قارچها تلقیح شده بودند تقریباً دو برابر شاهد پاستوریزه بود. قارچهای دیگر مانند *S. thermophilum*، *H. grisea* و *H. insolens* به عنوان جمعیت غالب کمپوست به دفعات از کمپوست جداسازی شده اند (۱۸). پاکدین و همکاران (۱) نشان دادند که نژادهای بخصوصی از آکتینومایستها باعث ترغیب رشد قارچ خوراکی می شود.

حذف آمونیوم و انتخابی شدن بستر کشت (کمپوست) با حضور قارچ گرمادوست *S. thermophilum* (ترولا ترموفیلا، *H. grisea*) مرتبط است (۱۴). یک رابطه مثبت میان تراکم این قارچ گرمادوست در کمپوست و عملکرد قارچ خوراکی یافت شده است که تعیین کننده بهبود راندمان کمپوست و عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای می‌باشد (۲۲). علاوه بر این، *S. thermophilum* میزان رشد میسلیوم قارچ خوراکی را در محیط این‌ویترو به شدت تقویت می‌کند (۲۱و۲۳). بهبود فرایند تهیهٔ کمپوست‌سازی برای پرورش قارچ خوراکی دکمه ای سفید با بهینه کردن ترکیب فلور میکروبی کمپوست می‌تواند عملکرد قارچ را افزایش دهد (۵).

قارچهای گرمادوست در دمای ۴۸ تا ۵۲ °C بهترین رشد را دارند. در دمای بالای ۶۰ °C رشد میسلیوم قارچهای گرمادوست کاهش یافته و این میسلیوم‌ها به عنوان اسپورهای مقاوم به گرما بقاء می‌یابند. رشد بیشتر قارچهای گرمادوست در محیطهای حاوی منابع سهل‌الوصول کربن و نیتروژن و تعداد کمی از نمک‌های معدنی اتفاق می‌افتد. این قارچها نیازهای غذایی ساده‌ای دارند، بطوریکه بعضی از جنس‌ها در محیطهای کشت سنتزی که ترکیب آن شامل گلوکز (به عنوان منبع کربن)، فسفات آمونیوم، اوره یا آسپاراژین (به عنوان منبع نیتروژن)، سولفات منیزیم (به عنوان منبع سولفور)، فسفات (به عنوان منبع فسفر و بافر) و عناصر کم‌مصرف می‌باشد رشد می‌کنند (۷).

شناسایی قارچهای گرمادوست ترغیب کننده رشد میسلیوم قارچ خوراکی با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی عمومی و ویژگی‌های فوق ساختاری، امکان پذیر نمی‌باشد (۴). تکنولوژی توالی‌یابی اسید نوکلوئیک چشم‌انداز جالبی برای مطالعات تاکسونومی این قارچها مهیا کرده است. مطالعات مقایسه‌ای از توالی‌های rDNA به منظور بررسی روابط فیلوژنی در محدوده وسیعی از سطوح تاکسونومی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰). این ارزیابی با توسعه پرایمرهای عمومی ITS امکان‌پذیر شد ه است (۱۸). نواحی ITS و فواصل داخل ژنی DNA ریبوزومی هسته‌ای، واحدهای تکراری تکامل یافته ثابت می‌باشند و ممکن است در بین گونه‌های داخل یک جنس یا در بین افراد یک جمعیت متغیر باشند. مقایسه توالی نواحی ITS به طور وسیعی در تاکسونومی و فیلوژنی مولکولی به کار برده می‌شود، به دلیل اینکه دارای کپی‌های زیادی از ژن‌های rRNA می‌باشد (حتی با مقدار کم DNA تکثیر آن به آسانی قابل انجام است) و دارای درجه بالایی از تغییر حتی در بین جنس‌های نزدیک وابسته به هم می‌باشد. پرایمرهای عمومی ITS1 و ITS4 برای تکثیر نواحی فواصل ترجمه شده درونی DNA ریبوزومی که ژن ۵/۸S را از دو انتها در برگرفته به کار می‌روند. پرایمرهای ITS، (با استفاده از نواحی محافظت شده ۱۸S، ۵/۸S و ۲۸S ژن RNA ریبوزومی)، تکثیر نواحی غیر کدکننده بین آنها را ممکن ساخته است. با استفاده از توالی‌های DNA، اختلاف بین جنس‌ها و حتی اختلاف بین ایزوله‌های یک جنس خاص، مشخص می‌شوند (۱۱).

در صورتی که نژاد های قارچ ها و باکتری‌های گرمادوست در کمپوست که نقش موثرتری در تغذیه و رشد میسلیوم قارچ خوراکی دارند شناسایی شوند و کمپوست پس از تجزیه شیمیایی با این ایزوله های خاص تلقیح گردد، عملکرد قارچ خوراکی به ازاءِ هر واحد کمپوست افزایش چشمگیری خواهد یافت. این کار علاوه بر اینکه از هدر رفتن مواد اولیه توسط میکروارگانیسم های دیگر جلوگیری می‌کند. کمپوست انتخابیتر شده و شانس آلودگی توسط پاتوژن ها کمتر می‌گردد. این پژوهش به منظور شناسایی قارچهای گرمادوست موثر در بهبود رشد میسلیوم قارچ *A. bisporus* و نحوه اثر آنها از نظر محرک بودن و یا تغذیه نمودن این قارچ انجام شد. همانطور که در بررسی منابع ذکر شد تا به حال چند گزارش مبنی بر اثر تحریک‌کنندگی قارچهای گرما دوست ارائه شده است، اما تا به حال کسی به اثر تغذیه آن اشاره نکرده است. در صورت اثبات نقش تغذیه‌ای قارچهای گرمادوست، بایستی تلاش‌ها معطوف به افزایش تراکم نژادهای ویژه ای از قارچهای گرمادوست در کمپوست شود که میسلیوم قارچ خوراکی را تغذیه می‌کنند. در حالیه اگر فقط نقش تحریک‌کنندگی داشته باشند، فقط آستانه تراکم تحریک‌کنندگی بایستی فراهم شود و بقیه تلاش‌ها بایستی صرف تغییرات دیگر در کمپوست گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش ها

جداسازی قارچهای گرمادوست

نمونه‌های کمپوست (۲) استفاده شده در این تحقیق، از مرکز تحقیقات قارچهای خوراکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و کارخانه‌های صنعتی تولید قارچ خوراکی در مشهد (پویاپاژ، خوراک طلایی و سایه رس) تهیه شد. نمونه‌ها از مراحل مختلف تهیه کمپوست (فاز ۱ و فاز ۲) گرفته شدند. قارچهای گرمادوست بر اساس محیطهای استاندارد قارچشناسی جداسازی شدند.

