

Research Article

Evaluation of the effect of carbon, nitrogen sources, and moisture levels on optimizing gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* in solid and submerged culture systems

Fatemeh Rahimi^{✉1}, Ebrahim Sedaghati¹, Hossein Alaei¹, Rosa Dargahi²



¹ Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Vali-e-asr University, Rafsanjan, Iran

² Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran

Corresponding author

✉Faterahimi@gmail.com

Abstract

Keywords

Agricultural Waste Recycling, Bakanae, Secondary Metabolites, Solid and Submerged Fermentation, Spectrophotometer

Fusarium fujikuroi is recognized as a primary natural source of bioactive gibberellic acid hormone production. The present study investigates the effects of organic nitrogen sources and inorganic carbon at different moisture levels on the production of gibberellic acid by *F. fujikuroi* (isolate 134), isolated from North Khorasan province, Iran. The optimization of gibberellic acid production was carried out in two culture systems, solid and submerged, and through successive screening steps. Qualitative evaluation of the metabolite was carried out using spectroscopic methods. In solid culture, four organic substrates were investigated, with soybean meal yielding an average production of 16.66 mg/g, significantly outperforming the others due to its high protein content and good degradability. The other three substrates (citrus pulp, rice bran, and wheat bran) were not significantly different. Also, the effect of initial moisture content (5, 10, 15, and 20 mL) showed that 10 mL of water was the most optimal level. In submerged culture, among the four carbon sources, including glycerol, glucose, mannitol, and molasses, mannitol was the most effective, followed by molasses, glycerol, and glucose, respectively. This study provides practical and cost-effective solutions for the industrial production of gibberellic acid by identifying the best isolate (134), inexpensive substrate (soybean meal), carbon source (mannitol), and optimal moisture conditions (10 mL). Increasing the yield of the superior strain by using genetic methods, developing the production process on a semi-industrial scale through simultaneous optimization of key factors and the use of a bioreactor, evaluating the effectiveness of the final product on target plants, and ensuring the biosafety of the industrialized strain are among the proposed solutions for future research.

Received: 5 November 2025

Revised: 8 March 2026

Accepted: 15 March 2026

Available online: 16 March 2026

Cite this article:

Rahimi F, Sedaghati E, Alaei H, Dargahi R, 2026. Evaluation of the effect of carbon, nitrogen sources, and moisture levels on optimizing gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* in solid and Submerged culture systems. *J Appl Res Plant Prot* 15 (1): 1–13.

<https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2026.21732>



Copyright© 2026 University of Tabriz, Published by the University of Tabriz.

This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)

ارزیابی تأثیر منابع کربن و نیتروژن، سطوح رطوبت بر بهینه‌سازی تولید جیبرلیک‌اسید توسط قارچ *Fusarium fujikuroi* در سیستم‌های کشت جامد و مایع

فاطمه رحیمی[✉]، ابراهیم صداقتی^۱، حسین علایی^۱، رزا درگاهی^۲

^۱ گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج)، رفسنجان، ایران

^۲ مرکز تحقیقات پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران

نویسنده مسئول: Faterahimi@gmail.com

دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۴ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۲/۱۷ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۲۴

چکیده

قارچ *Fusarium fujikuroi* به عنوان یکی از منابع اصلی تولید هورمون جیبرلیک‌اسید زیست فعال شناخته می‌شود. پژوهش حاضر به بررسی تأثیر منابع نیتروژن آلی و کربن معدنی در سطح رطوبت متعدد بر تولید جیبرلیک‌اسید توسط جدایه ۱۳۴ این قارچ، جداسازی شده از استان خراسان شمالی، می‌پردازد. فرآیند بهینه‌سازی تولید جیبرلیک‌اسید در دو سیستم کشت جامد و مایع و طی مراحل غربالگری متوالی انجام شد. ارزیابی کیفی متابولیت با روش طیف‌سنجی صورت گرفت. در کشت جامد، چهار بستر آلی (کنجاله سویا، تفاله مرکبات، سبوس گندم و سبوس برنج) بررسی شد که کنجاله سویا با میانگین تولید ۶۶/۱۶ میلی گرم بر گرم، به طور معنی‌داری به دلیل محتوای پروتئین بالا و قابلیت تجزیه مناسب، بهترین عملکرد را داشت. سه بستر دیگر از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین، تأثیر سطوح مختلف رطوبت اولیه (۲۰، ۱۵، ۱۰ و ۵ میلی لیتر) نشان داد که تیمار ۱۰ میلی لیتر آب بهینه‌ترین سطح بود. در کشت مایع، از میان چهار منبع کربن (گلیسرول، گلوکز، مانیتول و ملاس)، مانیتول مؤثرترین بود و پس از آن به ترتیب ملاس و گلیسرول و گلوکز قرار گرفتند. این مطالعه با شناسایی بهترین جدایه (۱۳۴)، بستر ارزان (کنجاله سویا)، منبع کربن (مانیتول) و شرایط رطوبتی بهینه (۱۰ میلی لیتر)، راهکارهای عملی و مقرون به صرفه‌ای را برای تولید صنعتی جیبرلیک‌اسید ارائه می‌دهد. افزایش بازده سویه برتر به با کارگیری روش‌های ژنتیکی، توسعه فرآیند تولید در مقیاس نیمه‌صنعتی از طریق بهینه‌سازی همزمان فاکتورهای کلیدی و استفاده از بیوراکتور و ارزیابی اثربخشی محصول نهایی روی گیاهان هدف و تضمین ایمنی زیستی سویه صنعتی‌شده از راهکارهای پیشنهادی برای پژوهش‌های آتی می‌باشد.

کلمات کلیدی: بازیافت ضایعات کشاورزی، باکانا، تخمیر جامد و مایع، طیف‌سنجی، متابولیت‌های ثانویه

مقدمه

(Rodriguez et al. 2024). جیبرلیک‌اسید یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی است که توسط *Fusarium fujikuroi* Nirenberg تولید می‌شود. این قارچ عامل بیماری باکانا یا رشد احمقانه برنج می‌باشد و کشف هورمون جیبرلیک‌اسید اولین بار با مطالعه برهمکنش *F. fujikuroi* و برنج صورت پذیرفت (Crous et al. 2021). جیبرلیک‌اسید ۳ (GA3) دارای کاربردهای گسترده در صنعت و کشاورزی می‌باشد. استفاده از این فراورده به عنوان یک راهبرد کارا در ایجاد یکنواختی رشد محصول، تعیین زمان‌بندی بهینه برداشت و افزایش عملکرد محصول مطرح می‌باشد (Pandya et al. 2023). ارزش بازار این جیبرلیک‌اسید با نرخ رشدی سالانه ۸/۸ درصد، به بیش از یک میلیارد دلار رسیده که نشان‌دهنده اهمیت اقتصادی آن است (Süntar et al. 2021). پس از جنگ جهانی دوم، به دنبال ارتباط آزادتر با ژاپن، دانشمندان در ایالات متحده و انگلستان به اهمیت ترکیبات قندبلند کننده گیاه برنج پی بردند و برنامه‌های تحقیقاتی

تولید برنج (*Oryza sativa* L.) در دنیا از سال ۲۰۰۰ میلادی با چالش‌های جدی مواجه شده، به طوری که جامعه جهانی را نگران فرآیند بروز بحران در تأمین غذا نموده است (Rezvi et al. 2023). کاهش محصول و پائین بودن عملکرد توسط بیماری‌های گیاهی، پدیده جهانی افزایش جمعیت، کاهش اراضی قابل کشت، تغییرات اقلیمی و گرم شدن کره زمین، لزوم یافتن راهکارهای نوین برای افزایش کمیت و کیفیت تولیدات کشاورزی در واحد سطح را ایجاد کرده است (N'guessan et al. 2023). کشور ایران در سال ۲۰۲۲ در مقایسه با سال ۱۹۶۱ میزان یک و شصت و چهار صدم تن در هکتار تغییرات مثبت داشته است و با تولید سه و هفتاد و پنج صدم تن در هکتار در جایگاه شصتم جهان قرار می‌گیرد. راهکارهای رایج در افزایش عملکرد استفاده از ارقام پرمحصول، رعایت پیوستگی عملیات داشت، استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد و کودهای زیستی می‌باشد (Hernandez

