رستنیها ۲۱(۱): ۹۵–۷۹ (۱۳۹۹) Rostaniha 21(1): 79–95 (2020)

DOI: 10.22092/BOTANY.2020.341890.1189

جداسازی و شناسایی قارچ‌های متحمل به گرما و گرمادوست از خاک و کمپوست در استان کرمانشاه*

دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۱۹ / پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۸

زهرا یوسفوند: دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

صمد جمالی✉: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (jamali454@yahoo.com)

هادی خاطری: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

چکیده

به منظور شناسایی قارچ‌های متحمل به گرما و گرمادوست، طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۶، نمونه‌برداری از خاک، کمپوست ضایعات شهری و کمپوست قارچ خوراکی در شهرستان‌های استان کرمانشاه (ماهیدشت، هرسین، کرند، اسلام‌آباد، قصر شیرین، سرپل‌ذهاب، جوانرود و گیلانغرب) انجام شد. جداسازی این قارچ‌ها از خاک و کمپوست به روش سری رقت روی محیط‌کشت عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار در دمای ۴۵ و ۵۰ درجه سلسیوس انجام شد. در مجموع، ۲۴ جدایه قارچ متحمل به گرما و گرمادوست به دست آمد. شناسایی اولیه جدایه‌ها براساس ویژگی‌های رشدی و ریخت‌شناسی و با استفاده از کلیدهای تاکسونومیکی معتبر صورت گرفت. برای شناسایی مولکولی، دی.ان.ای.، جدایه‌ها با استفاده از کیت خالص‌سازی دی.ان.ای. ژنومی استخراج و ناحیه ITS rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1 و ITS4 تکثیر شد. قطعات ۷۰۰–۵۰۰ جفت بازی به دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، خالص‌سازی، توالی‌یابی و ویرایش شده و در بانک ژن ثبت شدند. با استفاده از ابزار جستجوی BLAST، توالی‌های ITS rDNA به دست آمده در این بررسی با سایر آرایه‌های معتبر مستخرج از بانک ژن مقایسه شد. در نهایت نه گونه شامل: *Aspergilus fumigatus*، *A. nidulans*، *A. niger*، *A. terrus*، *Melanocarpus albomyces**، *Malbranchea cinnamomea**، *Thermomyces dupontii**، *Th. lanuginosus** و *Thielavia arenaria** شناسایی شد که گونه‌های ستاره‌دار برای فلور قارچی ایران جدید می‌باشند. فراوانی قارچ‌های گرمادوست در کمپوست ضایعات شهری بیش‌تر از خاک بود و گونه‌های آسپرژیلوس فراوان‌ترین قارچ‌های شناسایی شده در این تحقیق بودند.

واژه‌های کلیدی: ریخت‌شناسی، نواحی رونویسی شده داخلی، فیلوژنی، *Sordariales*، *Onygenales*

Isolation and identification of thermotolerant and thermophilic fungi from soil and compost in Kermanshah province, Iran

Received: 07.04.2020 / Accepted: 08.07.2020

Zahra Yousofvand: MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

Samad Jamali✉: Assistant Prof. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran (jamali454@yahoo.com)

Hadi Khateri: Assistant Prof. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

Summary

An investigation was carried out on the occurrence of thermotolerant and thermophilic fungi in 11 soil samples collected from cultivated and natural regions in Kermanshah province (Mahidasht, Harsin, Kerend, Eslamabad-e Gharb, Qasr-e Shirin, Sarpol-e Zahab, Javanrood, Gilan-e Gharb), municipal waste compost and mushroom compost, 2017–19. Fungal isolates were recovered using the soil dilution plate method on potato dextrose agar at 45 and 50 °C. Totally, 24 isolates were obtained that were primarily identified using morphological characters and referring to valid taxonomic keys. DNA extraction was carried out using a Genomic DNA Purification kit. The ITS region (ITS1-5.8S-ITS2) of the ribosomal DNA was amplified using ITS1 and ITS4 primers. Fragments about 500–700 bp were amplified after sequencing deposited in GenBank. Based on morphological characters and sequence data of the ITS rDNA, these fungi were identified as: *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terrus*, *Melanocarpus albomyces**, *Malbranchea cinnamomea**, *Thermomyces dupontii**, *Th. lanuginosus**, and *Thielavia arenaria**. Asterisks indicate species that are new records for the mycobiota of Iran. The abundance of thermophilic fungi in municipal waste compost was higher than soil, and *Aspergillus* species were the most abundant fungi identified in this study.

Keywords: ITS rDNA, morp**h**ology, *Onygenales*, phylogeny, *Sordariales*

* مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده نخست به راهنمایی دکتر صمد جمالی ارایه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی

ROSTANIHA

مقدمه

یکی از مهم‌ترین فاکتورهای کلیدی برای رشد و زنده ماندن میکروارگانیسم‌ها دما می‌باشد (Maheshwari *et al.* 2000b). قارچ‌ها براساس دمای رشد به انواع سرمادوست، مزوفیل و گرمادوست طبقه‌بندی می‌شوند (Sharma 1989). اغلب قارچ‌های شناخته شده مزوفیل هستند که در دمای بین ۳۵–۵ درجه سلسیوس رشد می‌کنند، ولی دمای مطلوب آن‌ها بین ۳۵–۲۵ درجه سلسیوس است (Grishkan 2018). در بین قارچ‌ها، گروه کوچکی قادرند در دمای بالاتر از ۴۵ درجه سلسیوس رشد کنند که به دو گروه متحمل به گرما و گرمادوست تقسیم می‌شوند. حداکثر دمای رشد قارچ‌های گرمادوست ۵۰ درجه یا بالاتر و حداقل دمای رشد آن‌ها ۲۰ درجه سلسیوس است، در حالی که قارچ‌های متحمل به گرما در دمای نزدیک به ۵۰ درجه و برخی زیر ۲۰ درجه سلسیوس رشد می‌کنند (Sharma 1989). در منابع دیگر، اشاره شده که قارچ‌های گرمادوست در دمای ۶۰–۴۵ درجه رشد می‌کنند و بهترین رشد را در ۴۵ و یا بالاتر از ۴۵ درجه سلسیوس دارند (Abdel-Hafez 1982). همچنین، حداکثر دمای رشد یک قارچ گرمادوست ۶۰ درجه، حداقل دمای رشد ۲۰ درجه و دمای مطلوب برای رشد ۵۰ درجه سلسیوس گزارش شده است (Wang *et al.* 2012, Olagoke 2014, Maheshwari *et al.* 2000a).

قارچ‌های گرمادوست از انواع مختلف زیستگاه‌های طبیعی و مصنوعی از جمله اعماق گرم زمین، مناطق آتشفشانی، دریچه‌های آب‌گرم در اعماق دریا و مخازن سوخت هواپیما و زغال‌سنگ گزارش شده‌اند (Sharma 1989, Mehta & Satyanarayana 2013). این قارچ‌ها همچنین از انواع خاک‌ها و زیستگاه‌هایی که در آن تجزیه مواد گیاهی صورت می‌گیرد از جمله کمپوست، توده‌های کاه و کلش، دانه‌های انباری، توده تراشه‌های چوب، فضولات لانه پرندگان و حیوانات، زباله شهری و همچنین سایر انباشت‌های مواد آلی جداسازی شده‌اند که این محیط‌ها گرم، مرطوب و هوازی بوده و شرایط مناسبی را برای رشد و توسعه این قارچ‌ها فراهم می‌کنند (Salar 2018). قارچ‌های گرمادوست در اکوسیستم نیز نقش به سزایی در فرایند تولید سوخت زیستی (Palatsi *et al.* 2009) ایفا می‌نمایند.

رشد قارچ‌های خوراکی از طریق تحریک رشد میسلیوم، فرآوری محصولات کشاورزی، تجزیه زیستی لیگنوسلولازها، فضولات حیوانات و دیگر پسماندها دارند (Sharma 1989). قارچ‌های گرمادوست، همچنین سمیت یون‌های فلزات سنگین را تحمل می‌کنند و برخی حتی می‌توانند در غلظت بالای یون‌های فلزات، زنده مانده و رشد کنند و به تعداد زیادی از کاتیون‌های فلزی اتصال پیدا کنند. به علاوه، برخی از این میکروارگانیسم‌ها قادر به تولید نانو-ذرات نیز هستند (Tiquia-Arashiro & Rodrigues 2016). قارچ‌های گرمادوست آنزیم‌هایی با قدرت فعالیت در دماهای بالا تولید می‌کنند که آنزیم‌های ترموزایم نامیده می‌شوند و معمولا دما و اسیدیته بالا را تحمل می‌کنند (Ahirwar *et al.* 2017).

اغلب قارچ‌های گرمادوست جزو راسته‌های *Eurotiales*، *Sordariales* و *Mucorales* بوده (Salar & Aneja 2007, Berka *et al.* 2011) و به ندرت از راسته‌های دیگر گزارش شده‌اند. با توجه به اهمیت قارچ‌های گرمادوست در اکوسیستم و از طرفی عدم اطلاعات کافی در خصوص گونه‌های گرمادوست در ایران، مطالعه حاضر با هدف شناسایی قارچ‌های متحمل به گرما و گرمادوست موجود در خاک و کمپوست استان کرمانشاه و بررسی فراوانی این گونه‌ها در این بستره‌ها انجام شد.

روش بررسی

نمونه‌برداری طی سال‌های ۹۸–۱۳۹۶ از خاک مناطق مختلف شهرستان‌های کرمانشاه (ماهیدشت، هرسین، کرند، اسلام‌آباد، قصرشیرین، سرپل‌ذهاب، جوانرود و گیلانغرب)، کمپوست ضایعات شهری (شرکت بازیافت مواد و تولید کود آلی) و کمپوست قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach (کارگاه پرورش قارچ خوراکی در شهر کرمانشاه) صورت گرفت. در مورد نمونه‌برداری از خاک، ابتدا بقایای گیاهی سطح خاک کنار-زده شده و نمونه‌ها از عمق ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری جمع‌آوری شدند. تعداد پنج نمونه به وزن یک کیلوگرم از هر منطقه جمع‌آوری و در نهایت یک نمونه مرکب به وزن دو کیلوگرم پس از ثبت مشخصات کامل (تاریخ و محل نمونه‌برداری) در پاکت مقوایی به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه برای بررسی‌های بیولوژیکی بلافاصله مورد استفاده قرار گرفتند. برای نمونه‌برداری از کمپوست ضایعات شهری از مرحله دوم کمپوست‌سازی (فاز گرمادوستی) و نمونه‌برداری از کمپوست قارچ به صورت تازه صورت گرفت.