برای جداسازی ایزوله‌ها قطعات کوچکی از کمپوست (۱ تا۲ سانتی‌متری) روی محیط کشت مخمر- گلوکز آگار (Yeast-Glucose Agar) YGA آنتی‌بیوتیک دار (عصاره مخمر ۵ گرم، گلوکز۱۰ گرم، آگار ۲۰ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۵۰ میکروگرم) در پتری‌دیش ۸ سانتی‌متری کشت شدند. سپس پتری‌ها در دمای ۴۵°C انکوبه شدند و بعد از گذشت ۳ روز، برای وجود قارچ گرمادوست کنترل شدند.

شناسایی قارچهای گرمادوست

برای شناسایی قارچهای گرمادوست همه ایزوله‌ها در محیط کشت مایع متحرک رشد داده شدند. حجم هر محیط کشت ۱۰۰ میلی‌لیتر (در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری) بود. ترکیب محیط کشت مایع شامل گلوکز یک گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم ($MgSO_4$)، کلرید کلسیم ۰/۲ گرم، عصاره مخمر ۰/۱ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر. یک میلی‌لیتر هم از استوک عناصر کم‌مصرف (شامل سولفات آهن ۷ آبه ($FeSO_4 .7 H_2O$) ۲۶ میلی‌گرم، سولفات مس ۵ آبه ($CuSO_4 .5 H_2O$) ۴ میلی‌گرم، سولفات روی ۷ آبه ($ZnSO_4 .7H_2O$) ۲۲ میلی‌گرم، سولفات منگنز ۴ آبه ($MnSO_4 .4H_2O$) ۲ میلی‌گرم). این مواد را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمودیم. بعد از گذشت ۱۰ روز از رشد (دمای ۴۵°C، در داخل انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه) بیوماس بر روی کاغذ صافی استریل منتقل و با پمپ خلاء آب‌گیری شد. سپس بیوماس به روی فویل آلومینیومی استریل منتقل شد و به مدت ۲۰ دقیقه در داخل تانک ازت مایع قرار داده شد. سپس به داخل هاون استریل منتقل گردید و به وسیله نیتروژن مایع به آرامی پودر گردید. نمونه‌های پودر شده را به فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۵ ساعت توسط دستگاه خشک انجماد (Freeze dried)، خشک شدند سپس نمونه‌ها در دمای ۷۰°C- برای انجام آنالیزهای بعدی نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی قارچ به روش CTAB انجام شد (۲۷). برای تعیین توالی ژن ۵/۸S rRNA مقدار ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه برای آنالیز تعیین توالی فرستاده شد. از نژاد هیبرید تجارتی قارچ خوراکی دکمه‌ای به نام ۷۳۷ هلند برای بررسی میزان رشد میسلیوم قارچ استفاده شد. با استفاده از پرایمرهای مخصوص ناحیه S ۵/۸rRNA توسط دستگاه ترموسایکلر تکثیر گردید (۱۰).

تلقیح کمپوست با قارچهای گرمادوست و بررسی میزان رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای

کمپوست به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱°C در دو روز متوالی استریل شد. بعد از استریلیزاسیون به مقدار وزن ازدست رفته آب استریل به مواد اضافه شد. کمپوست استریل شده به مدت ۳ تا ۵ روز در محدوده دمایی ۴۵ تا ۵۲°C با قارچهای گرمادوست مورد نظر تلقیح گردید. سپس دمای کمپوست به ۲۴°C کاهش داده شد. برای تعیین میزان رشد میسلیوم قارچ در کمپوست از لوله‌های آزمایش (طول ۲۰ سانتی‌متر و قطر ۲/۵ سانتی‌متر) استفاده شد. در این لوله‌ها کمپوست ریخته شد (میانگین وزنی لوله‌ها ۸۶ گرم) و ۲۵ عدد اسپاون قارچ خوراکی دکمه‌ای در ته هر لوله قرار داده شد و در دمای ۲۴°C نگهداری شدند. در مدت ۲۳ روز میزان رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای روی محیط کمپوست تلقیح شده با قارچهای گرمادوست مورد نظر روزانه اندازه گیری شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار JMP4 و بر اساس طرح کاملاً تصادفی نامتعادل صورت گرفت و میانگین ها به روش چند دامنه ای دانکن مقایسه شدند.

اثرمتقابل بین قارچ خوراکی دکمه‌ای و قارچهای جدا شده

برای بررسی اثر متقابل بین قارچ خوراکی دکمه‌ای و قارچهای گرمادوست جداسازی شده از کمپوست از محیط کشت عصاره کمپوست - گلوکز آگار غنی شده با CYM استفاده گردید. ۳۰۰ گرم کمپوست پاستوریزه شده در دمای۱۰۵°C به مدت ۴۸ ساعت خشک شد. کمپوست خشک شده با استفاده از آسیاب برقی پودر شد. کمپوست پودر شده حاصل به مدت یک ساعت در یک لیتر آب جوش با حرارت ملایم جوشانده شد. عصاره کمپوست از پارچه عبور داده شد، سپس در ۸۰۰۰ rpm به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ گردید. عصاره بدست آمده در دمای۴°C نگهداری شد.

تهیه محیط کشت

برای تهیه یک لیتر محیط کشت عصاره کمپوست - گلوکز آگار غنی شده با CYM، ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت (5X) CYM به ۲۰۰ میلی‌لیتر عصاره کمپوست اضافه شده و با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای تهیه محیط کشت جامد ۱۵ گرم آگار به محیط افزوده شد. محیط کشت در دمای ۱۲۱°C به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید.