فعال در دهه ۱۹۵۰ آغاز شد. ادامه کار در ژاپن منجر به جداسازی و تعیین ساختاری ترکیب فعال اصلی از قارچ، به نام جیبرلیکاسید در انگلستان و جیبرلین-X در ایالات متحده شد، سرانجام نام جیبرلیکاسید مورد توافق قرار گرفت (Takahashi et al. 2012). این ترکیب به‌طور طبیعی توسط گیاهان و میکروارگانیسم‌ها، به‌طور خاص توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها تولید می‌شود. گیاهان حاوی تنها چند میکروگرم جیبرلین به ازای هر کیلوگرم وزن تر در قسمت‌های رویشی هستند (Castro-Camba et al. 2022). تولید جیبرلین‌ها به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه توسط میکروارگانیسم‌ها در شرایط آزمایشگاهی، فرایندی کاملاً وابسته به شرایط کشت و عوامل محیطی است (Murray 2020). سنتز این ترکیبات معمولاً پس از پایان فاز رشد لگاریتمی و در مرحله سکون (Stationary Phase) آغاز می‌شود. عواملی مانند نوع و غلظت منبع کربن و نیتروژن، نسبت کربن به نیتروژن (C/N)، pH محیط، دما، میزان اکسیژن محلول، سرعت هم‌زدن، هوادهی و زمان کشت، تأثیر مستقیمی بر میزان تولید جیبرلین دارند. علاوه بر این، ترکیب محیط کشت و شرایط تغذیه‌ای مناسب می‌تواند مسیرهای متابولیکی را به سمت افزایش تولید این متابولیت ثانویه هدایت کند (Patil et al. 2016). برای دستیابی به تولید بهینه GA3، نسبت کربن به نیتروژن باید به گونه‌ای تنظیم شود که ابتدا رشد میسلیم با نیتروژن محدود حمایت شود و سپس پس از اتمام نیتروژن، تولید GA3 آغاز شده و با تأمین بستر کربن کافی تداوم یابد (Rodrigues et al. 2012). در این فرآیند، فاز تأخیر با تلقیح سریع محیط کشت توسط میسلیم‌های قارچ *F. fujikuroi* آغاز می‌شود. در مرحله رشد متعادل، ابتدا رشد تصاعدی و سپس خطی می‌شود و جذب گلوکز، نیتروژن و سایر مواد مغذی نسبت به افزایش وزن خشک تقریباً ثابت باقی می‌ماند. این مرحله تا زمانی ادامه می‌یابد که یکی از مواد مغذی مصرف شود و سلول‌ها به مرحله کاهش سرعت رشد وارد شوند که در این فاز، تولید جیبرلیکاسید رخ نمی‌دهد (Zhan et al. 2024). مرحله ذخیره‌سازی ابتدایی با حضور گلوکز و تخلیه نیتروژن موجب افزایش وزن خشک سلول‌ها به دلیل تجمع لیپیدها و کربوهیدرات‌ها می‌شود و همزمان تولید جیبرلین‌ها آغاز می‌گردد. مرحله ذخیره‌سازی انتهایی بین حداکثر تشکیل میسلیم و شروع تجزیه نهایی اجزای میسلیم وقوع می‌یابد که در این مرحله فاز اصلی تولید جیبرلین اتفاق می‌افتد. در این فاز، جذب مداوم گلوکز بدون جذب سایر مواد مغذی ادامه دارد و وزن خشک ثابت می‌ماند (Zhan et al. 2024). در سال‌های اخیر، هم راستا با اهداف توسعه پایدار و

اقتصاد چرخشی استفاده از ضایعات کشاورزی به عنوان بستر کم‌هزینه و در دسترس برای کشت قارچ، مورد توجه قرار گرفته است (Adeyemo & Otunola 2017). در زنجیره تأمین مواد غذایی، ضایعات که به معنی مقدار از دست رفته یا هدر رفته در زنجیره های تأمین به دلیل حمل و نقل ضعیف، خراب شدن، عدم تبرید و آسیب از مزرعه به خرده‌فروشی هستند، به ترتیب برنج، گندم، سویا و پرتقال مقدار ۳۳/۸، ۲۹/۱۱، ۱۵/۳۱ و ۴۳/۱۰ میلیون تن هدر رفت در سال ۲۰۲۱ در دنیا داشته اند (Oyedeyi et al. 2024). ضایعات برنج، گندم (Oyedeyi et al. 2024)، کنجاله سویا (Rodrigues et al. 2019)، روغن‌های گیاهی و تفاله مرکبات (de Oliveira et al. 2017)، پتانسیل بالایی را به عنوان منبع نیتروژن ارزان‌قیمت نشان می‌دهند. در فرآیندهای کشت جامد، استفاده از قارچ *F. fujikuroi* و شرایط کم‌آب، به رشد سریع این قارچ و افزایش رقابت‌پذیری آن در برابر عوامل آلوده‌کننده منجر شد. این عوامل در نهایت سبب بهبود ثبات فرآیند و بازدهی تولید گردیدند (Pandey et al. 2008). علاوه بر کربن و نیتروژن، منیزیم، پتاسیم، فسفات و سولفات همگی در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه استفاده شدند (Zhou & Wu, 2011). تمامی عوامل تنظیمی با یکدیگر تعامل کرده و تبدیل پیش‌ماده‌های خارجی به محصولات نهایی مورد نظر را در مسیری منظم و دقیق، به شکلی کارآمد امکان‌پذیر ساخت (Wang et al. 2022). منابع کربن مختلف نقش حیاتی در بهینه‌سازی تولید جیبرلیکاسید ۳ در فرایند کشت مایع ایفا می‌کنند، زیرا این تنظیم‌کننده رشد گیاهی نیازمند تأمین کربن مناسب برای رشد قارچ و فعالیت‌های متابولیکی است. ماهیت و غلظت منابع کربن می‌تواند مسیرهای بیوسنتزی را تحت تأثیر قرار داده و میزان تولید جیبرلیکاسید را افزایش یا کاهش دهد (Kumar et al. 2021). به عنوان مثال، گلوکز به عنوان منبع کربن ساده و سریع، رشد زیست توده قارچ را تسریع می‌کند، اما در غلظت‌های بالا ممکن است به دلیل اثر کاتابولیتی، تولید متابولیت‌های ثانویه مانند GA3 را مهار نماید. گلوکز و ساکارز اغلب به عنوان منابع کربن مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما از غلظت بالای ۲۰ درصد گلوکز در ابتدای کشت باید اجتناب شود، زیرا باعث سرکوب متابولیسم می‌شود. منابع کربن پیچیده‌تر مانند ملاس نیشکر علاوه بر تأمین کربن، حاوی ریزمغذی‌هایی نظیر آهن و منیزیم هستند که می‌توانند به بهبود تولید جیبرلیکاسید کمک کنند و با بازده ۲/۸ گرم بر کیلوگرم بستر، گزینه‌ای اقتصادی و مؤثر معرفی شده است (Karakoc & Aksoez, 2004). استفاده از گلیسرول می‌تواند بازده تولید را تا

به طور متفاوتی تحت تأثیر قرار دهند (Rodrigues et al. 2012). به طور همزمان، رطوبت اولیه به عنوان یک عامل فیزیکی حیاتی، بر تداخل بستر، انتقال اکسیژن، پخش مواد مغذی و در نتیجه بر شرایط ریز محیطی رشد قارچ و کارایی تخمیر تأثیر مستقیم می‌گذارد. مطالعات نشان می‌دهد که اثر این دو عامل غالباً متقابل است؛ به طوری که پاسخ قارچ به یک منبع نیتروژن خاص می‌تواند وابسته به سطح رطوبت محیط باشد (Wang et al. 2023). همچنین، اندازه‌گیری میزان تولید جیبرلیک‌اسید در منابع مختلف نیتروژن و سطح رطوبت اولیه می‌تواند اطلاعات مفیدی درباره اثر استرس‌های آبی یا شرایط آبیاری بر بیان تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در قارچ *F. fujikuroi* ارائه دهد (da Silva et al. 2021).