ROSTANIHA

- پارامترهای فیزیکوشیمیایی خاک

برای اندازه‌گیری هدایت الکتریکی و pH خاک، به ۲۰ گرم خاک ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه (نسبت ۲:۱/۵)، پس از دو ساعت تکان دادن و عبور از کاغذ صافی واکنش خاک (pH) و هدایت الکتریکی خاک (EC) با دستگاه AC meter مدل Consort C833 اندازه‌گیری شد (Gee & Bauder 1986).

برای اندازه‌گیری آهک خاک، به دو گرم خاک، ۲۵ سی‌سی اسید کلریدریک یک نرمال اضافه شد. پس از حرارت و اضافه کردن ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر، پنج قطره معرف فنول فتالین به ارلن‌ها اضافه شد و در آخر با سود سوزآور (NaOH) تیتر صورت گرفت. مقدار مصرف سود سوزآور تا ایجاد رنگ ارغوانی به عنوان عدد تیتراسیون ثبت گردید (Loeppert & Suarez 1996). برای اندازه‌گیری کربن آلی از روش والکلی و بلاک (Walkley & Black 1934) استفاده شد. در این روش خاک با اسید سولفوریک غلیظ و دی‌کرومات پتاسیم مجاور و بعد از اتمام واکنش اکسیداسیون و احیا، زیادی دی‌کرومات پتاسیم با فروآمونیوم سولفات تیتر شد. آنالیز بافت خاک با روش هیدرومتر صورت گرفت.

- جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

برای جداسازی قارچ‌های گرمادوست از خاک و کمپوست، یک گرم خاک یا کمپوست را در ۹ سی‌سی آب مقطر سترون ریخته و سری رقت 10^{-1} تا 10^{-3} تهیه شد، سپس از هر رقت یک سی‌سی روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل (۰/۰۲ گرم در لیتر) و دی‌استرپتومایسین (۰/۰۵ گرم در لیتر) در سه تکرار ریخته شد (Kalpana *et al.* 2013). تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۴۵ درجه و ۵۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۷٪ قرار داده شدند. برای اندازه‌گیری دما و رطوبت، از دستگاه دماسنج و رطوبت‌سنج (HTC-1) استفاده شد. نمونه‌ها هر روز مورد بازدید قرار گرفته و در صورت ظهور ریسه قارچ، به ترتیب به محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار و سپس آب-آگار منتقل و خالص‌سازی به روش نوک ریسه انجام گرفت. نگهداری جدایه‌ها تا زمان مطالعه در لوله‌های حاوی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس انجام شد. تعدادی از جدایه‌های منتسب به گونه‌های قارچی جدید برای میکوبیوتای ایران در حال حاضر در کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران (IRAN) واقع در مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) نگهداری می‌شوند.

- شناسایی قارچ‌ها براساس خصوصیات ریخت‌شناسی

از کشت‌های خالص برای شناسایی قارچ‌های گرمادوست استفاده شد. شناسایی براساس بررسی صفات ماکروسکوپی جدایه‌ها روی محیط‌کشت‌های سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) و عصاره مالت-آگار (MEA) و صفات میکروسکوپی روی محیط کشت‌های اختصاصی هر جنس و با استفاده از کلیدهای تاکسونومیکی معتبر قارچ‌شناسی انجام شد (Cooney & Emerson 1964, Apinis 1967, Millner *et al.* 1977, Straatsma & Samson 1993, Chen & Chen 1996, Guarro *et al.* 1996, Mouchacca 1997). برای بررسی ریخت‌شناسی و تاکسونومیکی جدایه‌ها، حداقل ۵۰ عدد از هر کدام از اندام‌های قارچی اندازه‌گیری شدند. برای تهیه نمونه‌های میکروسکوپی از محلول اسید فوشین و کاتن بلو استفاده شد. از صفات مذکور با استفاده از میکروسکوپ نوری المپوس مدل BX51 متصل به دوربین دینوکاپچر (X2) عکس‌برداری گردید.

- اثر دما بر رشد شعاعی جدایه‌ها

هدف از این قسمت پژوهش، تعیین دماهای کمینه، بهینه و بیشینه رشد رویشی جدایه‌های قارچی بود. برای این منظور، رشد شعاعی جدایه‌ها در محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار و دماهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس مورد مطالعه قرار گرفت. دیسک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه‌های در حال رشد فعال که به مدت یک روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه داشته شده بودند، در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار قرار داده شدند. هر جدایه از هر تیمار در سه تکرار کشت گردید. قطر پرگنه قارچ در دو جهت عمود برهم هر روز یک بار و تا یک هفته اندازه‌گیری شد.

شناسایی مولکولی قارچ‌ها

- استخراج و تکثیر دی.ان.ای.

استخراج دی.ان.ای. از کشت هفت روزه جدایه‌های منتخب روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار با استفاده از روش CTAB و همچنین استفاده از کیت‌های شرکت ایده‌سازان زیستی زاگرس و Cinnapure-DNA Kit (50t-PR881613-EX6011) ساخت ایران براساس دستور شرکت سازنده صورت گرفت. در استخراج دی.ان.ای. با روش CTAB (Gardes & Bruns 1993)، ۵۰–۱۰ میلی‌گرم میسیلیوم قارچ در هاون چینی سترون و یا داخل میکروتیوپ سترون به وسیله سرسمپلر آبی به خوبی کوبیده شد. سپس ۵۰۰

POSTANIFA

میکرولیتر بافر CTAB و ۰/۱ میلی‌گرم پروتئیناز کا (Proteinase K، سیناکلون) به آن اضافه شد و یک ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور)، به مایع رویی ۵۰۰ میکرولیتر تریس اشباع شده با فنول، کلروفرم و ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) افزوده شد و محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. سپس به مایع رویی ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم و ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) اضافه و پس از سانتریفیوژ به مایع رویی ۱۰۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴- درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، نمونه‌ها از یخچال خارج و به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. رسوب دی.ان.ای. در ۳۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس جهت بررسی‌های بعدی نگهداری شد.

ناحیه ITS (ITS1-5.8S-ITS2) دی.ان.ای. ریبوزومی با استفاده از ترکیب آغازگرهای عمومی ITS1 (5-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3) و ITS4 (5-TCCTCCGCTTATTGATATGC–3) توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شد (White *et al.* 1999). مواد مورد استفاده در هر واکنش ۱۰ نانوگرم از دی.ان.ای. الگو، یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، ۱۰۰ میکرولیتر از $MgCl_2$، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (200 میلی‌مول بافر Tris-HCL با pH=8، 500 میلی‌مول KCL) و 100 میکرومول BSA در یک حجم ۲۵ میکرولیتری از واکنش بود. تکثیر این ناحیه ژنی با استفاده از برنامه شامل چرخه واسرشتگی ابتدایی با دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر مدل TPersonal (Biometra, USA) انجام گرفت. قطعات تکثیر شده برای توالی‌سنجی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد و از یک جهت با استفاده از آغازگر ITS1 توالی‌سنجی شدند.

- آنالیزهای فیلوژنتیکی

ویرایش توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در این تحقیق به روش دستی و با استفاده از نسخه ۷.۱ نرم‌افزار BioEdit (Hall 1999) همراه با بررسی چشمی کروماتوگرام‌ها صورت گرفت. توالی‌های نوکلئوتیدی ویرایش شده (جدول ۱) با ابزار BLASTn (نسخه 2.10.0+) (Altschul *et al.* 1997, Zhang *et al.* 2000) با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مقایسه شدند (جدول ۲). توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BankIit به بانک ژن (GenBank) ارایه و شماره دسترسی برای مطالعات بعدی دریافت شد.

ردیف‌سازی ابتدایی توالی‌های ویرایش شده با نرم‌افزار ClustalW انجام شد و متعاقبا به صورت دستی در نرم‌افزار BioEdit تنظیماتی روی آن صورت گرفت. موقعیت‌های ضعیف در هم‌ردیفی و فواصل توالی‌ها از هم‌ردیفی نهایی هر مجموعه داده با استفاده از نرم‌افزار Gblocks (نسخه ۹۱/۰b) حذف شدند (Castresana 2000). درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor-joining (Saitou & Nei 1987) و بیشینه احتمال با نرم‌افزار MEGA5 ترسیم شد (Kumar *et al.* 2011). مدل‌های مورد استفاده در این دو روش به ترتیب p-distance و Kimura 2-parameter بود. از گونه *Paecilomyces variotii* با شماره دسترسی GU966669 به عنوان گروه خارجی استفاده شد. پایداری انشعابات درخت‌های ترسیم شده به وسیله آزمون اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار ارزیابی شد.

نتیجه

در این بررسی، ۱۱ نمونه خاک از مناطق مختلف استان کرمانشاه جمع‌آوری شد که تنها از چهار منطقه هرسین، گیلانغرب، جوانرود و سرپل‌ذهاب قارچ‌های گرمادوست و متحمل به گرما جداسازی شد (جدول ۱). در جداسازی با روش سری رقت، تنها از رقت 10^{-1} جداسازی صورت گرفت. در جدول ۳، نتایج آنالیز بافت و مواد آلی نمونه‌های خاک که قارچ‌های گرمادوست و متحمل به گرما از آن‌ها جداسازی شده، نشان داده شده است. فراوانی قارچ‌های گرمادوست و یا متحمل به گرمای جداسازی شده از خاک بسیار پایین بود و بیش‌ترین تعداد جدایه از خاک شهرستان سرپل‌ذهاب که از جمله مناطق گرم استان است، به دست آمد. به استثنای گونه *Thielavia arenaria* Mouch. که گرمادوست بود و در دمای ۴۵ درجه سلسیوس رشد کرد و بقیه جدایه‌های به دست آمده از خاک، متحمل به گرما بودند. در میان قارچ‌های جداسازی شده از خاک، بیش‌ترین فراوانی مربوط به

ROSTANIHA

گونه‌های آسپرژیلوس بود. گونه *Aspergillus fumigatus* Fresen، از تمام بستره‌ها جداسازی شد.