پس از سرد شدن محیط کشت، در پتری‌دیش‌ها توزیع و با قارچهای گرمادوست مورد نظرتلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت پتری‌ها

Archive of SID

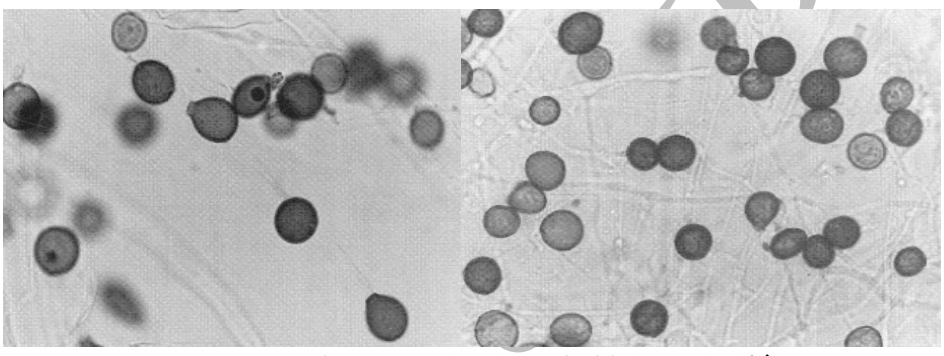
www.SID.ir

را در دمای ۴۵°C نگه داری گردید. پس از این مدت این پتری‌ها با اسپاون قارچ خوراکی تلقیح (فاصله دو قارچ از یکدیگر حدود یک سانتی‌متر بود) و در دمای ۲۴°C نگهداری شدند. رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای به طور روزانه اندازه‌گیری و برای انجام محاسبات بعدی یادداشت گردید.

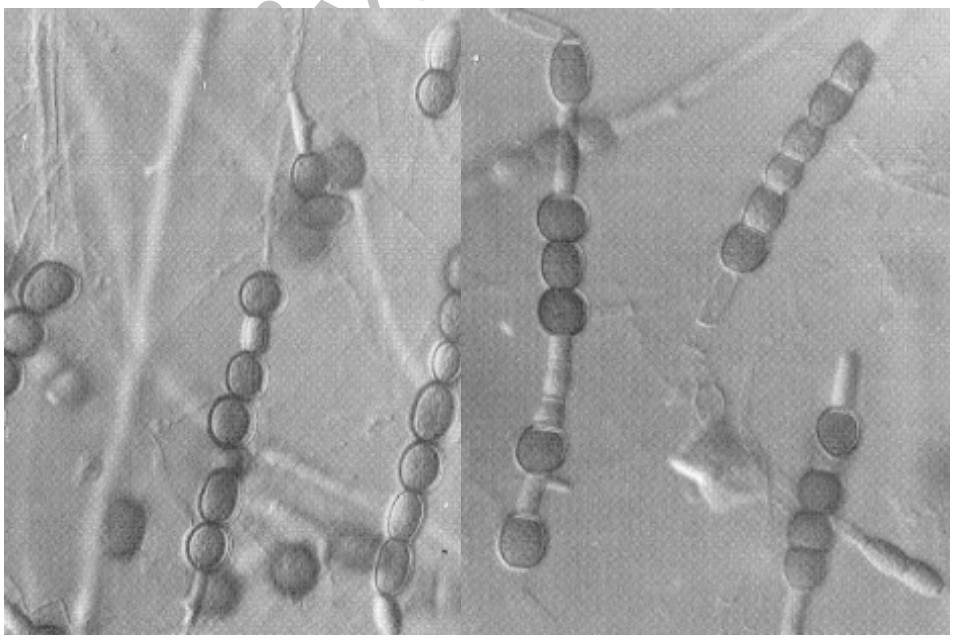
نتایج

بررسی‌های میکروسکوپی

کلونی‌ها *S. thermophilum* در دمای ۴۵°C رشد سریعی داشتند، و در مدت ۵ روز سطح پتری دیش ۹ سانتی‌متری را پر کردند. کلونی‌ها در ابتدا به رنگ سفید بودند و بعد از اندک زمانی تغییر رنگ داده و به رنگ خاکستری مایل به سیاه در آمدند. وقتی که کشت‌ها جوان بودند، لبه کلونی اکثر ایزوله‌ها چند جزئی بود، اما بعداً این لبه‌ها یکنواخت شدند. در اثر رشد سریع هیف‌های هوایی نسبت به هیف‌هایی که در سطح محیط کشت قرار می‌گیرند لبه کلونی‌ها رشد نامنظم پیدا می‌کردند. بعضی از ایزوله‌ها رشد سریع‌تری داشتند و کلونی‌هایشان دارای لبه‌های منظم بود (شکل ۱). کلونی‌های جوان اکثراً دارای رنگ سبز مایل به خاکستری تیره بودند، که بلافاصله در نتیجه اسپورزایی سیاه شدند. بیشتر ایزوله‌هایی که رشد سریع داشتند، دارای میسلیوم‌های سفید مایل به خاکستری روشن (به ویژه این حالت در حاشیه‌های کلونی‌ها دیده می‌شود) بودند.



شکل ۱- تیپ ۱ دارای اسپورهای خیلی تیره و مجزا. H. grisea



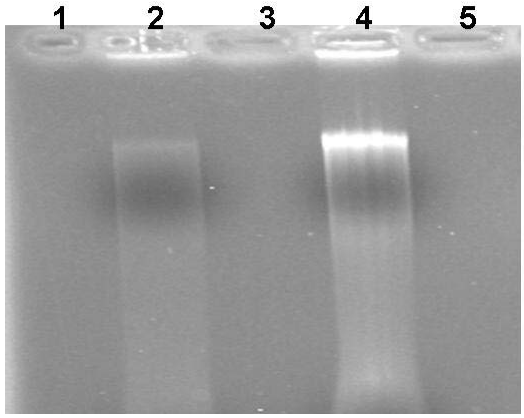
شکل ۲- تیپ ۲ دارای اینترکالاری. *S. thermophilum*

www.SID.ir

میسلیوم‌های غوطه‌ور در محیط کشت، به شکل زنجیره‌های با دیواره ضخیم و سلول‌های متورم تیره بودند. زنجیره‌ها به آسانی از هم جدا نمی‌شدند. سلول‌ها سیلندری شکل یا کروی بوده و غالباً دارای رنگ تیره بودند. از این سلول‌ها گاهی به عنوان کلامیدوسپور یا کلامیدوکنیدیوم یاد می‌شود، اما ترجیحاً به پیروی از هاگس (۸) این سلول‌ها کنیدیوم نامیده می شوند. اکثر ایزوله‌ها، تشکیل دیواره ضخیم، کروی تا بیضی شکل دادند. کنیدیوم‌ها به شکل کروی تا بیضوی، دارای ابعاد ۱۲- ۸ میکرومتر و دیواره صاف و ضخیم بودند. کنیدی‌ها به طور انفرادی با زنجیره‌های کوچک یا زنجیره‌های بزرگ دیده می‌شدند و در انتهای میسلیوم یا در وسط میسلیوم (اینترکالاری) تشکیل می‌دادند (شکل ۲).