آزمایش کشت جامد در چهار بستر مختلف (کنجاله سویا، سبوس گندم، سبوس برنج و تفاله مرکبات) انجام شد. به منظور ایجاد یکنواختی در بسترهای کشت آزمایش‌های جامد، مواد اولیه پس از آسیاب شدن از الک با مش ۳۵ عبور داده شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل سطوح مختلف رطوبت (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌لیتر) در هر یک از بسترها بودند. در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر میزان ۱۵ گرم از هر ماده ریخته شد و جهت تأمین رطوبت ارلن به میزان ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به مواد جامد افزوده شد. جهت تنظیم اسیدیته میزان ۲/۵ میکرولیتر اسیدکلریدریک ۱۰ درصد به آن افزوده شد و اسیدیته بر روی ۲/۵ تنظیم گردید (de Oliveira et al. 2017). محیط کشت پس از مسدود کردن دهانه ارلن‌ها با درپوش پنبه‌ای و پوشاندن آنها با فویل آلومینیومی، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شدند. مایه زنی قارچ، پس از سرد شدن محیط‌های کشت استریل، به هر یک دو قطعه (پلاگ) به ابعاد ۱ سانتی‌متر از کشت تازه قارچ *F. fujikuroi* اضافه شد. سپس کلیه ارلن‌ها به مدت هفت روز در انکوباتور با دمای کنترل شده 1 ± 29 درجه سلسیوس و تحت دوره‌ی نوری متناوب ۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی قرار داده شدند. ارلن‌های حاوی کشت پس از خروج از انکوباتور به ازای هر گرم ماده خشک به میزان ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) به آن افزوده شد (Barnet & Barnett. 2008). سپس کشت در شیکر (۱۶۰ دور، 25°C ، ۲ ساعت) قرار گرفت. سوسپانسیون سانتریفیوژ شده (۱۲۰۰ دور، ۱۰ دقیقه) و محلول رویی با اتانول و اسیدهیدروکلریدریک ۳/۷۵ مولار تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر تنظیم شد. در محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۵۰ و

۳۰ درصد نسبت به گلوکز افزایش دهد (Rodrigues et al. 2012). مانیتول نیز با ایجاد استرس اسمزی، مسیرهای سیگنال‌دهی را فعال کرده و بیان ژن‌های مرتبط با بیوسنتز جیبرلیک‌اسید را افزایش می‌دهد. بسیاری از محققان از منابع کربن جایگزین مانند مالتوز، مانیتول، نشاسته، و منابع گیاهی یا مخلوطی از منابع کربن مانند گلیسرول، گلوکز و گالاکتوز استفاده کرده‌اند (Rodrigues et al. 2012).

در این پژوهش به منظور مطالعه و شناسایی کارآمدترین بستر و شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر بازده تولید جیبرلیک‌اسید، در بخش کشت جامد اثر چهار بستر نیتروژن آلی (سبوس گندم، سبوس برنج، کنجاله سویا و تفاله مرکبات) و سطوح مختلف رطوبت (۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌لیتر) مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی قارچ *Fusarium fujikuroi*

در تابستان ۱۴۰۱ از ریشه‌های آلوده برنج رقم دم‌سیاه در مزارع استان خراسان شمالی (مختصات ۴۰s، در ۴۱۶۷۴۶۱ شمالی، ۵۰۱۲۱۹ شرقی، ارتفاع ۵۹۲ متر از سطح دریا) در مرحله رشدی ۷۱۳ که تقریباً در نیمه دوره رشد رویشی خود قبل از گلدهی قرار داشتند، نمونه‌برداری صورت گرفت (Bashyal 2018). جهت جداسازی *Fusarium fujikuroi*، نمونه‌های ریشه آلوده پس از ضدعفونی سطحی (آب‌ژاول ۱۰٪ و شستشو با آب مقطر) روی محیط کشت عمومی PDA کشت شدند و خالص‌سازی با استفاده از روش تک اسپور صورت گرفت. برای شناسایی جدایه‌های *F. fujikuroi* ساختارهای رویشی قارچ در محیط‌های اختصاصی برگ میخک آگار (Carnation Leaf Agar; CLA)، آگار مغذی سنتزی (Synthetic Nutrient Agar; SNA) و آب-آگار (Water Agar)، پس از ۷ تا ۱۴ روز نگهداری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بررسی و با منابع معتبر مقایسه گردیدند (Crous et al. 2019).

تأثیر منابع نیتروژنی آلی و سطح رطوبت اولیه بر تولید

جیبرلیک‌اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت جامد

انتخاب منبع نیتروژن آلی و تنظیم سطح رطوبت اولیه بستر از پارامترهای تعیین‌کننده‌ای به‌شمار می‌آیند که نه تنها بر رشد رویشی، بلکه به طور خاص بر متابولیسم ثانویه و تولید این تنظیم کننده رشد گیاهی مؤثر هستند. منابع نیتروژنی مختلف با دارا بودن پروفیل‌های اختصاصی ازت و ریزمغذی‌ها، می‌توانند بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز جیبرلین را

در دستگاه طیف‌سنجی ثبت شد (Pandey et al. 2008). این داده‌ها به منظور رسم منحنی کالیبراسیون استفاده گردید تا ارتباط خطی میان غلظت استاندارد و میزان جذب نوری در طول موج منتخب تعیین گردد و دقت و صحت آنالیز نمونه‌های پژوهشی تضمین شود. خط روند نمودارها ترسیم شد و معادلات استخراج گردید (شکل ۱). با حذف غلظت‌ها تا رسیدن به ناحیه خطی تری، منحنی کالیبراسیون در برابر غلظت اولیه GA3 ترسیم شد. سپس نمونه‌های حقیقی پلات شدند تا مشخص شود که در محدوده خطی قرار می‌گیرند یا خیر. در نمودارهای کالیبراسیون به دلیل گسترده بودن محدوده غلظت‌ها به دو قسمت تقسیم شدند. البته می‌توان نمودار کالیبراسیون را در بازه‌های متفاوتی نیز رسم کرد و حتی اگر بازه‌های انتخابی همپوشانی داشته باشند اشکالی ایجاد نمی‌شود. سپس یک گروه از داده‌های مربوط به نمونه‌های حقیقی روی یکی از معادلات کالیبراسیون که محدوده داده‌ها را پوشش می‌دهد اعمال شد که غلظت‌های مربوطه را محاسبه کرد. همین کار برای تمام داده‌ها انجام شد و غلظت نمونه‌ها با استفاده از معادله کالیبراسیون مناسب تعیین گردید (Pandey et al. 2008).

به منظور یافتن معادله خط استاندارد، از داده‌های تجربی اندازه‌گیری شده جذب در مقابل غلظت‌های استاندارد استفاده شد. مهم‌ترین روش، رگرسیون خطی ساده است. شیب میزان تغییر جذب برای هر واحد تغییر غلظت است؛ هر چقدر شیب بزرگ‌تر باشد، حساسیت دستگاه بیشتر است. عرض از مبدا مقداری است که هنگام صفر بودن غلظت، دستگاه نشان می‌دهد (باید نزدیک به صفر باشد؛ در صورت عدم کالیبراسیون مناسب ممکن است عددی متفاوت داشته باشد).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای تعیین مقادیر غلظت میلی گرم بر لیتر داده‌های مربوط به طیف سنجی، از نرم افزار Graphpad version 9.0 استفاده شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح احتمال آماری یک درصد با روش آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. محاسبه مقدار جیبرلیک‌اسید طبق فرمول $y = 0.0128x + 0.0005$ انجام گرفت. مقدار x نشان دهنده عدد خوانده شده در دستگاه و مقدار y میزان جیبرلیک‌اسید بر حسب میلی گرم بر لیتر محاسبه می‌گردد. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel 2013 انجام شد.