در جداسازی قارچ‌های گرمادوست و متحمل به گرما از نمونه‌های کمپوست ضایعات شهری (۲ نمونه) و کمپوست قارچ خوراکی (یک نمونه)، جداسازی در تمام رقت‌ها از 10^{-1} تا 10^{-3} انجام شد. جدایه‌های مربوط به کمپوست ضایعات شهری همگی گرمادوست بودند و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس رشد سریعی داشتند. جدایه‌های به دست آمده از کمپوست قارچ خوراکی نیز همگی متحمل به گرما بودند و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس رشد نکردند (جدول ۱). خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک‌هایی که قارچ‌های گرمادوست و متحمل به گرما از آن‌ها جداسازی شده است در جدول ۳ نشان داده شده است.

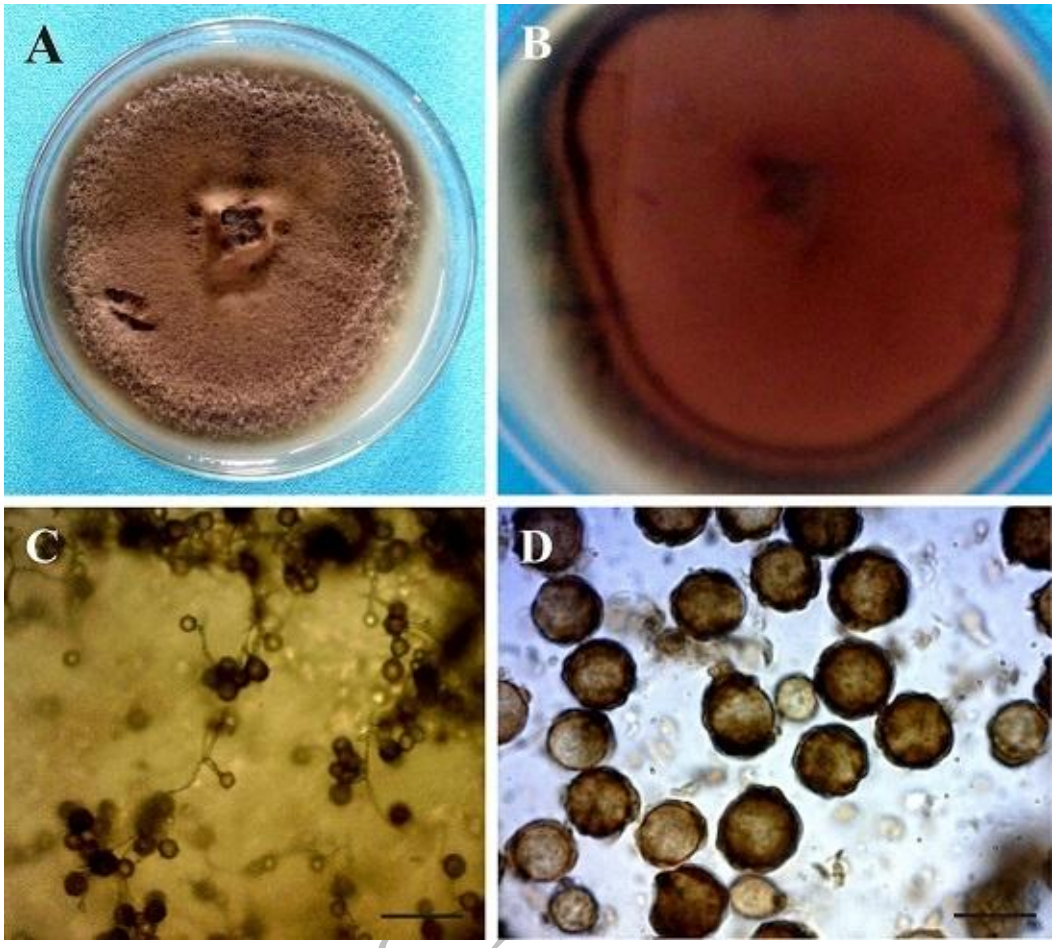
در این بررسی، تعداد ۱۱ جدایه از خاک‌های مناطق مختلف، نه جدایه از کمپوست ضایعات شهری و چهار جدایه از کمپوست قارچ خوراکی به دست آمد. قارچ‌های شناسایی شده براساس خصوصیات ریخت‌شناسی متعلق به پنج جنس شامل *Aspergillus* Micheli، *Malbranchea* Sacc.، *Melanocarpus* Arx، *Thermomyces* Tsikl. و *Thielavia* Zopf بودند. تکثیر ناحیه ITS rDNA جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق، منجر به ایجاد یک قطعه ۵۰۰ تا ۷۰۰ جفت بازی شد. آنالیز توالی‌های ITS rDNA جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق با استفاده از ابزار جستجوی بلاست نشان داد که میزان همولوژی این جدایه‌ها با دیگر جدایه‌های معتبر موجود در بانک ژن از سایر کشورها ۹۸ تا ۱۰۰ درصد است. براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و مقایسه توالی‌های ناحیه ITS rDNA، تعداد نه گونه شناسایی شد که عبارت بودند از: *Aspergillus fumigatus* (چهار جدایه)، *A. nidulans* Winter (سه جدایه)، *A. niger* Tiegh. (یک جدایه)، *A. terreus* Thom (چهار جدایه)، *Melanocarpus albomyces* Arx* (دو جدایه)، *Malbranchea cinnamomea* Oorschot & de Hoog* (دو جدایه)، *Thermomyces dupontii** (دو جدایه)، *Th. lanuginosus* Houbraken & Samson (دو جدایه)، *Thielavia arenaria** Tsikl.* (دو جدایه) و (یک جدایه). در آنالیز فیلوژنتیکی (شکل ۳) جدایه‌های ما با ضریب اطمینان بالا در کنار سایر جدایه‌های معتبر از دنیا در گروه‌های تک‌نیایی قرار گرفتند. گونه‌های ستاره‌دار برای فلور قارچی ایران جدید می‌باشند که توصیف آن‌ها به شرح ذیل ارایه می‌شود:

۱- *Thermomyces lanuginosus* Tsikl., Annales de l'Institut Pasteur 13: 500 (1899)

رشد شعاعی پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار در دمای ۴۵ درجه سلسیوس بعد از گذشت پنج روز، ۸ سانتی‌متر بود. رنگ پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار در ابتدا سفید و مخملی و به تدریج قهوه‌ای مایل به سبز تا سیاه بود. رنگ سطح پشتی پرگنه قرمز مایل به قهوه‌ای تا سیاه بود. ریسه‌ها در این گونه بی‌رنگ، بنددار و به عرض ۴–۱/۵ میکرومتر بود. کنیدیوفورها کوتاه، به رنگ خرمایی تا قهوه‌ای، ۱۵–۱۰ × ۳–۲ میکرومتر، راست یا کمی خمیده، معمولا بدون انشعاب و به ندرت منشعب بود. کنیدیوم‌زایی به صورت بلاستیک و کنیدیوم‌ها منفرد، کروی، به اندازه ۱۲–۷ میکرومتر، قبل از بلوغ بی‌رنگ و با دیواره صاف و زمان بلوغ قهوه‌ای تیره، کروی و دیواره دارای نقوش بود (شکل ۱).

یک جدایه از این گونه (RUF-Tl1) از کمپوست ضایعات شهری جداسازی شد. این گونه، در دمای ۵۰ درجه سلسیوس رشد سریعی داشت. مطالعه توالی ناحیه ITS rDNA نشان داد که طول این ناحیه حدود ۵۸۸ جفت باز است. براساس جستجوی BLAST، توالی این ناحیه با ۱۰۰٪ شباهت و ۱۰۰٪ هم‌پوشانی به گونه *Thermomyces lanuginosus* (MK334212) شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی MN994454 در بانک ژن ثبت شد.

