

میسلیومی که برای تهیه اسپاون مورد استفاده قرار می گیرد اهمیت خیلی زیادی دارد و باید از تولید محصول قابل اطمینان توسط آن یقین حاصل نمود. کشت قارچ *V. volvacea* در بین سایر قارچ های خوراکی از این نظر که نمی توان آن را در دمای ۵ درجه سانتی گراد نگهداری کرد و قارچ در این دما زنده نمی ماند منحصر به فرد است. بنابراین کشت قارچ را نمی توان در دمای یخچال نگهداری کرد. میسلیوم های قارچ در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد برای بیشتر از ۶ ماه و یا حتی یک سال مادامی که آگاری که بر روی آن رشد می کند خشک نشده است می تواند زنده بماند. نژادهای مختلف عکس العمل های مختلفی به دمای ۲۰-۱۵ درجه سانتی گراد نشان می دهند اما عموماً می توان آنها را در این دما تا حتی برای یک سال نگهداری نمود. کشت قارچ *V. volvacea* را نمی توان به سایر روش های نگهداری در روغن معدنی و یا آب استریل مقرر حفظ نمود. پس از چندین بار انتقال به محیط کشت جدید قارچ شروع به تجزیه شدن نموده و لذا لازم است کشت جدیدی از قارچ به روش تک اسپور کردن یا کشت بافت تهیه گردد. تنها روش حفظ کیفیت قارچ بدون کمترین تاثیر در کیفیت آن به نظر می رسد انجماد سریع در ازت مایع باشد.

تشکیل کلامیدوسپورها یکی از مشخصات کشت *V. volvacea* است. به عقیده چانگ وجود و تشکیل کلامیدوسپور در کشت این قارچ بیانگر کیفیت خوب رشد قارچ است چرا که این اسپورهای غیرجنسی به عنوان واحدهای ذخیره کننده و برقرار کننده تعادل محتوای سلول ها هستند. این اسپورها منبع تکثیر قارچ هستند و هر کدام قادر به تولید شبکه ای از میسلیوم ها هستند. ظهور کلامیدوسپورها بیانگر کیفیت و رسیدگی کشت قارچ است، بنابراین اسپاون حاوی این اسپورهای صورتی یا متمایل به قهوه ای به وسیله بسیاری از تولیدکنندگان مورد ترجیح است (شکل ۱).

بستره اسپاون: به طور کلی دو نوع اسپاون وجود دارد: اسپاون مادر و اسپاون کشت (شکل ۲).

اسپاون مادر معمولاً از دانه هایی مثل چاودار، گندم، ارزن و سوگوم تهیه می شود که به وسیله یک تکه محیط کشت حاوی قارچ مایه کوبی می شود. اسپاون کشت، اسپاونی است که برای مایه زنی کیسه های حاوی بستر *V. volvacea* استفاده می شود. از اسپاون مادر برای



دکتر نادر رکنی

(قسمت سوم)

دانشگاه صنعتی جندی شاپور دزفول

دکتر رحیم اسلامی زاده

شرکت کشاورزی جلگه دز (قارچ دزفول)

قارچ خوراکی مناطق گرمسیری

روش های کشت

همان طور که در قسمت های پیشین مقاله ذکر شد *volvariella* قارچ خوراکی متعلق به مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری و متعلق به خانواده *Plutaceae Kolt&* Pouz از رده بازیومیست ها است. این قارچ را عموماً تحت عنوان قارچ خوراکی کلشی، قارچ خوراکی کلش شالیزار، ویا قارچ خوراکی چینی می شناسند. در شماره های قبل در خصوص مشخصات بیولوژیکی، مورفولوژیکی و مراحل بلوغ، طویل شدن، دکمه ای، تخم مرغی، تندش و تشکیل ریشه و کلامیدوسپورها در قارچ والاریلا صحبت شد. در این قسمت به روش های کشت قارچ می پردازیم و با هم می خوانیم.

روش های کشت قارچ *V. volvacea*

الف) تولید اسپاون: اسپاون محیطی است که به وسیله میسلیوم های قارچ مایه کوبی شده و به عنوان بذر برای کشت قارچ مورد استفاده قرار می گیرد. این محیط باید با رعایت کلیه موارد بهداشتی و تحت شرایط ضد عفونی شده تهیه گردد.