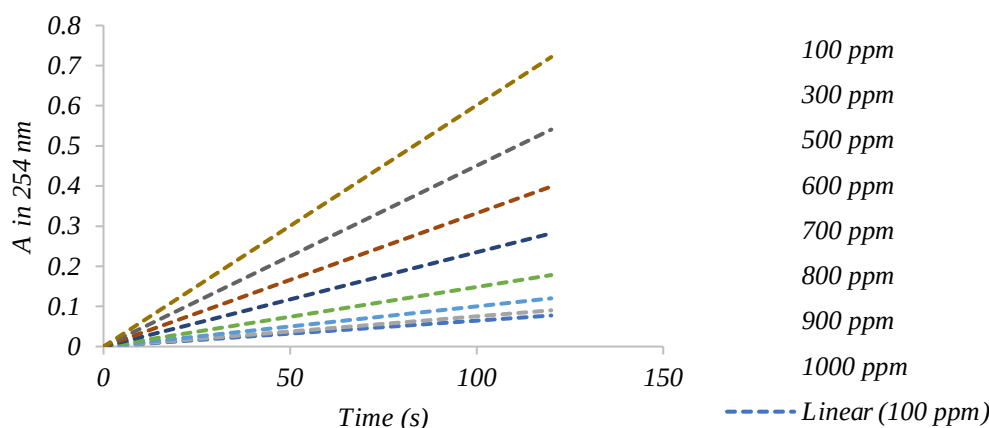
۱۰۰ میلی گرم در لیتر در بافر فسفات تهیه شدند. سپس با انجام رقت‌های متوالی (۱:۱۰، ۱:۵۰، ۱:۱۰۰) و افزودن اتانول و HCl، محلول‌های نهایی برای رسم منحنی کالیبراسیون آماده شدند (Berrios et al. 2006). نمونه‌ها بلافاصله در دستگاه طیف سنجی مدل HALO DB-20 uv-visible double beam در طول موج ۲۵۴ نانومتر هر ۶ ثانیه به مدت ۲ دقیقه خوانده شدند (Tomasini et al. 1997).

تأثیر منابع کربن مختلف بر تولید جیبرلیک/اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت مایع

بهینه‌سازی تولید جیبرلیک‌اسید توسط قارچ *F. fujikuroi* در سیستم کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت. محیط پایه کشت مایع حاوی سیوس گندم به عنوان منبع نیتروژن بود. چهار منبع کربن گلوکز، گلیسرول، مانیتول و ملاس نیشکر (پیش تیمار شده) به همراه یک تیمار شاهد (بدون منبع کربن اضافی) در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار ارزیابی شدند. نسبت کربن به نیتروژن C:N روی ۲۰:۱ با حجم کار ۱۰۰ میلی لیتر و pH اولیه روی ۲/۵ تنظیم گردید. پس از اتوکلاو، هر نمونه با ۱ میلی لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (با غلظت 1×10^6 اسپور در میلی لیتر) مایه زنی شد. شرایط انکوباسیون شامل شیکر با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه، دمای 29 ± 1 درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۰ ساعت روشنایی/۱۴ ساعت تاریکی به مدت ۷ روز بود. پس از انکوباسیون، نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و محلول رویی مطابق روشی که برای کشت جامد شرح داده شد (پیش تیمار با اتانول و اسید هیدروکلریک ۳/۷۵ مولار) آماده و خوانش شدند. این بررسی‌ها جهت تعیین بهترین منبع کربن برای افزایش تولید جیبرلیک‌اسید در کشت مایع انجام می‌شوند (Berrios et al. 2006).

منحنی/استاندارد جیبرلیک/اسید و تعیین معادله خط

در فرآیند اندازه‌گیری، دستگاه طیف‌سنجی با استفاده از نمونه شاهد کالیبره شد. نمونه شاهد از ترکیب ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق، ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۸۰۰۰ میکرولیتر محلول اسید هیدروکلریک با غلظت ۳/۷۵ مولار تهیه گردید. پس از انجام کالیبراسیون دقیق دستگاه، محلول‌های استاندارد در غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰، ۱۰۰۰ میلی گرم بر لیتر آماده شد و اندازه‌گیری جذب نوری هر نمونه



شکل ۱. نمودار منحنی استاندارد نتایج حاصل از طیف سنجی.

Figure 1. Standard curve graph of spectrophotometer results.

میلی گرم جیبرلیکاسید در لیتر تولید می شود (Kumar et al. 2021).

نتایج و بحث

نتایج رابطه غلظت و جذب نوری نمونه

برای تجزیه و تحلیل کمی نمونه ها، از منحنی استاندارد استفاده شد. در این روش، داده های جذب نمونه های مجهول در معادله خط حاصل از استانداردهای با غلظت مشخص ($y = ax + b$) جایگذاری و غلظت جیبرلیکاسید محاسبه گردید. این امر امکان مقایسه آماری دقیق بین تیمارهای مختلف را فراهم کرد (Berrios et al. 2006).

معادله به دست آمده به صورت زیر است:

$$y = 0.0128x + 0.0005$$

معادله خط استاندارد که در آن y جذب نوری و x غلظت نمونه بر حسب میلی گرم در لیتر است، بیانگر رابطه ای خطی و قوی میان غلظت مورد اندازه گیری و جذب ثبت شده در دستگاه طیف سنجی می باشد. ضریب تبیین $R^2 = 0.9879$ بیانگر همبسته بودن بسیار خوب داده ها با مدل خطی است، به این معنی که تقریب خطی مدل، بیش از ۹۸ درصد تغییرات جذب را توضیح می دهد. این میزان بالا به تحلیل گر اعتماد می دهد که معادله خط استاندارد قابل اعتماد و دقیق است و می تواند برای تبدیل مقادیر جذب نمونه های ناشناخته به غلظت واقعی آنها به کار رود. مقدار شیب $m = 0.0128$ نشان می دهد که برای هر واحد افزایش غلظت، جذب نوری به طور میانگین 0.0128 افزایش می یابد، یعنی حساسیت روش به تغییرات غلظت مطلوب است و دستگاه می تواند تغییرات کوچک غلظت را تشخیص دهد.

این تحقیق با هدف شناسایی و بهینه سازی منابع کربن مؤثر در تخمیر جامد، همچنین تعیین شرایط محیطی مطلوب، به منظور ارتقاء بهره وری تولید GA_3 انجام شد. بستر و منابع غذایی نقش کلیدی در تعیین سطح تولید متابولیت های ثانویه، به ویژه GA_3 ، ایفا می کند. منابع کربن علاوه بر تأمین انرژی، تأثیر مستقیمی بر مسیرهای متابولیکی و بیان ژن های مرتبط با بیوسنتز دارند. هر چند گلوکز به عنوان سوبسترای استاندارد مورد استفاده قرار می گیرد ولی ممکن است به دلیل اثرات کاتابولیتی، سنتز GA_3 را محدود کند، از این رو، بررسی و مقایسه منابع کربن جایگزین مانند گلیسرول، مانیتول و ملاس نیشکر ضروری است (da Silva et al. 2021). ارزیابی جامع نقش منابع کربن و شرایط بهینه سازی پارامترهایی مانند نسبت $C:N$ و رطوبت بستر، باعث افزایش کارایی تولید جیبرلیکاسید با صرفه اقتصادی است. نتایج مطالعه بررسی اثر سبوس برنج به عنوان منبع کربن، نشان داد که در شرایط بهینه با استفاده از پنج گرم سبوس برنج، ۴۵ میلی گرم در لیتر جیبرلیکاسید تولید می شود (Lee et al. 2011). در مقاله دیگری تأثیر ترکیب های مختلف سبوس برنج بر تولید جیبرلیکاسید با استفاده از کشت غوطه ور بررسی شد و نتایج حاکی از تولید جیبرلیکاسید به میزان ۶۰ میلی گرم در لیتر بود (Zhang et al. 2012). تحقیق دیگری در بررسی اثر ضایعات پرتقال در تولید جیبرلیکاسید نشان داد، که تولید ۴۸ میلی گرم در لیتر جیبرلیکاسید با استفاده از ۱۵ گرم پوست پرتقال، امکان پذیر است (Rojas et al. 2013). در پژوهش دیگری تولید جیبرلیکاسید از ضایعات سویا در فرآیند کشت جامد انجام شد. این مطالعه نشان داد که با استفاده از ۱۰ گرم ضایعات سویا، ۷۲

و ۲۰ میلی‌لیتر ثبت شده است و تغییرات آن‌ها توسط طیف-سنجی در بازه زمانی ۰ تا ۱۲۰ ثانیه در ۲۵۴ نانومتر بررسی شده است.