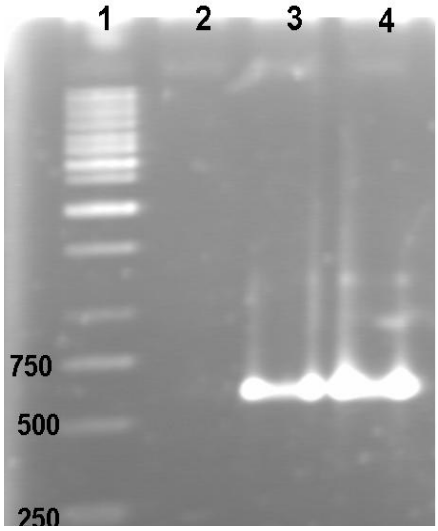
استخراج DNA ژنومی و تکثیر ژن ۵/۸S rRNA

بعد از استخراج DNA ژنومی به منظور اطمینان از نحوه صحیح استخراج، ۵ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز ۱ ٪ الکتروفورز شد. با رویت باندها مشخص شد که DNA سالم استخراج شده است (شکل۳).



شکل ۳- الکتروفورز DNA ژنومی، چاهک ۲ و ٤ DNA ژنومی، چاهک ۱، ۳ و ۵ فاقد DNA

به منظور اطمینان از اندازه صحیح ژن تکثیر شده، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ ٪ الکتروفورز شدند. رؤیت قطعه تکثیر شده ۵۵۰ جفت بازی نشان از تکثیر صحیح ژن بود (شکل ۴).



شکل٤- بررسی اندازه صحیح قطعات حاصل از الکتروفورز روی ژل آگارز، چاهک۱ سایز مارکر kb ۱، چاهک ۲ کنترل منفی، چاهک ۳ و ٤ قطعه تکثیر شد ۵۵۰ جفت بازی

نتایج تعیین توالی

طول قطعه تکثیر شده ۵۵۰ جفت باز بود که پس از BLAST کردن از نظر هومولوژی، ۱۰۰ در صد با توالی موجود از قارچ گرمادوست *S. thermophilum* مشابهت داشت.

بررسی میزان رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای در کمپوست تلقیح شده با ایزوله‌های تیپ ۲ قارچ *S. thermophilum*

بعد از گذشت چهار روز از مایه زنی، میسلیوم قارچ خوراکی شروع به رشد نمود. در مراحل اولیه، رشد میسلیوم در دیگر کمپوستها در مقایسه با کمپوست استریل نسبتاً کند بود، اما بعد از گذشت حدود ۱۲ روز، میزان رشد آنها از رشد میسلیوم در کمپوست استریل پیشی گرفت (شکل ۵). به نظر می‌رسد که این موضوع به دلیل توسعه و گسترش شبکه میسلیومی قارچ خوراکی دکمه‌ای باشد بدین نحو که با گذشت زمان سامانه آنزیمی قارچ خوراکی فعال شده و منجر به این می‌شود که غذای بیشتری را از بستر کشت دریافت کند.

در کمپوست‌هایی که با ایزوله‌های تیپ ۲ قارچ گرمادوست *S. thermophilum* تلقیح شده بودند و یا در کمپوستی که فقط پاستوریزه شده بود، نسبت به کمپوست استریل، در همه تکرارها (n = ۶) میسلیوم قارچ خوراکی تقریباً رشد منظم و یکسانی داشت و سرعت رشد آن به صورت خطی بود. به عبارت دیگر ایزوله‌های متعلق به تیپ ۲ که دارای زنجیره‌های انتهایی کوتاه و کنیدیوم‌های هوایی بودند باعث رشد منظم میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای گردیدند

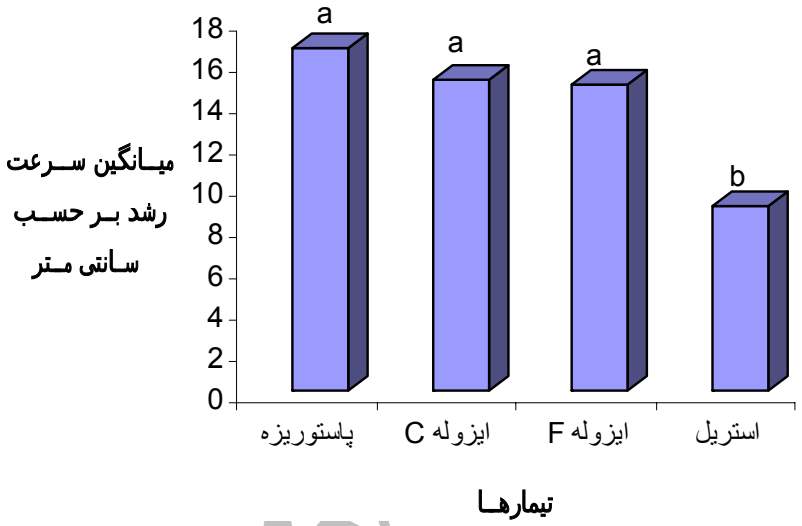
Archive of SID

www.SID.ir

(شکل ۵).

سرعت رشد میسلیوم قارچ خوراکی روی کمپوستی که استریل شده بود یعنی عاری از قارچهای گرمادوست بود، به صورت معنی داری ($p < ۰/۰۵$) کمتر از سرعت رشد میسلیوم در کمپوست حاوی قارچهای گرمادوست (کمپوست پاستوریزه و یا از پیش تلقیح شده با ایزولههای F و C تیپ ۲ *S. thermophilum*) بود. کمپوستی که پاستوریزه شده بود، با کمپوستهای تلقیح شده با ایزوله F و C قارچ گرمادوست *S. thermophilum* از این نظر اختلاف معنیداری نشان نداد (نمودار ۱). میزان رشد قارچ خوراکیدکمهای در داخل لولههای آزمایش، در کمپوست استریل شده ۰/۳۸ سانتیمتر در روز و در کمپوست فاز دو که فقط پاستوریزه شده بود و *S. thermophilum* جمعیت غالب آن بود، ۰/۷۲ سانتیمتر در روز بود. در حالیکه میزان رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمهای روی کمپوست تلقیح شده با قارچهای گرمادوست ایزوله F و ایزوله C به ترتیب ۰/۶۵ و ۰/۶۶ سانتیمتر در روز بود (نمودار ۱).