POSTANHA



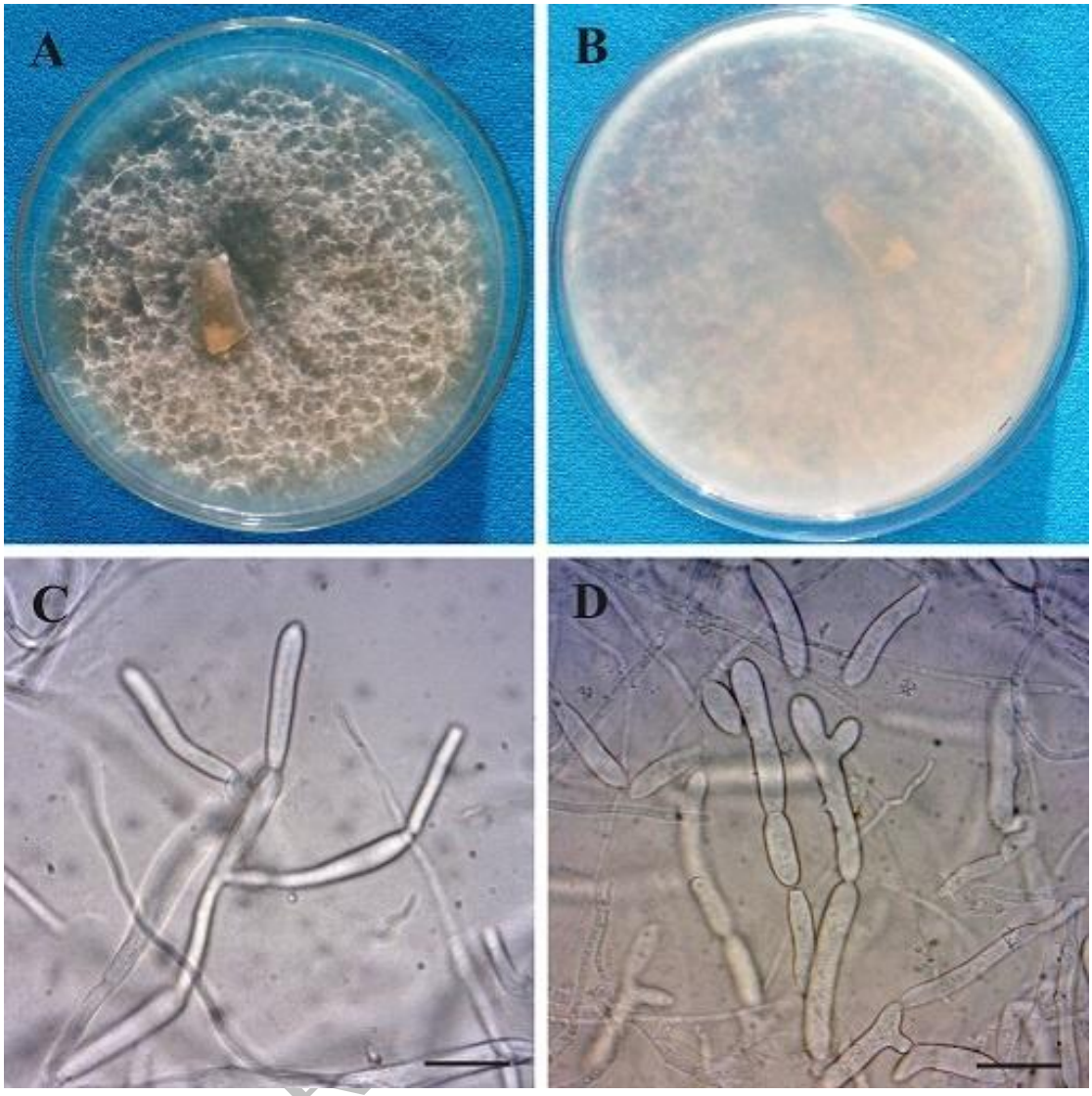
شکل ۱- *Thermomyces lanuginosus* (IRAN 3916C): A. پرگنه روی محیط‌کشت PDA پس از چهار روز در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، B. سطح پشتی پرگنه C. کنیدیوفورها، D . کنیدیوم‌ها (مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر در شکل C و ۵ میکرومتر در شکل D).

Fig. 1. *Thermomyces lanuginosus* (IRAN 3916C): A. Colony on PDA medium after four days at 45 °C, B. Reverse of colony on PDA medium after four days at 45 °C, C. Conidiophores, D. Conidia (Bars = 10 µm at C and 5 µm at D).

۲- *Melanocarpus albomyces* (Cooney & R. Emers.) Arx, Studies in Mycology 8: 17 (1975)

پرگنه‌ها روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار به رنگ سفید بود و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس رشد سریعی داشت. رشد شعاعی قارچ روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار در دمای ۴۵ درجه سلسیوس بعد از سه روز، ۲۰ میلی‌متر و بعد از یک هفته ۷-۸ سانتی‌متر بود. در پرگنه این جدایه‌ها، ریسه‌های هوایی و چسبیده به کف تشتک پتری مشاهده شد. رنگ سطح پشتی پرگنه سفید مایل به کرمی رنگ بود. ریسه‌های هوایی نازک و بنددار با عرض متغیر بین ۸–۲ میکرومتر و ریسه‌های چسبیده در محل بند فرورفته، منشعب و تشکیل آرتروسپورهای بی‌رنگ، بلند سیلندری و تا حدودی خمیده با دیواره ضخیم و به ابعاد ۵۷–۲۵ × ۸–۵ میکرومتر می‌کردند. آسکوکارپ‌ها در این جدایه‌ها مشاهده نشد (شکل ۲).

دو جدایه از این گونه (RUF-Ma1, RUF-Ma2) از کمپوست ضایعات شهری جداسازی شد. مطالعه توالی ناحیه ITS rDNA ریبوزومی نشان داد که طول این ناحیه برای هر دو جدایه حدود ۵۵۰ جفت باز است. براساس جستجوی BLAST، توالی این ناحیه با ۹۹/۶۳ برای جدایه RUF-Ma1 و ۱۰۰٪ شباهت برای جدایه RUF-Ma2 و هم‌پوشانی ۹۳٪ برای جدایه RUF-Ma1 و ۹۷٪ برای جدایه RUF-Ma2 به *Melanocarpus albomyces* (KX976679) شباهت داشت. جدایه RUF-Ma1 با شماره دسترسی MN641034 و جدایه RUF-Ma2 با شماره دسترسی MN944462 در بانک ژن ثبت شدند.



شکل ۲- *Melanocarpus albomyces* (IRAN 3868C): A. پرگنه روی محیط‌کشت PDA پس از سه روز در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، B. سطح پشتی پرگنه روی محیط‌کشت PDA پس از سه روز در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، C. ریسه و آرتروکنیدیوم‌ها، D. آرتروکنیدیوم‌ها (مقیاس‌ها = ۵ میکرومتر).

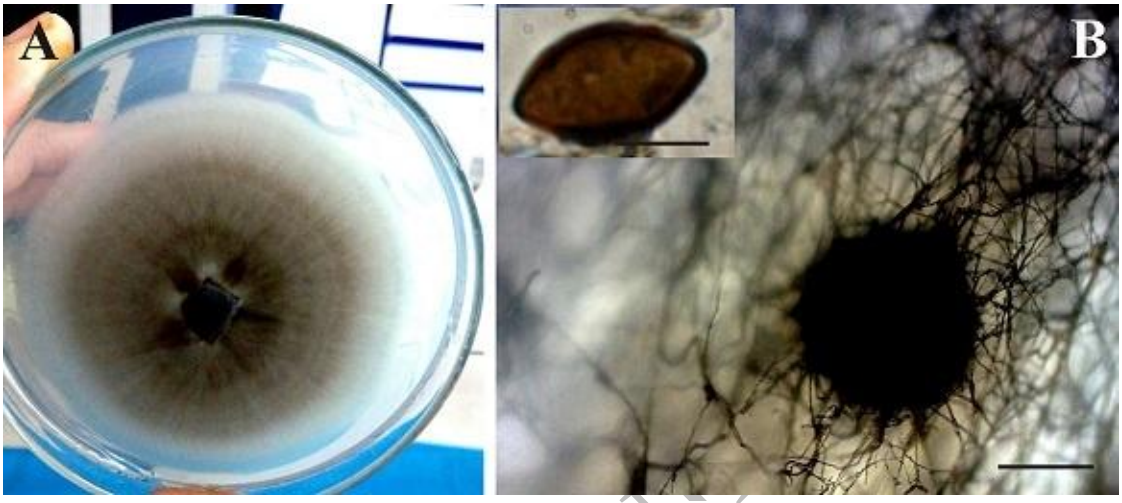
Fig. 2. *Melanocarpus albomyces* (IRAN 3868C): A. Colony on PDA medium after three days at 45 °C, B. Reverse of colony on PDA medium after three days at 45 °C, C. Hyphae and arthroconidia, D. Arthroconidia (Bars = 5 µm).

۳- *Thielavia arenaria* Mouch., Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France 89: 308 (1973)

رشد شعاعی پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار بعد از سه روز، ۱/۵ سانتی‌متر بود. رنگ پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار در ابتدا بی‌رنگ و پس از رشد کامل، قهوه‌ای مایل به سیاه بود. این گونه، روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار حاوی اسید لاکتیک هیچ رشدی نداشت. رنگ سطح پشتی پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار قهوه‌ای تیره تا سیاه بود. آسکوکارپ‌ها بدون استیول، گرد تا بیضوی، تخم‌مرغی، به رنگ سیاه، پوشیده شده با ریسه‌های تیره و به قطر ۱۲۰–۵۵ میکرومتر بود. آسک‌ها چماقی شکل، پایه‌دار، دارای هشت آسکوسپور و به ابعاد ۱۳/۵–۱۰ × ۲۹–۲۶ میکرومتر بود. آسکوسپورها بیضوی یا دوکی شکل، دارای دیواره ضخیم، به رنگ قهوه‌ای تیره، دارای سطح صاف، با یک سوراخ تندشی

نزدیک به انتها و به اندازه ۶/۵–۵ × ۱۳–۹ میکرومتر بود (شکل ۳).

یک جدایه متعلق به این گونه (RUF-Ta1) از خاک بکر هرسین جداسازی شد. این گونه، در دمای ۴۵ درجه سلسیوس جداسازی شد و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس رشد سریعی داشت. مطالعه توالی ناحیه ITS rDNA نشان داد که طول این ناحیه حدود ۴۹۲ جفت باز است. براساس جستجوی BLAST، توالی این ناحیه با ۹۹/۳۸٪ شباهت و ۹۹٪ هم‌پوشانی به گونه *Thielavia arenaria* (KP101209) شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی MK479298 در بانک ژن ثبت شد.



شکل ۳- *Thielavia arenaria* (IRAN 3517C): A. پرگنه روی محیط‌کشت PDA پس از سه روز در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، B. آسکوکارپ و آسکوسپور، C. ریسه و آرتروکنیدیوم‌ها (مقیاس‌ها = ۵ میکرومتر).