پس از دوره انکوباسیون و سنجش غلظت جیبرلیک‌اسید، داده‌ها مورد تحلیل آماری قرار گرفتند. جدول تجزیه واریانس اثرات اصلی و متقابل عوامل مورد مطالعه را به صورت کمی نشان می‌دهد (جدول ۱). بر پایه این تحلیل اثر سه عامل اصلی، منابع نیتروژن با احتمال خطای کمتر از ۱٪ و سطح رطوبت اولیه با احتمال خطای کمتر از ۵٪ و اثر متقابل دو عامل با احتمال خطای کمتر از ۱٪ بر تولید جیبرلیک‌اسید معنی‌دار بوده است.

مقدار عرض از مبدا $b=0.0005$ عددی بسیار نزدیک به صفر است که نشان‌دهنده صحت و دقت بالای کالیبراسیون دستگاه و تقریب مطلوب به شرایط ایده‌آل است؛ به عبارتی در غلظت صفر جذب ثبت شده تقریباً صفر است و تداخل یا داده‌های مزاحم کم است (Wang et al. 2022).

بررسی نتایج تأثیر منابع نیتروژنی آلی و سطح رطوبت اولیه بر تولید جیبرلیک‌اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت جامد بهینه‌سازی تولید جیبرلیک‌اسید توسط قارچ *F. fujikuroi* در سیستم کشت حالت جامد، مستلزم درک اثرات کلیدی عوامل تغذیه‌ای و فیزیکی است. در این آزمایش، میزان جیبرلیک‌اسید (بر حسب میلی‌گرم بر گرم) در تیمارهای آب مصرفی ۵، ۱۰، ۱۵

جدول ۱. تجزیه واریانس تأثیر منابع نیتروژنی آلی و سطح رطوبت اولیه بر تولید جیبرلیک‌اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت جامد.

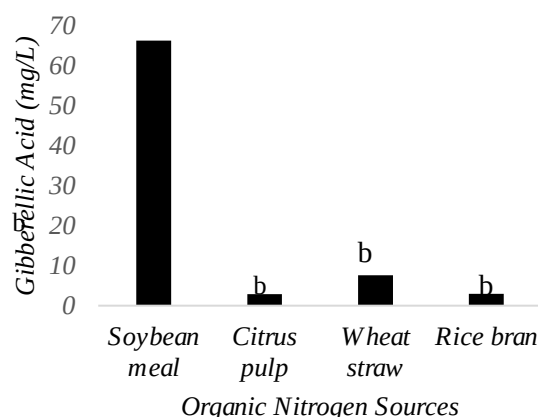
Table 1. Analysis of Variance (ANOVA) of the effect of organic nitrogen sources and initial moisture level on gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* in solid-state culture.

Source of Variation	Degrees of Freedom	Mean Square (Gibberellic Acid)
Organic Nitrogen Sources	3	11466.48**
Initial Moisture Level	3	152.50
Nitrogen × Moisture	9	192.09**
Error	32	53.69
Coefficient of Variation (CV %)	-	36.8

Significance levels: * $p<0.05$, ** $p<0.01$

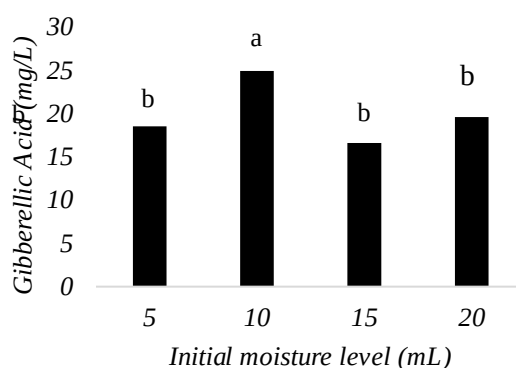
پراکندگی معنی‌دار نمی‌شدند (Wang et al. 2023). نوع ماده اولیه (سبوس گندم، سبوس برنج، کنجاله سویا و تفاله مرکبات) تأثیر بسیار قوی بر تولید جیبرلیک‌اسید دارد (شکل ۲). کنجاله سویا با میانگین تولید ۶۶/۱۶ میلی‌گرم بر گرم جیبرلیک‌اسید، تنها تیماری است که در گروه a قرار دارد. این نشان می‌دهد که از نظر آماری، کنجاله سویا به دلیل محتوای پروتئین بالا، ترکیبات تحریک‌کننده رشد و قابلیت تجزیه‌پذیری مناسب به طور معنی‌داری برتر از سه منبع نیتروژن دیگر است و باعث بیشترین تولید جیبرلیک‌اسید می‌شود (Rodrigues et al. 2012). میزان تولید جیبرلیک‌اسید با استفاده از سه منبع تفاله مرکبات، سبوس برنج و سبوس گندم، از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند و در گروه آماری b قرار گرفته‌اند. البته از نظر عددی، سبوس گندم (۷/۵۹) مقدار تولید بالاتری نسبت به دو منبع دیگر نشان می‌دهد، اما این تفاوت در سطح اطمینان آماری این آزمایش (۵٪) به حدی نبوده که معنی‌دار تشخیص داده شود.

مقدار میانگین مربعات بسیار بالا نشان می‌دهد که این عامل، قوی‌ترین متغیر در تعیین میزان تولید است. درصد رطوبت اولیه بستر کشت نیز تأثیر معنی‌داری بر تولید دارد، اما شدت این اثر (با توجه به میانگین مربعات) به مراتب از اثر منبع نیتروژن کمتر است. یافته کلیدی اثر متقابل نشان می‌دهد که تأثیر هر منبع نیتروژن بر تولید، وابسته به سطح رطوبت خاصی است. به عبارت دیگر، بهترین منبع نیتروژن در یک سطح رطوبت مشخص، ممکن است در سطح رطوبت دیگر بهترین نباشد (Wang et al. 2022). بنابراین، برای بهینه‌سازی تولید باید ترکیب بهینه‌ای از این دو عامل را یافت. میانگین مربعات خطا معیاری از تغییرپذیری ذاتی آزمایش است. ضریب تغییرات مقدار بسیار بالا ارزیابی می‌شود. این امر در آزمایش زیستی کشت جامد می‌تواند ناشی از تغییرپذیری طبیعی و ذاتی فرآیند تخمیر توسط قارچ و مشکل در ایجاد یکنواختی کامل در شرایط کشت جامد (مانند توزیع رطوبت، دما و تهویه در تمام نقاط بستر) باشد. با وجود این پراکندگی بالا (CV زیاد)، اثرات اصلی و متقابل همچنان معنی‌دار شده‌اند که نشان از تأثیر بسیار قوی این عوامل بر تولید دارد. اگر اثرات ضعیف‌تر بودند، احتمالاً در این سطح از



شکل ۲. مقایسه میانگین تأثیر منابع نیتروژنی آلی بر تولید جیبرلیک اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت جامد.

Figure 2. Chart of the average effect of organic nitrogen sources on gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* in solid-state culture.



شکل ۳. نمودار مقایسه میانگین مربوط به اثر سطح رطوبت اولیه بر تولید جیبرلیک اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت جامد.