در نمونههای تلقیح شده با ایزولههای تیپ ۲ (ایزولههای C وF) قارچ گرمادوست *S. thermophilum* و نمونههایی که فقط پاستوریزه شده بودند، شیرینسازی یک روز زودتر نسبت به کمپوست استریل انجام شده بود به عبارت علمیتر یک روز زودتر غلظت آمونیاک به حد غیرسمی رسید.



نمودار ۱- میانگین رشد قارچ خوراکی دکمهای در طی ۲۳ روز بر روی کمپوست تیمار شده با ایزوله F، ایزوله C، استریل و پاستوریزه

(میانگینهای دارای حرف یا حروف مشابه از لحاظ آماری در سطح ۰/۰۵ معنیدار نمیباشند)

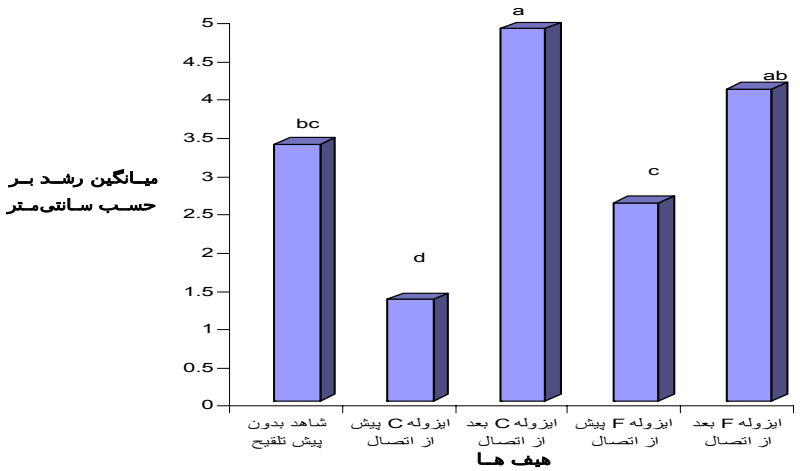
شکل ۵ سمت راست- رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمهای روی کمپوست پیش تلقیح شده با *S. thermophilum* پس از ۱۸ روز در دمای اتاق.
سمت چپ: رشد کم میسلیوم قارچ خوراکی در تیمار استریل

www.SID.ir

بررسی اثرمتقابل میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای و قارچ‌های گرمادوست

میزان رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای روی محیط کشت تهیه شده با عصاره کمپوست - گلوکز آگار غنی شده با CYM و روی همین محیط کشت اما از پیش‌تلقیح شده با قارچ‌های گرمادوست مذکور، به مدت ۱۸ روز هر روزه اندازه‌گیری شد. اختلاف معنی‌داری ($p < ۰/۰۵$) بین تیمار شاهد (محیط کشت تهیه شده با عصاره کمپوست - گلوکز آگار غنی شده با CYM) و تیمارهای پیش‌تلقیح شده با ایزوله‌های تیپ ۲ قارچ گرمادوست *S. thermophilum* مشاهده گردید (نمودار ۲). سرعت رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای روی محیط کشت شاهد، ۱/۸ میلی‌متر در روز بود و روی محیط کشتی که با ایزوله C قارچ گرمادوست *S. thermophilum* تلقیح شده بود، ۲/۷ میلی متر در روز بود؛ در حالی‌که قبل از اینکه میسلیوم دو قارچ (یعنی میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای و ایزوله C قارچ گرمادوست *S. thermophilum*) به هم برسند سرعت رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای، ۰/۷ میلی متر در روز بود (نمودار ۲). سرعت رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای روی محیط کشت تلقیح شده با ایزوله F قارچ گرمادوست *S. thermophilum* ۲/۲ میلی‌متر در روز بود در حالی‌که قبل از اتصال سرعت رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای ۱/۴ میلی‌متر در روز بود.

موقعی که قارچ‌ها در مقابل یکدیگر قرار گرفتند، وقتی که فاصله بین نقاط رشد به حدود یک میلی‌متر کاهش یافت، رشد قارچ سایتالیدیوم ترموفیلوم متوقف شد. در حالی‌که رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای با همان سرعت ادامه یافت (شکل ۶).



نمودار ۲- میانگین سرعت رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای در طی ۱۸ روز بر روی محیط کشت عصاره کمپوست- گلوکز غنی شده با CYM، تقابل میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای با هیف‌های ایزوله‌های F و C در مراحل پیش از اتصال و بعد از اتصال در مقایسه با شاهد بدون پیش‌تلقیح

(میانگین های دارای حرف یا حروف‌های مشابه از لحاظ آماری در سطح $\alpha = ۰/۰۵$ معنی‌دار نمی‌باشند)

شکل ٦- توقف رشد قارچ گرمادوست *S. thermophilum* توسط قارچ خوراکی دکمه‌ای

Archive of SID

www.SID.ir

حدود ۵ روز بعد از اتصال، سرعت رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای تسریع شد، که منتج به یک رشد خطی شده و به ۲/۷ میلی‌متر در روز رسید و به طور کامل جانشین *S. thermophilum* گردید (شکل ۷). وقتی *S. thermophilum* در دمای ۲۴°C قرار می‌گیرد، عموماً دیوارسازی عرضی افزایش یافته و تشکیل اسپورها مشاهده می‌شود. در این دما سرعت رشد کمتر از سرعت رشد در دمای ۴۵°C می‌شود، اما قارچ گرمادوست *S. thermophilum* پایدار باقی می‌ماند که در کل نتیجه آن مرگ قارچ گرمادوست بعد از تقابل طولانی با قارچ خوراکی دکمه‌ای می‌باشد (شکل ۸).