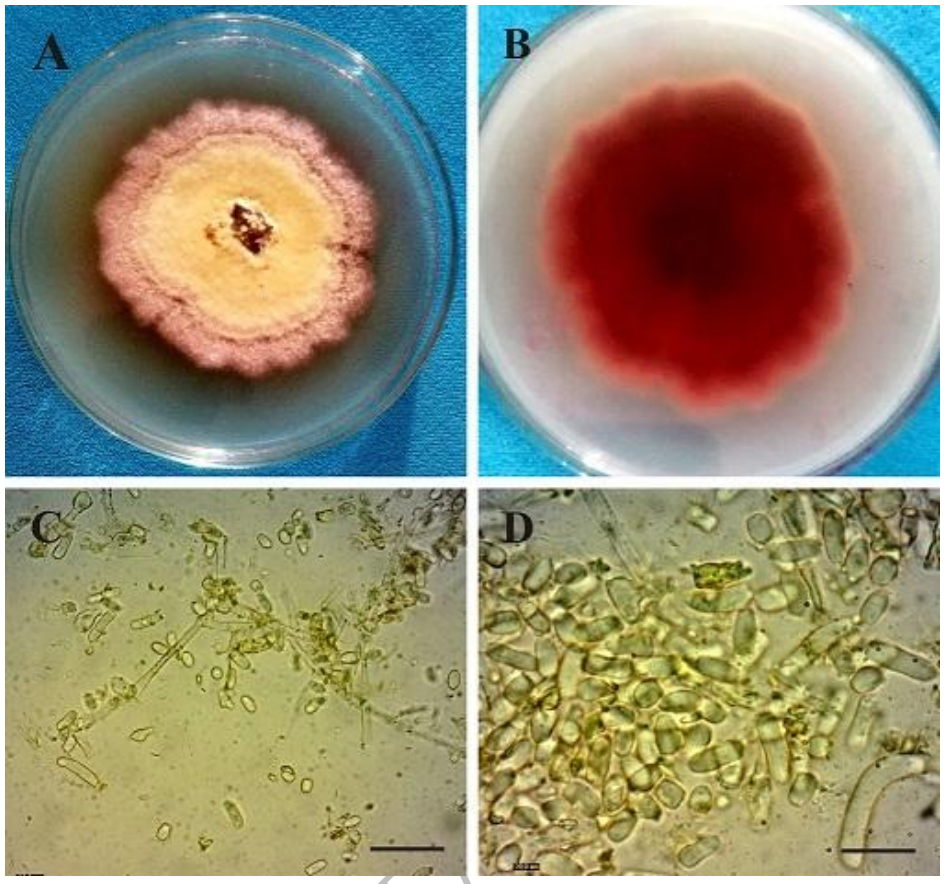
Fig. 3. *Thielavia arenaria* (IRAN 3517C): A. Colony on PDA medium after three days at 45 °C, B. Ascocarp and ascospores, C. Hyphae and arthroconidia (Bars = 5 µm).

۴- *Malbranchea cinnamomea* (Lib.) Oorschot & de Hoog, Mycotaxon 20 (1): 129 (1984)

رشد شعاعی پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار بعد از سه روز در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، ۲ سانتی‌متر و بعد از یک هفته، ۸ سانتی‌متر بود. مرکز پرگنه در ابتدا به رنگ سفید بود که بعدا به رنگ‌های صورتی روشن، سفید و زرد تغییر کرد. پرگنه‌ای که به طور کامل رشد کرده بوی تند ماهی فاسد شده می‌داد. رنگ سطح پشتی پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار قرمز تیره مایل به قهوه‌ای بود. ریسه‌ها بی‌رنگ، دارای سطح صاف و عرض ریسه‌ها متغیر و از ۴ تا ۹ میکرومتر بود. آرتروکنیدیوم‌ها استوانه‌ای، داسی شکل و خمیده، صاف، در ابتدا بی‌رنگ و سپس زرد تا زرد مایل به سبز، ۵/۷–۵/۳ × ۵/۴–۵/۲ و غالبا به اندازه ۷–۴ × ۵–۳ میکرومتر بود (شکل ۴).

یک جدایه متعلق به این گونه (RUF-Mc1) از کمپوست ضایعات شهری جداسازی شد. پرگنه این جدایه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار در دمای ۵۰ درجه سلسیوس رشد سریعی داشت. مطالعه توالی ناحیه ITS rDNA نشان داد که طول این ناحیه حدود ۶۲۵ جفت باز است. براساس جستجوی BLAST، توالی این ناحیه با ۱۰۰٪ شباهت و ۹۸٪ هم‌پوشانی، به گونه *Malbranchea cinnamomea* (MF838862) شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی MN944465 در بانک ژن ثبت شد.

POSTAN



شکل ۴- *Malbranchea cinnamomea* (IRAN 3869C): A. پرگنه روی محیط‌کشت PDA پس از سه روز در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، B. سطح پشتی پرگنه، C. ریسه مولد آرتروکنیدیوم‌ها، D. آرتروکنیدیوم‌ها (مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر در شکل C و ۵ میکرومتر در شکل D).

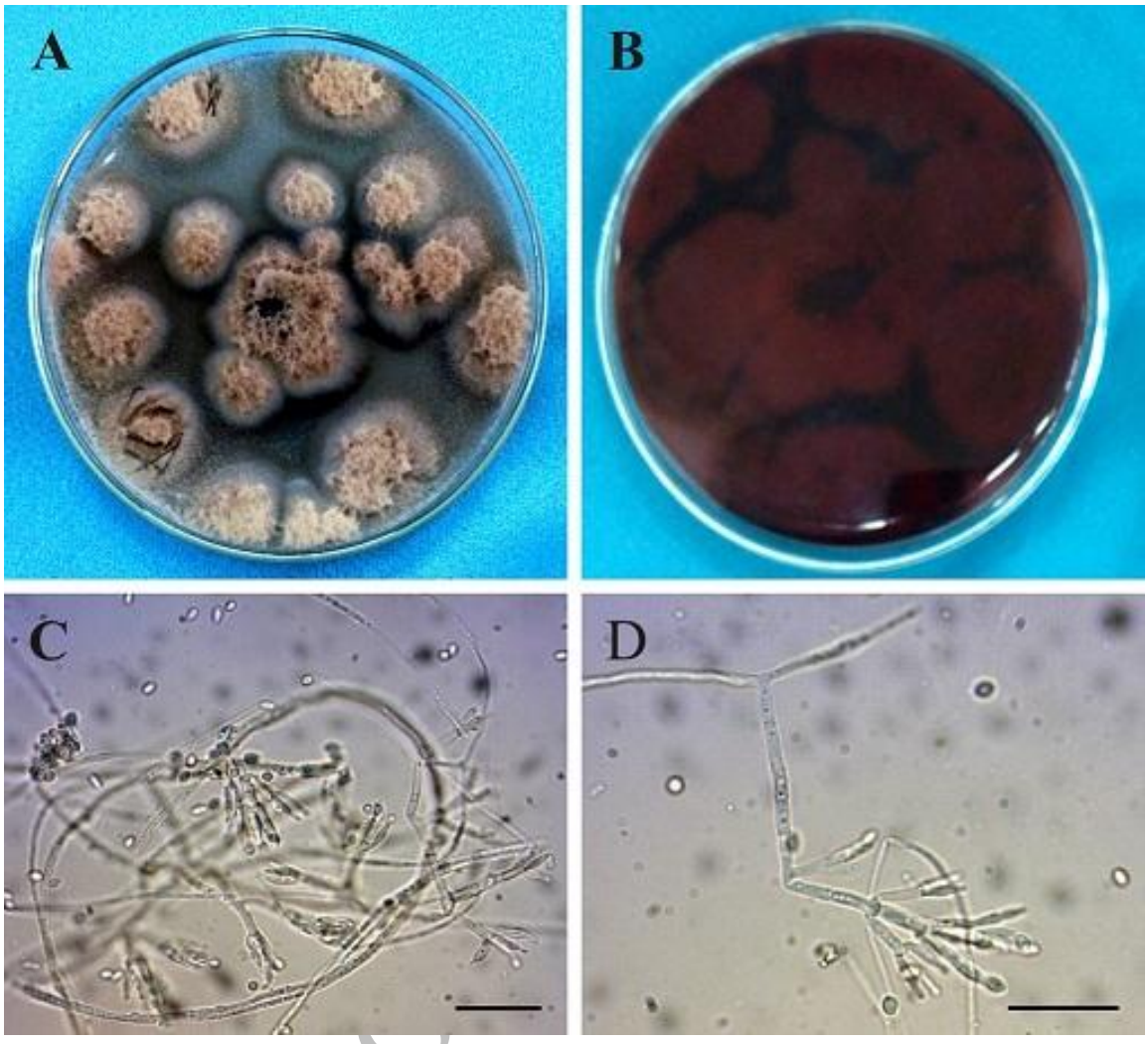
Fig. 4. *Malbranchea cinnamomea* (IRAN 3869C): A. Colony on PDA medium after three days at 45 °C, B. Reverse of colony on PDA medium after three days at 45 °C, C. Hyphae and arthroconidia, D. Arthroconidia (Bars = 10 µm at C and 5 µm at D).

ROST

۵- *Thermomyces dupontii* (Griffon & Maublanc), Advances in Applied Microbiology 86: 218 (2014)