Figure 3. Chart of the average effect of initial moisture level on gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* in solid-state culture.

محدودیت در دسترسی به مواد مغذی و فعالیت متابولیکی است (Zhang et al. 2012).

برای شناسایی بهترین ترکیب ممکن، جدول مقایسه میانگین‌های تیمارهای ترکیبی (۱۶ تیمار) تحلیل شد تا مشخص گردد کدام جفت منبع نیتروژن × سطح رطوبت بیشترین تولید را دارد. با توجه به داده‌های جدول و ارتباط آن با مبانی فیزیولوژیکی تولید جیبرلیک اسید، نتایج به وضوح نشان می‌دهد که انتخاب منبع نیتروژن آلی عامل تعیین‌کننده‌ای در کارایی تولید جیبرلیک اسید توسط *F. fujikuroi* تحت شرایط کشت جامد است، به گونه‌ای که اثر سطوح مختلف رطوبت اولیه در غالب موارد بر منبع نیتروژنی مشهود است (جدول ۲).

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که سطح رطوبت اولیه تأثیر معنی‌داری بر تولید جیبرلیک اسید دارد، به طوری که تیمار ۱۰ میلی‌لیتر آب با تولید ۲۴/۹۲ واحد، به طور معنی‌داری بیشترین میزان تولید را به خود اختصاص داد (شکل ۳). سایر سطوح رطوبتی (۵، ۱۵ و ۲۰ میلی‌لیتر) با مقادیر تولید بین ۱۶/۶۰ تا ۱۹/۵۷ واحد، در یک گروه آماری قرار گرفتند و از تیمار بهینه پایین‌تر بودند (نمودار ۴). این موضوع نشان‌دهنده این است که قارچ *F. fujikuroi* برای تولید جیبرلیک اسید حساسیت بالایی به رطوبت دارد و یک حد بهینه باریک برای رطوبت اولیه در فرآیند تولید قرار دارد. عدم وجود روند خطی و کاهش تولید در رطوبت‌های بالاتر (۱۵ و ۲۰ میلی‌لیتر) احتمالاً به دلیل کاهش تخلخل بستر، محدودیت انتقال اکسیژن و ایجاد شرایط بی‌هوازی است. کاهش تولید در رطوبت پایین (۵ میلی‌لیتر) نیز به دلیل

جدول ۲. مقایسه میانگین مربوط به اثرات متقابل تأثیر منابع نیتروژنی آلی و سطح رطوبت اولیه بر تولید جیبرلیک‌اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت جامد.

Table 2. Comparing the averages of the interaction effects of organic nitrogen sources and initial moisture level on gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* in solid-state culture.

Organic Nitrogen Sources	Initial moisture level (mL)	Gibberellic Acid (mg/L)
Soybean meal	5	61.38 ^b
Soybean meal	10	88.08 ^a
Soybean meal	15	51.73 ^b
Soybean meal	20	63.43 ^b
Citrus pulp	5	3.68 ^c
Citrus pulp	10	3.34 ^c
Citrus pulp	15	2.1 ^c
Citrus pulp	20	2.52 ^c
Wheat straw	5	7.33 ^c
Wheat straw	10	6.19 ^c
Wheat straw	15	8.64 ^c
Wheat straw	20	8.19 ^c
Rice bran	5	1.74 ^c
Rice bran	10	2.09 ^c
Rice bran	15	3.92 ^c
Rice bran	20	4.13 ^c

*Letters (a, b, c) in the last column indicate statistically significant differences (at the 5% probability level) among treatments based on pairwise comparison.

گندم و سبوس برنج اگرچه حاوی مقادیر مناسبی از ویتامین‌های گروه B و مواد معدنی هستند، اما ترکیب آمینواسیدی و سطوح پیش‌ماده‌های اختصاصی مسیر جیبرلین نامناسب است. همچنین، نسبت کربن به نیتروژن بالا در این مواد می‌تواند متابولیسم قارچ را به سمت مصرف نیتروژن برای رشد، به جای تولید متابولیت ثانویه سوق دهد. تغییرات رطوبت در این بسترها نیز تأثیر محسوسی بر بهبود تولید نداشته و تنها نوسانات جزئی ایجاد کرده است (Rodrigues et al. 2012).

نتایج آزمایش منابع نیتروژن به‌وضوح نشان می‌دهد که طبیعت کیفی منبع نیتروژن آلی مهم‌ترین فاکتور کنترل‌کننده تولید جیبرلیک‌اسید در کشت جامد با *F. fujikuroi* است. کنجالة سویا به دلیل دارا بودن ترکیب متعادل و کامل پیش‌سازهای متابولیکی، نیتروژن آمونیاکی و آلی قابل دسترس، و عناصر کم‌مصرف، یک بستر ایده‌آل محسوب می‌شود. در این بستر بهینه، فاکتور فیزیکی رطوبت اولیه نیز اثرگذاری خود را نشان داده و نقطه بهینه (۱۰ میلی‌لیتر) تعادل مطلوبی بین دسترسی به آب و تبادل گازی (اکسیژن) در بستر جامد ایجاد می‌کند. در مقابل، بسترهای نامناسب از نظر ترکیب متابولیکی (مانند تفاله مرکبات و سبوس‌ها) حتی با تغییر رطوبت نیز قادر به القای تولید قابل‌ملاحظه جیبرلیک‌اسید نیستند. این یافته کاملاً همسو با دانش پایه درباره مسیر بیوسنتز جیبرلین است که برای به حداکثر رسیدن به یک محیط کشت غنی از مشتقات اسید چرب و اسید آمینه و کنترل شرایط محیطی برای تامین همزمان

کنجالة سویا بهترین بستر برای تولید جیبرلیک‌اسید است. با فراهم آوردن ترکیب بهینه پیش‌سازهای بیوسنتزی (مانند اسید آمینه گلوتامات و سوکسینات) و مواد معدنی ضروری (مانند منیزیم و روی که کوفاکتورهای آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز هستند)، محیطی ایده‌آل برای بیان و فعالیت ژن‌های مسئول بیوسنتز جیبرلین ایجاد می‌کند. سطح رطوبت ۱۰ میلی‌لیتر با تولید ۸۸/۰۸ میلی گرم بر گرم جیبرلیک‌اسید بالاترین میزان تولید را به خود اختصاص داده است. این سطح رطوبت احتمالاً تعادل مطلوبی بین تهویه اکسیژن لازم برای واکنش‌های اکسیداتیو مسیر بیوسنتز و قابلیت جذب مواد مغذی توسط قارچ برقرار کرده است (Zhou & Wu, 2011). افزایش یا کاهش رطوبت از این سطح بهینه (۵، ۱۵ یا ۲۰ میلی‌لیتر) منجر به کاهش معنی‌دار تولید شده که می‌تواند ناشی از محدودیت اکسیژن (در رطوبت بالا) یا استرس آبی و محدودیت در انتقال مواد مغذی (در رطوبت پایین) باشد. تفاله مرکبات، سبوس گندم و سبوس برنج همگی با اختلاف بسیار زیاد (حدود یک دهم تا یک پانزدهم کنجالة سویا) تولید پایینی داشتند و از نظر آماری در یک گروه C قرار گرفتند.

همچنین، تفاله مرکبات با وجود قندهای ساده و سریع‌التجزیه فراوان، احتمالاً به دلیل pH اسیدی ذاتی، محدودیت نیتروژن به فرم قابل جذب، یا کمبود برخی ریزمغذی‌های کلیدی، قادر به پشتیبانی از بیوسنتز جیبرلیک-اسید نبوده و تنها رشد رویشی قارچ را تقویت کرده است. سبوس

اکسیژن و رطوبت نیاز دارد.