تهیه اسپاون کشت استفاده می شود . برای تهیه اسپاون کشت می توان از انواع مواد سلولزی مثل ضایعات پنبه ، پسمانده چای رستوران ها ، ضایعات روغن نخل بسته به موجودی آنها در منطقه ، استفاده کرد. از خاک اره هم می توان برای تهیه اسپاون کشت استفاده نمود.

در برخی مقالات آمده است که استفاده از خاک اره مخلوط با ۱۰ تا ۲۰ درصد آرد ذرت ، سیوس برنج و یا گندم ، منجر به تولید محصول مناسبی خواهد شد .

شکل ۱: کلامیدوسپوره های قارچ *V. volvacea* در کشت دوهفته ای قارچ ( سمت چپ).

کلامیدوسپوره های صورتی رنگ در اسپان قارچ ( سمت راست).



*V. volvacea* به دلیل این قادر به تولید آنزیم های تجزیه کننده لیگنین و فنول اکسیداز نیست ، وجود مواد فنولیک و تانن ها در کشت این قارچ می تواند از رشد آن جلوگیری کند. بنابراین اضافه کردن بیش از حد مکمل ها می تواند سبب بروز پدیده ذکر شده در بالا گردد.

### شروع کشت :

برای شروع کشت قارچ *V. volvacea* از هر یک از چهار روش زیر می توان استفاده کرد:

- دریافت کشت خالص قارچ و یا خریداری از شرکت هایی که در کار تهیه ایزوله های خوراکی تخصص دارند.

- جمع آوری اسپوره های قارچ به صورت یک اسپور پرینت و سپس رشد دادن اسپورها برای تهیه کشت تک اسپور.

- تهیه کشت چند اسپوری ( Multispore culture).

- استفاده از قطعه ای از بافت یک اندام باردهی تازه.

همه بافت های که در چرخه زندگی قارچ دخالت دارند را می توان برای تهیه کشت از قارچ مورد استفاده قرار داد. مراحل تهیه اسپور پرینت ، کشت چند اسپوری و تکنیک های کشت بافت به شرح زیر می باشد.

شکل ۲: اسپان تهیه شده از خاک اره یا کلش برنج به همراه سیوس ( سمت راست).

اسپان بذر مایه زنی شده قطعاتی از محیط کشت حاوی قارچ ( سمت چپ).

### روش کشت اسپور پرینت

یک کلاهک بالغ (بازشده) انتخاب شده و ساقه از محل اتصال به کلاهک از آن جدا می شود. سپس کلاهک بر روی یک صفحه کاغذ تمیز قرار می گیرد و به مدت ده دقیقه کلاهک بر روی کاغذ باقی می ماند. اولین اسپور پرینت به دلیل احتمال آلودگی به باکتری ها و دیگر میکرو ارگانیسم ها دور ریخته می شود. سپس مجدداً کلاهک بر روی یک صفحه کاغذی تمیز دیگر قرار داده می شود و برای جلوگیری از جریان هوا بوسیله یک بشر تمیز پوشانده می شود. پس از ۲۰ تا ۳۰ دقیقه اسپورهای

زیادی بر روی کاغذ جمع می شود. این پرینت برای مایه کوبی قارچ مناسب است .

### تکنیک کشت چند اسپوری

قبل از مایه کوبی میزکار را با Lysol سه درصد تمیز کرده و دست ها با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی می شود. لوپ مایه کوبی را بوسیله حرارت چراغ الکی ضد عفونی کرده و با فرو کردن در آب مقطر استریل سرد می کنند، سپس با استفاده از لوپ مقداری از اسپورها را از روی کاغذ برداشته و در شرایط ضد عفونی شده اسپورها را به لوله آزمایش حاوی محیط کشت انتقال می دهند. بلافاصله پس از خارج کردن لوپ از درون لوله مجدداً آن را حرارت داده تا از انتشار اسپورها جلوگیری شود. کشت را به مدت ۴-۵ روز در دمای ۳۰ تا ۳۲ درجه سانتی گراد نگه می دارند.

- روش کشت بافت (با استفاده از بازیدیوکارپ بالغ باز نشده)

- قارچ را به طور کامل با آب می شویند و آنرا با کاغذ خشک کن به آرامی خشک میکنند.