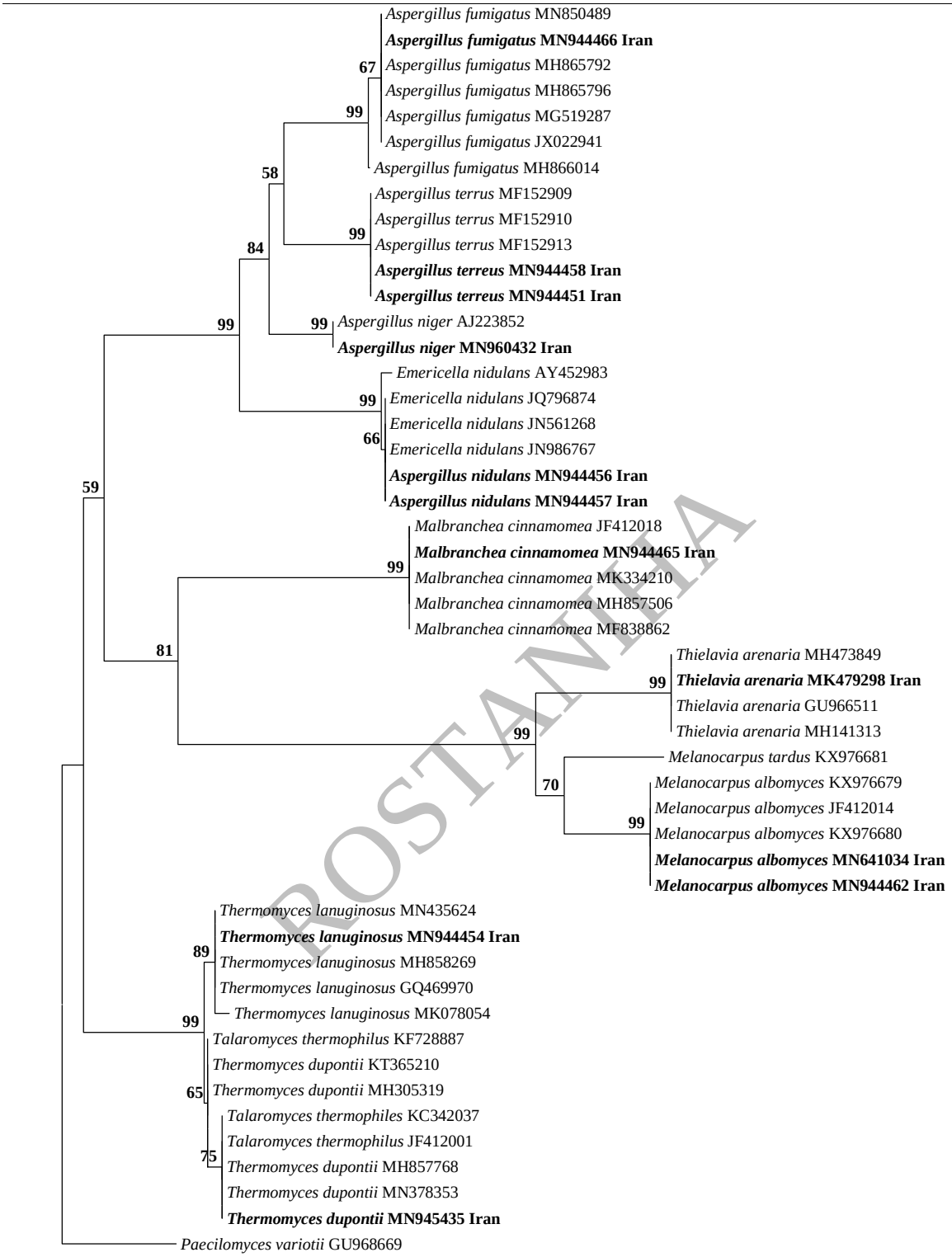
رشد شعاعی پرگنه روی محیط‌کشت عصاره مالت-آگار سریع و پس از گذشت یک هفته در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، ۶ سانتی‌متر بود. رنگ پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار در ابتدا سفید و سپس به سبز خاکستری تیره تغییر یافت. سطح پشتی پرگنه روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار سفید مایل به خاکستری بود. عرض ریسه در این گونه ۳–۲ میکرومتر بود. کنیدیوفورها کوتاه، ۲۸–۷ × ۳–۲ میکرومتر، ساده یا منشعب، بنددار و به صورت جانبی تا عمود روی ریسه‌های هوایی تشکیل شدند. کنیدیوفورها به رنگ قهوه‌ای روشن، سطح صاف، دارای انشعابات مونوورتیسیله، با یک تا ۴ فیالید و گاهی بای‌ورتیسیله و به اندازه ۳–۲ × ۶–۵ میکرومتر بود. فیالیدها واگرا و به اندازه ۲–۱/۵ × ۱۱–۸ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها به رنگ زرد سبز، صاف، تخم‌مرغی تا بیضوی و به اندازه ۳–۱/۵ × ۴/۵–۲ میکرومتر بود. آسکوکارپ‌ها در محیط‌کشت دیده نشد (شکل ۵).

یک جدایه از این گونه (RUF-Td1) از کمپوست ضایعات شهری جداسازی شد. این گونه، در دمای ۵۰ درجه سلسیوس روی محیط‌کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار رشد سریعی داشت. مطالعه توالی ناحیه ITS rDNA نشان داد که طول این ناحیه حدود ۴۱۸ جفت باز است. براساس جستجوی BLAST، توالی این ناحیه با ۱۰۰٪ شباهت و ۹۷٪ هم‌پوشانی به گونه *Thermomyces duponti* (KC342037) شباهت داشت. این جدایه با شماره دسترسی MN945435 در بانک ژن ثبت شد.



شکل ۵- *Thermomyces dupontii* (IRAN 3917C): A. پرگنه روی محیط‌کشت PDA پس از سه روز در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، B. سطح پشتی پرگنه، C-D. فیالیدها و کنیدیوم‌ها (مقیاس‌ها = ۵ میکرومتر).

Fig. 5. *Thermomyces dupontii* (IRAN 3917C): A. Colony on PDA medium after three days at 45 °C, B. Reverse of colony on PDA medium after three days at 45 °C, C-D. Phialids and conidia (Bars = 5 µm).



ROSTANIHA

شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از روش Neighbor-joining. اعداد روی محل انشعاب شاخه‌ها نشان‌دهنده مقادیر بوت‌استرپ با ۱۰۰۰ بار تکرار است. توالی‌های مطالعه حاضر بولد شده‌اند.

Fig. 6. The phylogenetic tree based on Neighbor-joining method. Numbers on the branched are the bootstrap values (%) with 1000 replications. The bold sequences refer to isolates in this study.

جدول ۱- اطلاعات قارچ‌های متحمل به گرما و گرمادوست به دست آمده از خاک و کمپوست در استان کرمانشاه

Table 1. General information tolerance and termophilic fungi recovered from soil and compost in Kermanshah province (Iran)

Taxon	Strain	Locality	Substrate	"IRAN" herbarium accession number	GenBank accession number, ITS rDNA	Optimum temperature °C	Maximum temperature °C
Aspergillus fumigatus	RUF-Af2	Gilan-e Gharb	Soil	-	MN944466	40	42–45
A. nidulans	RUF-An2	Javanrood	Soil	-	MN944456	40	42–45
A. nidulans	RUF-An1	Sarpol-e Zahab	Soil	-	MN944457	40	42–45
A. niger	RUF-Ani	Sarpol-e Zahab	Soil	-	MN960432	25	40–42
A. terrus	RUF-At1	Sarpol-e Zahab	Soil	-	MN944451	40	42–45
A. terrus	RUF-At3	Javanrood	Soil	-	MN944458	40	42–45
Malbranchea cinnamomea	RUF-Mc2	Kermanshah	Compost (municipal waste)	IRAN 3869C	MN944465	45–48	52
Melanocarpus albomyces	RUF-Ma1	Kermanshah	Compost (municipal waste)	-	MN641034	45–48	50
M. albomyces	RUF-Ma2	Kermanshah	Compost (municipal waste)	IRAN 3868C	MN944462	45–48	50
Thermomyces dupontii	RUF-Td1	Kermanshah	Compost (municipal waste)	IRAN 3917C	MN945435	45–48	50
Th. lanuginosus	RUF-TL1	Kermanshah	Compost (municipal waste)	IRAN 3916C	MN994452	45–48	55
Thielavia arenaria	RUF-Ta1	Harsin	Soil	IRAN 3517 C	MK479298	40	42–45

جدول ۲- اطلاعات توالی‌های اخذ شده از بانک ژن

Table 2. Isolates of fungi used in this study, their locations and their NCBI GenBank

Taxon	Strain	Locality	Host/Substrate	GenBank accession number, ITS rDNA
Aspergillus fumigatus	AFK11	South Korea	Marine-derived algae	JX022941
A. fumigatus	*Cordyceps sinensis*	China	*Cordyceps sinensis*	MG519287
A. fumigatus	CBS 132357	USA	-	MH866014
A. fumigatus	CBS 130590	Netherlands	-	MH865796
A. fumigatus	CBS 130578	Netherlands	-	MH865792
A. fumigatus	DSE 17	India	Plant	MN850489
A. terrus	Asp-7802	India	-	MF152909
A. terrus	Asp-7801	India	-	MF152910
A. terrus	Asp-7798	India	-	MF152913
A. niger	CBS 554.65	Spain	-	AJ223852
Emericella nidulans	YX4	China	-	JQ796874
E. nidulans	F5-05	China	Fermentation starters	JN561268
E. nidulans	DHMJ15	USA	-	JN986767
E. nidulans	Tm-6	Taiwan	*Taxus chinensis* var. *mairei*	AY452983
Paecilomyces variotii	DTO 63E9	Netherlands	-	GU968669
Malbranchea cinnamomea	FCH 10.5	Vietnam	-	MF838862
M. cinnamomea	CBS 343.55	Netherlands	-	MH857506
M. cinnamomea	NAUCP2	China	Compost	MK334210
M. cinnamomea	CBS 343.55	Canada	-	JF412018
Melanocarpus albomyces	CBS 638.94	USA	Chicken nest straw	KX976679
M. tardus	CBS 541.76	Switzerland	Cotton jacket	KX976681
M. albomyces	ATCC 16460	Canada	-	JF412014
M. albomyces	CBS 747.70	UK	Coal pit refuse	KX976680
Talaromyces thermophilus	F1208	China	-	KF728887
T. thermophilus	WYN9	China	-	KC342037
T. thermophilus	NRRL 2155	Canada	-	JF412001
Thermomyces dupontii	CBS 236.58	USA	-	MH857768

ROSTANIHA

جدول ۲ (ادامه) **Table 2 (contd)**

T. dupontii	db15	Turkey	Hot spring water	MN378353
T. dupontii	TAFCs1	USA	Corn grain from a corn bin	KT365210
T. dupontii	BRM043938	Brazil	Composting mass	MH305319
Th. lanuginosus	C9	Pakistan	Garam Chashma hot spring Chitral	MK078054
T. lanuginosus	SS-8	India	-	GQ469970
T. lanuginosus	CBS 224.63	Switzerland	-	MH858269
T. lanuginosus	KMM 4681	Russia	-	MN435624
Thielavia arenaria	Y.H. Yeh V0622	Taiwan	*Vitex rotundifolia*	MH141313
T. arenaria	QD20	China	-	GU966511
T. arenaria	CK1156	USA	Biocrust soil	MH473849