بررسی نتایج تأثیر منابع کربن مختلف بر تولید جیبرلیک/اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت مایع

اگرچه میزان غلظت در همه تیمارهای حاوی منابع کربن مختلف رو به افزایش گذاشت، اما الگو و سرعت این افزایش کاملاً به نوع منبع کربن بستگی دارد. جدول تجزیه واریانس داده‌های مربوط به آزمایش تأثیر منابع کربن مختلف بر تولید جیبرلیک/اسید توسط *F. fujikuroi* در کشت مایع نشان می‌دهد، مقدار F محاسبه شده برای عامل منابع کربن مختلف برابر با $26/0.52$ است (جدول ۳). با توجه به درجه آزادی عامل (۳) و درجه آزادی خطا (۸)، این مقدار F بسیار بالا بوده و در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار

است. این بدان معناست که حداقل یکی از منابع کربن استفاده شده، تأثیر بسیار متفاوتی بر تولید جیبرلیک/اسید داشته است و تفاوت مشاهده شده بین میانگین‌های تیمارها به شانس یا خطای آزمایشی نسبت داده نمی‌شود. ضریب تغییرات بسیار پایین نشان‌دهنده دقت بالا و یکنواختی مطلوب در انجام آزمایش است. همچنین، تغییرات ناخواسته (خطای تصادفی) در فرآیند کشت، نمونه‌برداری و اندازه‌گیری به حداقل رسیده و تفاوت‌های مشاهده شده عمدتاً ناشی از اثر خود تیمارها (منابع کربن) می‌باشد. بر اساس جدول تجزیه واریانس، نتایج این تحلیل آماری به وضوح تأثیر حیاتی و معنی‌دار نوع منبع کربن را در متابولیسم ثانویه *F. fujikuroi* و تولید جیبرلیک/اسید در محیط کشت مایع تأیید می‌کند.

جدول ۳. تجزیه واریانس بررسی نتایج تأثیر منابع کربن مختلف بر تولید جیبرلیک/اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت مایع.

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) of the results of investigating the effect of different carbon sources on the production of gibberellic acid by *Fusarium fujikuroi* in submerged culture.

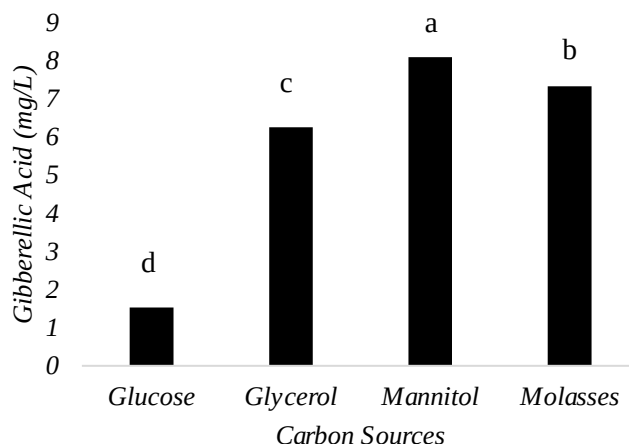
Source of Variation	Degrees of Freedom	Mean Square (Gibberellic Acid)
Different Carbon Sources	3	26.052**
Error	8	0.01
Coefficient of Variation (CV %)	-	1.8

Significance levels: ** $p < 0.01$ $p < 0.01$

ناشی از سازگاری متابولیک خاص قارچ *F. fujikuroi* با این الکل قندی باشد که ممکن است منجر به ایجاد تعادل مطلوب بین رشد سلولی و تولید متابولیت ثانویه (جیبرلیک/اسید) گردد. ملاس و گلیسرول به ترتیب در رده‌های بعدی قرار گرفتند. گلیسرول با فراهم کردن پیش‌سازهای استیل‌کوآ در چرخه گلیکولیز، سنتز GA_3 را تقویت می‌کند. با وجود اختلاف عددی، این دو تیمار از نظر آماری در دو گروه مجزا قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین عملکرد آن‌ها است. ملاس به عنوان یک منبع کربن پیچیده و ارزان قیمت، عملکرد قابل قبولی نشان داد. گلیسرول نیز به عنوان یک سوسترای قابل متابولیسم، بازده متوسطی ایجاد کرد. گلوکز که به عنوان یک منبع کربن با تجزیه آسان و رایج در فرآیندهای تخمیر شناخته می‌شود، کمترین میزان تولید را به خود اختصاص داد و در گروه d قرار گرفت. این پدیده که اغلب به عنوان بازدارندگی با گلوکز شناخته می‌شود، در تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه دیده می‌شود. در این حالت، احتمالاً تجزیه سریع گلوکز منجر به ایجاد یک کاتابولیت بازدارنده یا تنظیم منفی مسیر بیوسنتز جیبرلیک/اسید شده است (Rodrigues et al. 2012).

گلوکز روند افزایشی آرام و مداوم و رشد خطی تقریباً پایدار در ۱۲۰ ثانیه داشت. گلیسرول رشد قوی‌تر نسبت به گلوکز داشت و تغییرات سریع‌تر و بزرگ‌تر مشاهده شد و در مانیتول تقریباً از ابتدا غلظت بالا و روند افزایشی مناسبی داشت، اما در بعضی بازه‌ها مانند ۵۰ به ۶۰ ثانیه پایدار ماند و ملاس در ابتدا بالاترین غلظت را نشان داد، و نوسان‌های بیشتری هم داشت؛ در بازه‌های مختلف مثل ۷۰ تا ۸۰ ثانیه کاهش و مجدداً افزایش داشت. مانیتول و ملاس گرچه شروع غلظت بالاتری داشتند، نوساناتی مانند شوک یا تغییرات محیطی نشان می‌دهند که ثبات واکنش در حضور آن‌ها کمی کمتر است. در گلیسرول غلظت‌ها رو به افزایش قوی و تقریباً پیوسته داشت که می‌تواند بیانگر تأثیر مثبت این منبع کربن روی واکنش یا جذب باشد. گلوکز ساده‌ترین روند افزایشی داشت، کمترین مقدار غلظت را نسبت به بقیه منابع در هر زمان داشت (Singh et al. 2021).

با توجه به نتایج فوق و گروه‌بندی آماری (حروف لاتین مجاور)، تفاوت معنی‌داری بین بازده تولید جیبرلیک/اسید با استفاده از چهار منبع کربن مختلف مشاهده می‌شود (شکل ۴). مانیتول با بیشترین میانگین تولید به عنوان مؤثرترین منبع کربن شناسایی شد و در گروه آماری a قرار گرفت. این برتری می‌تواند



شکل ۴. نمودار مقایسه میانگین بررسی تأثیر منابع کربن مختلف بر تولید جیبرلیک اسید توسط *Fusarium fujikuroi* در کشت مایع.

Figure 5. Chart of the average results of the study of the effect of different carbon sources on the production of gibberellic acid by *Fusarium fujikuroi* in submerged culture.

انتخاب منابع نیتروژن و کربن در فرآیند تولید جیبرلیک-اسید، علاوه بر بازدهی زیستی، دارای پیامدهای قابل توجه زیست‌محیطی است. به‌کارگیری پسماندهای کشاورزی غنی از نیتروژن آلی (مانند کنجاله سویا) یا کربن (مانند ملاس چغندر) به‌جای منابع سنتزی، ضمن تقویت چرخه اقتصاد دورانی، باعث کاهش وابستگی به کودهای شیمیایی نیتروژنه می‌شود که با مشکلاتی مانند رواناب نیتراتی، آلودگی آب‌های زیرزمینی و انتشار گازهای گلخانه‌ای همراه است. همچنین، استفاده از این باقیمانده‌های آلی، مشکل مدیریت پسماند را کاهش داده و از مصرف منابع فسیلی در تولید پیش‌ماده‌های شیمیایی می‌کاهد. از سوی دیگر، بهینه‌سازی نسبت کربن به نیتروژن در بستر کشت، منجر به افزایش راندمان متابولیک قارچ شده و از تجمع ترکیبات حدواسط سمی یا پساب‌های غنی از مواد مغذی جلوگیری می‌کند. در نتیجه، این رویکرد یکپارچه، نه تنها تولید پایدار یک محرک رشد گیاهی را ممکن می‌سازد، بلکه اثرات مثبتی بر سلامت خاک، کاهش ردپای کربن و پایداری کلی اکوسیستم‌های کشاورزی برجای می‌گذارد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان به دلیل حمایت‌های مالی برای انجام این پژوهش قدرشناسی می‌شود.