- میز کار را با lysol سه درصد یا مواد ضد عفونی کننده مشابه تمیز کرده و دستها با الکل ۷۰% ضد عفونی میشود. قارچ را نیز به آرامی با الکل ۷۰% تمیز ضد عفونی میکنند. تیغه چاقو با حرارت ضد عفونی شده و اجازه میدهند تا سرد شود سپس تکه را از قاعده قطع کرده و بدون اینکه بخش داخلی آنرا لمس شود به به دو نیمه تقسیم میکنند. بخشی از بافت کلاهک را از قسمت مرکزی قارچ جدا کرده و به پتری حاوی محیط کشت مناسب انتقال میشود. این کار را سه بار دیگر تکرار میگردد.

- پتری حاوی کشت قارچ را به مدت ۴ تا ۵ روز در مای ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتیگراد میگیرد.

- پس از این مدت رویش میسلیمهای قارچ در محیط کشت باید پدیدار گردد. اگر آلودگی در پتری مشاهده می شود قطعه کوچکی از میسلیمها را به محیط کشت جدید منتقل میکنند. در غیر اینصورت قطعاتی از آگار را به لوله های آزمایش حاوی محیط کشت شیب دار منتقل کرده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ تا ۳۲ درجه نگهداری میشود از قارچ موجود در این لوله ها بعداً" برای تهیه اسپان می توان استفاده کرد.

۲- محیطهای کشت قارچ: محیطهای کشت متفاوتی وجود دارد که با استفاده از آنها می توان به کشت این قارچ اقدام نمود.

### محیط PDA (Potato Dextrose Agar)

- برای تهیه ۱ لیتر محیط کشت PDA از ۲۰۰ گرم سیب زمینی پوست کنده قطعه قطعه شده جوشانده شده تا مرز پختگی استفاده میشود. سپس محتوای ظرف را با عبور از یک پارچه پنبه ای صاف کرده سیب زمینی ها کنار گذاشته می شود. به عصاره بدست آمده ۲۰ گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار اضافه شده و حجم آن با آب مقطر استریل به یک لیتر می رسد. مخلوط حاصل را حرارت داده و به آرامی به هم می زنند تا آگار کاملاً حل شود. سپس محیط کشت به ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری و یا لوله های آزمایش منتقل و با گلوله های پنبه درب آنها بسته می شود. ظروف حاوی محیط کشت به اتوکلاو و طوری در یک سطح شیب دار قرار می دهند که محیط کشت با پنبه برخورد نکند.

- محیط کشت V<sub>8</sub>: محیط کشت V<sub>8</sub> متشکل از یک لیتر آب، ۵۰ میلی لیتر عصاره سبزیجات (V<sub>8</sub><sup>®</sup>)، ۲۰ گرم آگار و ۰/۲ گرم کربنات کلسیم است. تهیه این محیط کشت نیز مشابه آنچه در بالا گفته شد می باشد همه محیطهای کشت باید در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شوند. لازم است به این نکته توجه شود که اکثر قارچهای خوراکی محیطهای کشت خنثی و یا تا حدی اسیدی یعنی PH حدود ۵/۵ تا ۶/۵ را ترجیح می دهد. با اینحال PH مناسب برای قارچ *Volvacea* ۶/۷-۸/۸۰ V است. بنابراین باید از مناسب بودن PH محیط کشت برای قارچ مورد نظر اطمینان حاصل نمود.

### ۱- محیطهای کشت مناسب برای تهیه اسپان: برای تهیه

اسپان از مواد مختلفی به تنهایی و یا در ترکیب با سایر مواد می توان استفاده کرد از جمله می توان به کلش برنج، دانه های سورگوم و چاودار، بقایای محصول پنبه، تقاله چایی استفاده شده و غیره اشاره کرد. اسپان را باید به مدت ۲ تا ۳ هفته در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد نگهداری کرد و طی این مدت میسلیم باید تمام فضای داخلی ظرف را پر نماید و

معمولاً کلامیدوسپورهای قارچ نیز در سطح داخلی ظرف نمایان گردد.