جدول ۳- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک‌هایی که قارچ‌های متحمل به گرما و گرمادوست از آن‌ها جداسازی شده در استان کرمانشاه

Table 3. Physico-chemical character of soils that tolerance and termophilic fungi were recovered from them in Kermanshah province (Iran)

Locality	Latitude	Longitude	Elevation	pH	EC	Carbon (%)	Organic matter (%)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)
Harsin	3797239	726616	1410	8.04	391	37.7	2.3	35	44	20
Harsin	379480	732204	1550	7.98	545	39.5	2.1	45	42	12
Javanrood	344154	4640325	1320	7.87	1759	53.2	1.8	21	46	32
Sarpol-e Zahab	3800261	588962	780	8.04	1054	35.2	0.94	35	46	18
Gilan-e Gharb	3790706	588883	791	8.9	386	56.5	2.4	39	48	12

ROSTANIHA

بحث

در این پژوهش، در مجموع تعداد ۲۴ جدایه قارچی شامل نه جدایه گرمادوست و ۱۵ جدایه متحمل به گرما از نمونه‌های خاک مناطق مختلف استان کرمانشاه، کمپوست ضایعات شهری و کمپوست قارچ خوراکی در دمای ۵۰–۴۵ درجه سلسیوس جداسازی شد. جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق به دو گونه از راسته *Sordariales* (*Thielavia arenaria, Melanocarpus albomyces*)، یک گونه از راسته *Onygenales* (*Malbranchea cinnamomea*) و شش گونه از راسته *Eurotiales*، شامل *Aspergillus terrus*، *A. nidulans*، *A. fumigatus*، *A. niger*، *Thermomyces lanuginosus* و *Th. dupontii* تعلق داشتند. بیش‌ترین جدایه‌ها از راسته *Eurotiales* بود که در نتایج سایر محققان نیز گزارش شده است (Mouchacca 1997, Maheshwari *et al*. 2000a). شناسایی گونه‌ها براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و با استفاده از کلیدهای تاکسونومیکی معتبر انجام گرفت (Klich & Pitt 1988, Mouchacca 1997, Klich 2004, Salar & Aneja 2007). ویژگی‌های ریخت‌شناسی اغلب گونه‌های شناسایی شده در این بررسی منطبق با گونه‌های شناخته شده در مونوگراف‌های مربوط به گونه‌های قارچی بود، هر چند تفاوت‌های ریخت‌شناسی بین جدایه‌ها روی محیط‌کشت‌های مختلف اغلب قابل مشاهده بود. مارکرهای مولکولی مختلفی تاکنون برای شناسایی گونه‌های گرمادوست و متحمل به گرما استفاده شده است که از جمله آن‌ها توالی ناحیه نسخه‌برداری شده داخلی دی‌ان‌ای ریبوزومی است (Schwarz *et al*. 2006, Sharma *et al*. 2008). در این مطالعه، توالی ناحیه ITS و خصوصیات ریخت‌شناسی برای شناسایی گونه‌های گرمادوست و متحمل به گرما استفاده شد. درصد تشابه بالا بین توالی‌های جدایه‌های مطالعه حاضر و جدایه‌های معتبر در پایگاه اطلاعاتی با استفاده از ابزار جستجوی بلاست شناسایی ریخت‌شناسی گونه‌های ما را تایید کرد. آنالیز فیلوژنتیکی با دو روش الحاق مجاور (neighbor-joining) (شکل ۶) و بیشینه احتمال (maximum likelihood) انجام گرفت که آنالیز دوم در اینجا نشان داده نشده است (Saitou & Nei 1987, Kumar *et al*. 2011). توپولوژی درخت‌های ترسیمی با هر دو روش یکسان بود و تنها اختلاف جزیی در ضریب پایداری انشعابات مشاهده شد. توپولوژی درخت‌های ترسیمی با هر دو روش یکسان بود و تنها اختلاف جزیی در ضریب پایداری انشعابات مشاهده شد.

از ۱۱ نمونه خاک نمونه‌برداری شده، تنها از چهار منطقه جدایه‌های متحمل به گرما به دست آمد. خاک هر چهار منطقه مورد بررسی، قلیایی و با میزان ماده آلی کم و لومی سیلتی بود (جدول ۳). معمولا تعداد زادمایه قارچ‌های گرمادوست در خاک کم و تنوع آن‌ها تحت تاثیر فاکتورهای محیطی متعدد از جمله ماده آلی خاک، آب خاک، اسیدیته و بقایای گیاهی می‌باشد (Gochenaur 1975). در ایران، تا کنون مطالعه‌ای در این خصوص انجام نگرفته و لازم است تحقیقات بیش‌تری انجام گردد.

در مطالعه حاضر، گونه *Aspergillus fumigatus* بیش‌ترین فراوانی در میان گونه‌های آسپرژیلوس جداسازی شده از کمپوست قارچ خوراکی و خاک را داشت. این قارچ در کمپوست قارچ خوراکی باعث کاهش سطح NH_3 و در نتیجه کاهش سمیت در اسپان برای قارچ *Agaricus bisporus* می‌شوند (Ross & Harris 1983). هیچکدام از گونه‌های آسپرژیلوس در مطالعه حاضر از کمپوست ضایعات شهری جداسازی نشدند. در فاز دوم کمپوست ضایعات شهری که دمای بالا استفاده می‌شود، تنها قارچ‌های گرمادوست قادر به بقا و فعالیت هستند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اکثر گونه‌های آسپرژیلوس متحمل به گرما هستند که با نتایج سایر محققان مطابقت داشت (Cooney & Emerson 1964, Tansey & Brock 1978). در میان گونه‌های آسپرژیلوس جداسازی شده، دمای بهینه برای *A. niger* کم‌تر از سایر گونه‌ها و ۲۵ درجه سلسیوس بود، درحالی‌که دمای بهینه برای گونه‌های *Aspergillus fumigatus*، *A. terrus* و *A. nidulans* دمای ۴۰ درجه سلسیوس بود. شایان ذکر است، تمام گونه‌های آسپرژیلوس شناسایی شده در این مطالعه قبلا از ایران گزارش شده بودند (Ershad 2009).

علاوه بر گونه‌های *Aspergillus*، گونه *Thielavia arenaria* نیز متحمل به گرما بود به نحوی که دمای بهینه برای رشد آن ۴۰ درجه سلسیوس و بیشینه دما ۴۲ تا ۴۵ درجه سلسیوس بود. این قارچ که در این تحقیق از خاک جداسازی شد، تا کنون از خاک‌های جنگلی، بیابانی و کود دامی از کشورهای چین و ایالات متحده در دمای ۴۵ و ۵۰ درجه سلسیوس گزارش شده است. از این گونه برای تولید آنزیم بتا-مانانز (beta-mannanase) که کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی دارد، استفاده شده است (Lu *et al.* 2013). این گونه، برای فلور قارچی ایران جدید گزارش می‌شود.

از کمپوست ضایعات شهری، چهار گونه قارچ به دست آمد که همگی گرمادوست بوده و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قادر به رشد بودند. گونه *Thermomyces lanuginosus* برای نخستین بار در سال ۱۸۹۹ به طور اتفاقی از یک سیب‌زمینی بیمار در خاک باغچه جداسازی شد. سپس، این قارچ روی نان در دمای ۵۳–۵۲ درجه سلسیوس کشت داده شده و واکنش‌های حرارتی آن بررسی گردید (Mouchacca 1997). این گونه تا کنون، از توده‌های کاه و کلش، کمپوست زباله‌های جامد شهری، خاک جنگلی، خاک بیابان و مناطق معتدل جداسازی شده است (Abdel-Hafez 1982, Caretta *et al.* 2019, Ellis & Keane 1981, Hsu & Agoramoorthy 2001, Maheshwari *et al.* 1987, Salar & Aneja 2006, Sandhu & Singh 1981). در این بررسی، گونه فوق از کمپوست ضایعات شهری نیز جداسازی شد. این گونه که از رایج‌ترین گونه‌های گرمادوست است، علاوه بر موارد مذکور، از بقایای گیاه آموفیلا [*Ammophila arenaria* (L.) Link]، دانه‌های ذرت پوسیده، خاک چشمه آب‌گرم، کمپوست قارچ خوراکی، ذغال‌سنگ خام، هوا، فیلترهای تهویه، نخل‌های روغنی، برنج‌های انباری، غلاف بادام‌زمینی، تفاله نیشکر، دانه‌های غلات ذخیره شده، هسته‌های پالم، تراشه‌های چوب، الیاف نیشکر و توتون نیز جداسازی شده است (Sharma 1989). این گونه همچنین، به عنوان عامل بیماری‌زای انسانی از کشور پاکستان گزارش شده (Abbas *et al.* 2009)، ولی برای فلور قارچی ایران جدید گزارش می‌شود.

گونه *Melanocarpus albomyces* نیز از جمله قارچ‌های گرمادوست بوده که از بستره‌های زیادی از جمله خاک لوم باغ، خاک جنگل، خاک چشمه آب‌گرم، ذغال‌سنگ خام، هوا، فیلترهای تهویه، نخل‌های روغنی، برنج‌های انباری، بادام‌زمینی، کمپوست، الیاف نیشکر و توتون جداسازی شده است. در این مطالعه، گونه مذکور از کمپوست ضایعات شهری جداسازی شد که برای فلور قارچی ایران جدید گزارش می‌شود.

گونه *Malbranchea cinnamomea* تنها گونه در این جنس با ماهیت گرمادوستی است و سایر گونه‌های این جنس مزوفیل هستند (Salar & Aneja 2007). این گونه که به راحتی قابل تشخیص بود، از انواع مختلفی از بستره‌ها از جمله لجن فاضلاب هضم شده، زباله، چوب پوسیده و کمپوست ضایعات جامد شهری گزارش شده است (Mouchacca 1997, Hüttner *et al.* 2017).

قارچ‌های گرمادوست توانایی زیادی در تولید مواد فعال بیولوژیکی دارند. گونه مذکور برای تولید آنتی‌بیوتیک و آنزیم‌های زایلاناز و ماناز مورد استفاده قرار گرفته است (Chiung *et al.* 1993, Morgenstern *et al.* 2012, Maijala *et al.* 2012).