میانگین سرعت رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای در نمونه‌های کمپوستی که فقط پاستوریزه شده بودند نسبت به کمپوست‌های تلقیح شده با ایزوله‌های تیپ ۲ *S. thermophilum* ، بیشتر بود (۷/۷۲ میلی‌متر در روز) اما از نظر ظاهری، شبکه میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای ضخیم و تنومند نبود در حالیکه درکمپوست تلقیح شده با ایزوله‌های تیپ ۲ *S. thermophilum* ، از نظر شکل ظاهری میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای دارای ضخامت بیشتری بود.

بحث

هدف اصلی کمپوست‌سازی آماده کردن یک محیط کشت اختصاصی است که رشد میسلیوم قارچ خوراکی را تقویت و از رشد ارگانیسم‌های رقیب ممانعت نماید. ایزوله‌های تیپ ۲ قارچ *S. thermophilum* جمعیت غالب فاز دو کمپوست‌سازی می‌باشند. دلیل رشد میسلیوم قارچ خوراکی در کمپوست استریل حضور ترکیبات ازت دار لیگنین هموس در کمپوست می‌باشد که در اثر واکنش‌های شیمیایی در درجه حرارت بیشتر از ۷۵°C تولید می شود. کمپوست این درجه حرارت را در فاز ۱ می‌بینند. اگر کمپوستی با همین ترکیب و بدون گذراندن فاز ۲ برای پرورش قارچ مورد استفاده قرار گیرد، عملکردی بیشتر از ۱۵درصد تولید نخواهد کرد.

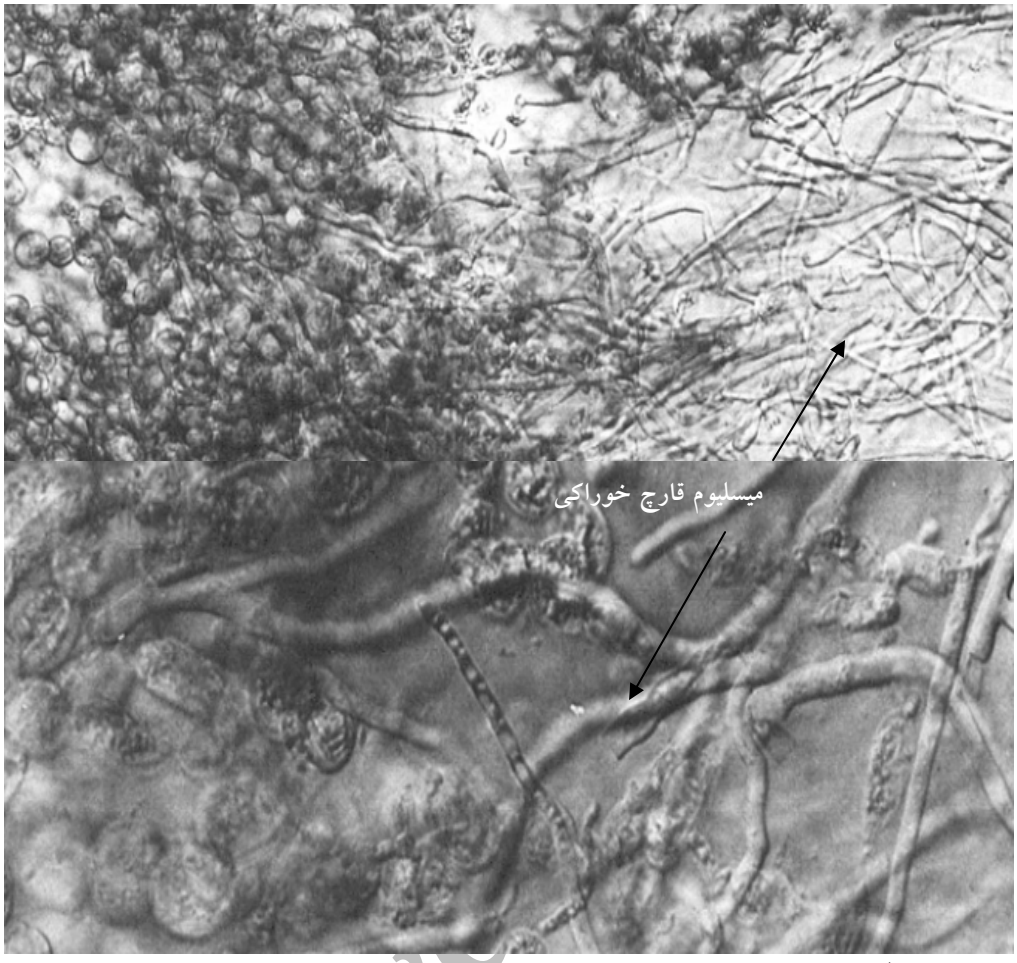
نقش قارچ گرمادوست*S. thermophilum* به عنوان یک میکروارگانیسم تسریع و تحریک کننده رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای در پژوهش‌های مختلفی بررسی شده است. اوپ دن کمپ وهمکاران (۱۲) و لیونز وهمکاران (۹) گزارش کردند که تشکیل کلونی توسط ایزوله‌های تیپ ۲ *S. thermophilum* در بستر کشت قارچ خوراکی دکمه‌ای، باعث تولید متابولیت‌هایی می‌شود که منجر به رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای و بازداشتن رشد میکروارگانیسم‌های رقیب می‌شود. تحقیق مشابهی نیز توسط استراتسما و همکاران انجام گردیده است. آنها گزارش کردند که ایزوله‌های تیپ ۲ *S. thermophilum* و قارچ گرمادوست *Myriococcom thermophilum* باعث رشد خوب میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای در لوله‌های آزمایش می‌شود (۲۴) که با یافته‌های این آزمایش مطابقت دارد.

همچنین سانچز و همکاران (۱۶) گزارش کردند که بعد از پر شدن کمپوست با کلونی‌های *S. thermophilum* ، تغییراتی از قبیل کاهش نسبت C/N و افزایش pH، اتفاق می‌افتد. این امر می‌تواند در اثر کاتابولیسم کربوهیدرات‌ها و احتمالاً به دلیل دفع متابولیت‌ها در بستر کشت قارچ خوراکی دکمه‌ای باشد. آنچه از نمودار ۲ بر می‌آید این است که در محیط شاهد که حاوی عصاره کمپوست می‌باشد رشد میسلیوم قارچ خوراکی نسبتا رضایت بخش است.