توصیف دو نوع اسپانی که برای منظورهای کاربردی مورد استفاده قرار می‌گیرد در زیر آمده است:

۱- اسپان بذر (مثل چاودار/ سورگوم/ گندم): برای تهیه این اسپان حدود ۱۰۰ گرم بذر در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب قرار داده و به آن ۲ گرم کربنات کلسیم اضافه می‌شود. اما ممکن است لازم باشد که نسبت‌ها را بسته به تفاوت‌های طبیعی که در بین واریته‌ها وجود دارد و نیز میزان رطوبت دانه‌ها تغییر داد.

۲- اسپان کلش (مثل کلش برنج): ساقه‌های برنج ابتدا به مدت ۲ تا ۴ ساعت خیسانده می‌شوند. سپس تمیز شده و در اندازه‌های ۵-۲ سانتیمتری قطعه قطعه می‌شود. سپس با کربنات کلسیم ۱٪ و ۱ تا ۲ درصد سبوس برنج مخلوط شده و در بطری‌های شیشه‌ای درب‌دار گردن گشاد قرار داده می‌شود.

۲- اسپان تفاله چای: تفاله‌های چای را می‌توان از رستورانها جمع‌آوری کرد. این تفاله‌ها ابتدا باید به خوبی شسته و آبکشی شود سپس به نسبت ۲٪ به آنها کربنات کلسیم اضافه می‌شود تا PH آن‌ها در محدوده ۷/۸ - ۶/۸ قرار گیرد. سپس این بستر به خوبی مخلوط می‌شود. این بستره را می‌توان در ظروف شیشه‌ای در پیچ‌دار و یا کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به حرارت (از جنس پروپیلین) قرار داد. در مورد اخیر یک حلقه پلاستیکی را باید در دهانه کیسه قرار داد و درب آنرا بوسیله پنبه مسدود کرد. هر یک از دهانه‌ها سپس بوسیله کاغذ آلومینیومی پوشانده می‌شود.

۳- اسپان ضایعات پنبه: از ضایعات پنبه برای تهیه اسپان می‌توان استفاده کرد. روش کار مشابه آنچه که در مورد تفاله‌های چای گفته شد می‌باشد که به آن ۲٪ کربنات کلسیم اضافه می‌شود. کربنات کلسیم اسیدهای تولید شده ناشی از متالولیزم میسلیموم‌ها را خنثی می‌کند.

۵- اسپان سبوس - کود (Manure - Husk): مخلوطی از پهن تازه اسبی و سبوس لوتوس نیز برای تهیه اسپان مناسب شناخته شده است (Jalavicharana, 1950). این دو با نسبت مساوی با هم مخلوط شود. قبل از این سبوس لوتوس به خوبی خیسانده می‌شود به شکلی که در طی فرآیند تبدیل

شدن به کمپوست رطوبت خود را از دست ندهند. کود باید به خوبی مرطوب باشد ولی خیس نباشد. سپس این دو به خوبی با هم مخلوط شده و به صورت هرمهای یک متری بر روی هم کوبه می‌شود. سطح محل باید صاف و دارای پوشش برای جلوگیری از تابش مستقیم آفتاب و یا باران باشد. در طی ۴ تا ۵ روز دمای کمپوست بتدریج بالا می‌رود و گاهی در زمان اولین برگرداندن به بالاتر از ۶۵ درجه سانتیگراد می‌رسد. اگر کمپوست خیلی خشک باشد باید مجدداً کمی مرطوب شده و به شکل قبلی کوبه گردد. دما مجدداً بالا خواهد رفت ولی در نهایت پایین می‌آید. پس از ۴ تا ۵ بار برگرداندن در طی دوره‌های هر ۴ تا ۵ روز یکبار دمای آن به ۴۵-۴۰ درجه می‌رسد و کمپوست آماده بطری گرفتن است. برای اطمینان از کافی بودن رطوبت کمپوست آنرا در بین دو کف دست فشرده کرده به شرط اینکه آبی از آن خارج نشود و پس از برداشتن فشار شکل خود حفظ نماید میزان رطوبت آن کافی است. کمپوست سپس وارد کیسه‌های پلاستیکی و یا قوطی‌های آلومینیومی درب‌دار می‌شود. با یک وسیله نوک تیز روزنه‌ای در داخل کمپوست ایجاد می‌شود پس از ضد عفونی کردن کمپوست میسلیمومهای قارچ را در درون آن روزنه در مرکز کمپوست وارد می‌کنند. پس از حدود دو هفته برای استفاده آماده است.