ROSTANIHA

در این مطالعه، این گونه، از کمپوست ضایعات شهری جداسازی شد که برای فلور قارچی ایران جدید گزارش می‌شود.

گونه *Thermomyces dupontii* با نام قدیمی *Talaromyces thermophilus* نیز از جمله قارچ‌های گرمادوستی است که از مخزن‌های ذغال‌سنگ، مواد گیاهی پوسیده لانه تمساح، خاک‌های زراعی و بیابانی، کمپوست قارچ خوراکی، خاک نزدیک چشمه‌های آب‌گرم با اسیدیته خنثی و قلیایی و بذر ذرت گزارش شده است (Mouchacca 1997, Houbraken *et al.* 2014). در این مطالعه، گونه مذکور از کمپوست ضایعات شهری جداسازی شد که برای فلور قارچی ایران جدید گزارش می‌شود.

در ایران، بررسی‌ها در خصوص قارچ‌های گرمادوست با توجه به اهمیت و کاربرد آن‌ها در صنایع غذایی، تولید آنزیم و آنتی‌بیوتیک و همچنین کمپوست‌سازی بسیار مختصر است. لذا در این مطالعه، پنج گونه از قارچ‌های گرمادوست نخستین بار برای فلور قارچی ایران گزارش می‌شوند. امید است تحقیق حاضر زمینه‌ساز تحقیقات بیش‌تر در آینده باشد.

References

Abbas, S.Q., Niaz, M., Maan, A., Iqbal, J., Waqas, M., Ahmed, H., Liaqat, A. & Sidra, A. 2009. A report of *Thermomyces lanuginosus* Tsiklinsky on humans from Pakistan. Pakistan Journal of Botany 41: 1429–1432.

Abdel-Hafez, S.I.I., Moubasher, A.H. & Abdel-Fattah, H.M. 1977. Studies on mycoflora of salt marshes in Egypt. IV. Osmophilic fungi. Mycopathologia 62: 143–151.

Abdel-Hafez, S. 1982. Thermophilic and thermotolerant fungi in the desert soils of Saudi Arabia. Mycopathologia 80: 15–20.

Ahirwar, S., Soni, H., Prajapati, B.P. & Kango, N. 2017. Isolation and screening of thermophilic and thermotolerant fungi for production of hemicellulases from heated environments. Mycology 8: 125–134.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389–3402.

Apinis, A.E. 1967. *Dactylomyces* and *Thermoascus*. Transactions of the British Mycological Society 30: 573–582.

Arashiro, S. & Rodrigues, D.F. 2016. Extremophiles: Applications in Nanotechnology. Springer International Publishing AG. 208 pp.

Berka, R.M., Grigoriev, I.V., Otillar, R., Salamov, A., Grimwood, J., Reid, I. & *et al*. 2011. Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. National Biotechnology 29: 922–927.

Caretta, G., Del Frate, G., Della Franca, P., Guglielminetti, M., Mangiarotti, A.M. & Savino, E. 2019. Studies on the occurrence of fungi in a wheat-field. Boletín Micológico 3(1): 55–70.

Castresana, J. 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. Molecular Biology and Evolution 17: 540–552.

Chen, K.Y. & Chen, Z.C. 1996. A new species of *Thermoascus* with a *Paecilomyces* anamorph and other thermophilic species from Taiwan. Mycotaxon 50: 225–240.

Chiung, Y.M., Fujita, T., Nakagawa, M., Nozaki, H., Chen, G.-Y., Chen, Z.-C. & Nakayama, M. 1993. A novel quinone antibiotic from *Malbranchea cinnamomea* TAIM 13T54. The Journal of Antibiotics 46: 1819–1826.

Cooney, D.G. & Emerson, R. 1964. Methods of Isolation and Culture. Pp. 8–13. *In*: Thermophilic Fungi, an Account of their Biology, Activities and Classification. San Francisco: Freeman, W.H. & Company.

Ellis, D. & Keane, P. 1981. Thermophilic fungi isolated from some Australian soils. Australian Journal of Botany 29: 689–704.

Ershad, D. 2009. Fungi of Iran. Ministry of Jihad-e-Agriculture. 531 pp.

ROSTANIHA

Gochenaur, S.E. 1975. Distributional patterns of mesophilous and thermophilous microfungi in two Bahamian soils. Mycopathologia 57(3): 155–164.

Grishkan, I. 2018. Thermotolerant mycobiota of Israeli soils. Journal of Basic Microbiology 58: 30–40.

Guarro, J., Abdullah, S.K., Al-Bader, S.M., Figueras, M.J. & Gene, J. 1996. The genus *Melanocarpus*. Mycological Research 100: 75–78.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, pp. 95–98. Proceedings of the Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.

Houbraken, J., de Vries, R.P. & Samson, R.A. 2014. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. Advances in Applied Microbiology 86: 199–249.

Hsu, M.J. & Agoramoorthy, G. 2001. Occurrence and diversity of thermophilous soil microfungi in forest and cave ecosystems of Taiwan. Fungal Diversity 7: 27–33.

Hüttner, S., Nguyen, T.T., Granchi, Z., Chin-A-Woeng, T., Ahrén, D., Larsbrink, J., Thanh, V. N. & Olsson, L. 2017. Combined genome and transcriptome sequencing to investigate the plant cell wall degrading enzyme system in the thermophilic fungus *Malbranchea cinnamomea*. Biotechnology for Biofuels 10: 265.

Kalpana, C., Prem, L., Reena, K. & Anita, D. 2013. Characterization and detection of enzyme (amylase) produced by amylolytic fungi isolated from agricultural soil. International Journal of Current Technical Report Research 2(1): 311–319.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. 2011. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. Molecular Biology and Evolution 35: 1547–1549.

Lu, H., Zhang, H., Shi, P., Luo, H., Wang, Y., Yang, P. & Yao, B. 2013. A family 5 β-mannanase from the thermophilic fungus *Thielavia arenaria* XZ7 with typical thermophilic enzyme Features. Applied Microbiological Biotechnology 97(18): 8121–8128.

Maheshwari, R., Bharadwaj, G. & Bhat, M.K. 2000. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64: 461–488.

Maheshwari, R., Kamalam, P.T. & Balasubramanyam, P.V. 1987. The biogeography of thermophilic fungi. Current Science 56(4): 151–155.

Maijala, P., Kango, N., Szijarto, N. & Viikari, L. 2012. Characterization of hemicellulases from thermophilic fungi. Antonie van Leeuwenhoek 101: 905–917.

Mehta, D. & Satyanarayana, T. 2013. Diversity of Hot Environments and Thermophilic Microbes. Pp. 3–60. *In*: Satyanarayana, T., Littlechild, J. & Kawarabayasi, Y. (eds). Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology. Springer, Dordrecht.

Millner, P.D., Motta, J.J. & Lentz, P.L. 1977. Ascospores, germ pores, ultrastructure, and thermophilism in *Chaetomium*. Mycologia 69: 720–733.

Morgenstern, I., Powlowski, J., Ishmael, N., Darmond, C., Marqueteau, S., Moisan, M.C., Quenneville, G. & Tsang, A. 2012. A molecular phylogeny of thermophilic fungi. Fungal Biology 116: 489–502.

Mouchacca, J. 1997. Thermophilic fungi: biodiversity and taxonomic status. Cryptogamie Mycologie 18: 19–69.

Olagoke, O.A. 2014. Amylase activities of some thermophilic fungi isolated from municipal solid wastes and palm-kernel stack. American Journal of Microbiology and Biotechnology 1: 64–70.

Palatsi, J., Laureni, M., Andrés, M., Flotats, X., Nielsen, H.B. & Angelidaki, I. 2009. Strategies for recovering inhibition caused by long chain fatty

ROSTANIHA

acids on anaerobic thermophilic biogas reactors. Bioresource Technology 100: 4588–4596.

Ross, R.C. & Harris, P.J. 1983. The significance of thermophilic fungi in mushroom compost preparation. Scientia Horticulturae 20: 61–70.

Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4: 406–425.

Salar, R.K. 2018. Thermophilic fungi: Basic concepts and biotechnological applications. CRC Press.

Salar, R.K. & Aneja, K.R. 2006. Thermophilous fungi from temperate soils of northern India. Journal of Agricultural Technology 2: 49–58.

Salar, R.K. & Aneja, K.R. 2007. Thermophilic fungi: taxonomy and biogeography. Journal of Agricultural Technology 3: 77–107.

Sandhu, D. & Singh, S. 1981. Distribution of thermophilous microfungi in forest soils of Darjeeling (Eastern Himalayas). Mycopathologia 74: 79–85.

Schwarz, P., Bretagne, S., Gantier, J.C., Garcia-Hermoso, D., Lortholary, O., Dromer, F. & Dannaoui, E. 2006. Molecular identification of Zygomycetes from culture and experimentally infected tissues. Journal of Clinical Microbiology 44: 340–349.

Sharma, H.S.S. 1989. Economic importance of thermophilous fungi. Applied Microbiology and Biotechnology 31: 1–10.

Sharma, M., Chadha, B.S., Kaur, M. Ghatora, S.K. & Saini, H.S. 2008. Molecular characterization of multiple xylanase producing thermophilic/thermotolerant fungi isolated from composting materials. Letters in Applied Microbiology 46: 526–535.

Straatsma, G. & Samson, R.A. 1993. Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. Mycological Research 97: 321–328.

Tansey, M.R. & Brock, T.D. 1978. Microbial Life at High Temperatures: Ecological Aspects. Pp. 369–380. *In*: D.J. Kushner (ed.). Microbial Life in Extreme Environments. Academic Press, London.

Wang, Y., Fu, Z., Huang, H., Zhang, H., Yao, B., Xiong, H. & Turunen, O. 2012. Improved thermal performance of *Thermomyces lanuginosus* GH11 xylanase by engineering of an N-terminal disulfide bridge. Bioresource Technology 112: 275–279.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18: 315–322.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. Journal of Computational Biology 7: 203–214.

ROSTANIHA