شکل ۷- رشد خطی میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای بر روی محیط کشت عصاره کمپوست - گلوکز آگار غنی شده با CYM و پیش تلقیح شده با قارچ گرمادوست *S. thermophilum*

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۸ - قارچ خوراکی دکمه‌ای به عنوان رقیب جنگجوی قارچ *S. thermophilum*.

سمت راست میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای، سمت چپ کنیدیوم‌های قارچ *S. thermophilum*. میکروسکوپ فاز کنتراست، تصویر بالا بزرگنمایی ۴۰۰ و تصویر پایین بزرگنمایی ۱۰۰۰

این محیط حاوی عصاره کمپوست می‌باشد که این عصاره حاوی باکتری‌ها و قارچ‌های گرمادوست می‌باشد. در این محیط این میکروارگانیسم‌های گرمادوست نقش خودرا در تحریک رشد و یا تغذیه میسلیوم قارچ خوراکی ایفائ می‌نمایند. دلیل اینکه رشد میسلیوم قارچ خوراکی در محیطی که قارچ *S. thermophilum* تلقیح شده بود، قبل از اتصال به صورت معنی‌داری کمتر از رشد آن در محیط شاهد است، می‌تواند به خاطر رقابت دو قارچ در استفاده از محیط غذایی باشد. به مجرد اینکه میسلیوم قارچ خوراکی به هیف های قارچ گرمادوست می‌رسد، سرعت رشد میسلیوم قارچ خوراکی نسبت به قبل از اتصال سه برابر می‌شود. اگر صرفا قارچ های گرمادوست نقش تحریک‌کنندگی داشته باشند، قبل از اتصال هیف‌های دو قارچ، عصاره آنها به اندازه کافی در محیط حضور داشته است تا از رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه ای حمایت نمایند. بنابراین سه برابر شدن میزان رشد پس از اتصال فقط به خاطر نقش تحریک‌کنندگی نیست بلکه دلالت بر تغذیه قارچ خوراکی از قارچهای گرمادوست دارد.

دلایل اینکه چگونه قارچ *S. thermophilum* باعث تحریک رشد قارچ خوراکی روی محیط کشت عصاره کمپوست - گلوکز آگار می‌شود هنوز مشخص نیست، اما ممکن است ترکیب اجزاء محیط کشت و متابولیت‌های تولید شده به وسیله محیط کشت یا ترکیبی از هر دو، باعث بهبود رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای شوند.

در کمپوست پاستوریزه به‌دلیل اینکه قبل از پاستوریزاسیون کمپوست در معرض قارچهای گرمادوست و آکتینومایست ها قرار می گیرد و در اثر پاستوریزاسیون همه جمعیت آنها از بین نمی‌روند بلکه درصدی از آن باقی می‌ماند. پس از کاهش درجه حرارت به $50^{\circ}C$ رشد و تکثیر آنها شروع شده و جمعیت غالب کمپوست را تشکیل می‌دهند. رشد بیشتر میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای در کمپوست فاز دو که فقط پاستوریزه شده بود به علت حضور دیگر میکروب‌ها و یا

Archive

www.SID.ir

همکاری و همزیستی میکروب‌های موجود در کمپوست می‌باشد. استراتسما و همکاران (۲۵) گزارش کردند، که همه ۵۴ ایزوله *S. thermophilum* ، رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای را حدود ۷ میلی‌متر در روز بهبود می‌بخشند. با حضور موثر اینها در کمپوست عملکرد قارچ خوراکی به بیش از ۲۵درصد می‌رسد. تا به حال دلیل اینکه چگونه قارچ گرمادوست *S. thermophilum* باعث بهبود رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای می‌شود بدون توضیح باقی مانده بود. با این وجود فرضیه‌های متعددی وجود داشت که به قرار زیراست.

۱- کاهش سطح آمونیاک: همانطور که قبلاً اشاره شد آمونیاک برای قارچ خوراکی دکمه‌ای سمی می‌باشد و وجود مقادیر ناچیزی از آن باعث توقف کامل رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای می‌گردد. در عین حال تولید بیش از حد آمونیاک از رشد میکروب‌ها نیز جلوگیری می‌کند. بعد از فاز دو کمپوست‌سازی، قارچ *S. thermophilum* تنها گونه انحصاری در کمپوست می‌باشد این مطلب را می‌توان با استفاده از کمپوست شسته شده فاز دو، و کشت آن در پتری دیش‌ها اثبات نمود (شکل ۱۰). استراتسما و همکاران (۲۴) گزارش کردند که ناپدید شدن آمونیاک و انتخابی شدن محیط کمپوست با حضور قارچ گرمادوست *S. thermophilum* در ارتباط می‌باشد. در این آزمایش در محیط‌های کشت حاوی *S. thermophilum* آمونیاک سریعتر حذف شد.

۲- افزایش انتخابی شدن محیط کمپوست: به دلیل اینکه این میکروارگانیزم‌ها مواد و ترکیبات مختلفی می‌سازند، محیط کمپوست برای میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای انتخابی می‌شود (۱۴)، مشاهدات ما از نمونه‌های کمپوستی که استریل شده بودند، میزان آلودگی بالایی را نسبت به نمونه‌های کمپوستی که با ایزوله‌های *S. thermophilum* و کمپوستی که فقط پاستوریزه شده بود، نشان دادند.

۳- CO_2 حاصل از تنفس قارچ گرمادوست: در مرحله رشد میسلیوم در کمپوست، دی‌اکسیدکربن حاصل از تنفس قارچ‌های گرمادوست باعث افزایش سرعت رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای می‌شود (۲۶).

۴- غیر متحرک شدن مواد غذایی: با غیر متحرک شدن آمونیاک بخشی از آن با لیگنین همراه شده و کمپلکس لیگنین - نیتروژن را به وجود می‌آورد و بخشی از آن همراه با باقیمانده کربوهیدرات‌ها توسط میکروب‌ها جذب و تبدیل به بیوماس میکروبی می‌گردد تا بعداً هر دو به مصرف غذای قارچ خوراکی دکمه‌ای برسند (۱۶).

با وجودیکه هیچیک از این فرضیه‌ها را نمی‌توان رد کرد این آزمایش ثابت کرد که قارچ‌های گرمادوست علاوه بر نقش تحریک‌کنندگی، نقش تغذیه‌ای نیز بر عهده دارند به طوریکه تصاویر میکروسکوپی (شکل ۸) نشان داد با رسیدن میسلیوم قارچ دکمه‌ای به میسلیوم های قارچ گرمادوست، سلول‌های قارچ گرمادوست تخریب شدند و مورد استفاده میسلیوم‌های قارچ خوراکی قرار گرفت.

با مدیریت صحیح فاز دو کمپوست‌سازی و ایجاد شرایط بهینه برای رشد ایزوله‌های تیپ ۲ *S. thermophilum* ، می‌توان در پایان فاز دو، کمپوستی پوشیده از کلونی‌های *S. thermophilum* به دست آورد که متعاقباً تسریع و تحریک رشد میسلیوم قارچ خوراکی دکمه‌ای را در پی خواهد داشت.

منابع

۱- پاکدین ع. ۱۳۸۶. شناسایی و بهینه سازی میکروفلور کمپوست قارچ خوراکی دکمه‌ای. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- فارسی م. و گردان ح. ر. ۱۳۸۸. پرورش و اصلاح قارچ‌های خوراکی (چاپ دوم). انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۳- قربانی فعال پ. ۱۳۸۶. بررسی امکان استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP در انگشت‌نگاری قارچ خوراکی دکمه‌ای. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد.

4- Cooney D.G., and Emerson R. 1964. Thermophilic fungi. An account of their biology, activities and classification. Freeman, San Francisco.

5- Fordyce C. 1970. Relative numbers of certain microbial groups present in compost used for mushroom (*Agaricus bisporus*) propagation. App. Microbiol., 20 (2) 196-199.

6- Gerrits J.P.G. 1988a. Compost treatment in bulk for mushroom growing. Mushroom Journal, 182: 471-475.

7- Gupta S.D., and Maheshwari R. 1985. Is organic acid required for nutrition of thermophilic fungi? Arch. Microbiol. 141: 164-169.

8- Hughes S.J. 1985. The term chlamydospore. In filamentous microorganisms, Biomedical aspects (ed. T. Arai, T. Kuga, K. Terao, M. Yamazaki, M. Miyaji & T. Unemoto), pp. 1-20. Japan Scientifc Societies prees: Tokyo.

9- Lyions G.A., Sharma H.S.S., and Blakeman J.P. 1999. The importance of *Scytalidium thermophilumm* in substrate specificity for the production of Agaricus bisporus. In proceeding of third international conference on mushroom biology and mushroom products. Sydney October 1999

10- Lyions G.A., Mckay G.J., and Sharma H.S.S. 2000. Molecular comparison of *Scytalidium thermophilumm* isolates using RAPD and ITS sequence analyses. Mycol. Res. 104 (12): 1431-1438.

11- Nilsson R.H., Kristiansson E., Ryberg M., Hallenberg N., and Larsson K.H. 2008. Intraspecific ITS variability in

Archive of SID

www.SID.ir

the kingdom fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification. Evolutionary Boiinformatics, 4: 193- 201.
12- Op Den Camp H.J.M., Stumm C.K., Straatsma G., Derikx P.J.L., and Van Griensven L.J.L.D. 1990. Hyphal and mycelial interactions between *Agaricus bisporus* and *Scytalidium thermophilumm* on agar media. Microbial Ecology, 19: 303-309.
13- Renard Y., and Caileux R. 1973. Contribution a l etude des microorganisms due compost pendant la croissance mycelienne du champignon couche. Mush. Sci, 10: 311-334.
14- Ross R.C., and Harris P.J. 1983. The significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation. Scientia Horticulturae, 20: 61-70.
15- Saghai Maroof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., and Allard R.W. 1984. Ribosomal spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:8014-8019.
16- Sanchez J.E., Mejia L., and Royse D.J. 2008. Pangola grass colonized with *Scytalidium thermophilumm* for production of Agaricus bisporus. Bioresource Technology, 99: 655-662.
17- Singh R., and Singh U.C. 2005. Modern Mushroom Cultivation. Agrobios (India), 229 pp.
18- Singh S.K., Vijay B., Mediratta V., Ahlawat O.P., and Kamal S. 2005. Molecular characterization of *Humicola grisea* isolates associated with *Agaricus bisporus* compost. Current Science. 89 (10): 1745-1748.
19- Stanek M. 1972 Microorganisms inhabiting mushroom compost during fermentation. Mush Sci, 8: 797-811.
20- Storm P.F. 1985. Identification of thermophilic bacteria in solid-waste composting. App. and Environ. Microbiol.,50 (4) 906-913.
21- Straatsma G., and Samson R.A. 1993. Taxonomy of *Scytalidium thermophilumm*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. Mycol. Res, 97 (3): 321-328.
22- Straatsma G., Gerrits J.P.G., Augustijn M.P.A.M., Op Den Camp H.J.M., Vogels G.D., and Van Griensven L.J.L.D. 1989. Population dynamics of *Scytalidium thermophilumm* in mushroom compost and stimulatory effects on growth rate and yield of Agaricus bisporus. Journal of General Microbiology, 135: 751-759.
23- Straatsma G., Gerrits J.P.G., Gerrits T.M., Op Den Camp H.J.M., and Van Griensven L.J.L.D. 1991. Growth kinetics of *Agaricus bisporus* mycelium on solid substrate (mushroom compost). Journal of General Microbiology, 137: 1471-1477.
24- Straatsma G., Olijnsma T.W., Gerrits J.P.G., Amsing J.G.M., Opden camp H.J.M., and Van Griensven L.J.L.D. 1994b. Inoculation of *Scytalidium thermophilumm* in Button Mushroom Compost and Its Effect on Yield. Appl. and Environ. Microbiol. 60 (9): 3049-3054.
25- Straatsma G., Samson R.A., Olijnsma T.W., Op Den Camp H.J.M., Gerrits J.P.G., and Van Griensven L.J.L.D. 1994a. Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilumm* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. Applied and Environmental Microbiology, 60 (2): 454-458.
26- Wiegant W.M., Wery J., Buitenhuis E.T., and De Bont J.A.M. 1992. Growth promoting effect of thermophilic fungi on the mycelium of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. Applied and Environmental Microbiology, 58: 2654-2659.
27- Wagner D.B., Furnier G.R., Saghai-Maroof M.A., Williams S.M., Dancik B.P., and Allard R.W. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in Lodgepole and Jack pines and their hybrids. Proc Natl Acad Sci USA 84:2097-2100.

Archive of SID

www.SID.ir