References

- Adeyemo AA, Otunola GA, 2017. Gibberellic acid production: a review on the impact of nutritional substrates. *Critical Reviews in Microbiology* 43(4): 460–478.
- Barnett YA, Barnett CR, 2008. Aging Methods and

با تحلیل یافته‌های این پژوهش می‌توان دریافت که بهینه‌سازی فرآیند تولید جیبرلیک اسید توسط قارچ *F. fujikuroi* مستلزم مدیریت هوشمندانه پارامترهای کشت، اعم از نوع بستر، سطح رطوبت و منبع کربن است. نتایج آزمایش منابع نیتروژن به‌وضوح نشان می‌دهد که طبیعت کیفی منبع نیتروژن آلی مهم‌ترین فاکتور کنترل‌کننده تولید جیبرلیک اسید در کشت جامد با *F. fujikuroi* است. کنجاله سویا به دلیل دارا بودن ترکیب متعادل و کامل پیش‌سازهای متابولیکی، نیتروژن آمونیاکی و آلی قابل دسترس، و عناصر کم‌مصرف، یک بستر ایده‌آل محسوب می‌شود. در این بستر بهینه، فاکتور فیزیکی رطوبت اولیه نیز اثرگذاری خود را نشان داده و نقطه بهینه (۱۰ میلی‌لیتر) تعادل مطلوبی بین دسترسی به آب و تبادل گازی (اکسیژن) در بستر جامد ایجاد می‌کند. در مقابل، بسترهای نامناسب از نظر ترکیب متابولیکی (مانند تفاله مرکبات و سبوس‌ها) حتی با تغییر رطوبت نیز قادر به القای تولید قابل‌ملاحظه جیبرلیک اسید نیستند. این یافته کاملاً همسو با دانش پایه درباره مسیر بیوسنتز جیبرلین است که برای به حداکثر رسیدن به یک محیط کشت غنی از مشتقات اسید چرب و اسید آمینه و کنترل شرایط محیطی برای تامین همزمان اکسیژن و رطوبت نیاز دارد.

Protocols. *Springer Science & Business* 11(3): 100–113.

Bashyal BM, 2018. Etiology of an emerging disease: Bakanae of rice. *Indian Phytopathology* 71(4): 485–494.

Berrios J, Illanes A, Aroca G, 2006. Spectrophotometric

- method for determining gibberellic acid in fermentation broths. *Biotechnology Letters* 1(9): 26:67–70. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000009463.98203.8b>
- Castro-Camba R, Sánchez C, Vidal N, Vielba JM, 2022. Plant development and crop yield: The role of gibberellins. *Plants* 11(19): 26–50.
- Crous PW, Verkley GJM, Groenewald JZ, 2019. Fungal Biodiversity Westerdijk Laboratory Manual Series 1. 2nd edition, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht Press. 349 pp.
- Crous PW, Lombard L, Sandoval-Denis M, Seifert KA, Schroers HJ, *et al.*, 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology* 98: 100–116. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>.
- da Silva LRI, de Andrade CJ, de Oliveira D, 2021. Solid-state fermentation in brewer's spent grains by *Fusarium fujikuroi* for gibberellic acid production. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11(5): 13042–13052.
- de Oliveira J, Rodrigues C, Vandenberghe LP, Câmara MC, Libardi N, *et al.*, 2017. Gibberellic acid production by different fermentation systems using citric pulp as substrate/support. *Biological Medical Research International* 17(1): 56–73.
- Hernández Rodríguez A, Díaz Pacheco A, Martínez Tolibía SE, Meléndez Xicohtencatl Y, Granados Balbuena SY, *et al.*, 2024. Bioprocess of gibberellic acid by *Fusarium fujikuroi*: The challenge of regulation, raw materials, and product yields. *Journal of Fungi* 10(6): 418–425.
- Karakoc SB, and Aksoez NILUFER, 2004. Optimization of carbon-nitrogen ratio for production of gibberellic acid by *Pseudomonas* sp. *Polish Journal of Microbiology* 53(2): 117–120.
- Kumar A, Sharma S, Mehta P, 2021. Advances in submerged fermentation for gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi*: Process optimization and scale-up. *Biotechnology Reports* 32: 659–687.
- Lee JH, Kim BK, Kim JH, 2011. Production of gibberellin by *Fusarium fujikuroi* using rice bran as a carbon source. *Journal of Microbiology & Biotechnology* 21(4): 309–313.
- Murray JD, 2020. Microbial biosynthesis of plant hormones and their roles in sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science* 11: 580–590.
- N'Guessan KJY, Adahi B, Konan-Waidhet AB, Masayoshi S, Assidjo NE. 2023. Assessment of climate change impact on water requirement and rice productivity. *Rice Science* 30(4): 276–293.
- Omojasola PF, Adejoro DO, 2018. Gibberellic acid production by *Fusarium moniliforme* and *Aspergillus niger* using submerged fermentation of banana peel. *Notulae Scientia Biologicae* 10(1): 60–67.
- Oyedeji S, Patel N, Krishnamurthy R, Fatoba PO, 2024. Agricultural wastes to value-added products: economic and environmental perspectives for waste conversion. In: Bayer T, Kircher M (eds). *Biowaste to Value-added Products; Economics and Technologies*. Springer. pp. 215–248.
- Pandey A, Soccol CR, Larroche C, 2008. Current developments in solid-state fermentation. *Springer Science & Business* 4(12): 26–37.
- Pandya JB, Patani AN, Raval VH, Rajput KN, Panchal RR, 2023. Understanding the Fermentation Potentiality for Gibberellic Acid (GA3) Production Using Fungi. *Current Microbiology* 80(12): 385–400.
- Patil RH, Patil MP, Maheshwari VL, 2016. Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi: a review of biotechnological production and their potential applications. *Studies in Natural Products Chemistry* 49: 189–205.
- Rezvi HUA, Tahjib-Ul-Arif M, Azim MA, Tumpa TA, Tipu MMH, *et al.*, 2023. Rice and food security: Climate change implications and the prospects for nutritional security. *Food & Energy Security* 12(1): 430–447.
- Ríos-Irbe EY, Flores-Cotera LB, Chávira MMG, González-Alatorre Gy, Escamilla-Silva EM, 2011. Inductive effect produced by a mixture of carbon sources in the production of gibberellic acid by *Gibberella fujikuroi*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27(6): 1499–1505.
- Rodrigues C, Vandenberghe LP, de Oliveira J, 2012. New perspectives on gibberellic acid production: a review. *Critical Reviews in Biotechnology* 32(3): 263–273.
- Rodrigues C, Vandenberghe LP, Goyzueta LD, Soccol

- CR, 2016. Production, extraction, and purification of gibberellic acid by solid-state fermentation using citric pulp and soy husk. *BAOJ Chemistry* 2(2): 14–22.
- Rojas JA, García LC, Báez S, 2013. Effect of citrus peels on gibberellin production in fermentation processes. *Citrus Research* 34(2): 1–6.
- Singh R, Kumar A, Dwivedi A, 2021. Improved gibberellic acid production via solid-state fermentation using agro-industrial residues by *Fusarium fujikuroi*: Process optimization and molecular studies. *Bioresource Technology Reports* 2(9): 20–33. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100698>
- Süntar I, Çetinkaya S, Haydaroglu ÜS, 2021. Bioproduction process of natural products and biopharmaceuticals: biotechnological aspects. *Biotechnology Advances* 50: 68–77.
- Takahashi N, Phinney BO, MacMillan J. 2012. Gibberellins. 2th edition. Springer Science & Business Media. 524 pp.
- Tomasini A, Fajardo C, Barrios González J, 1997. Gibberellic acid production using different solid-state fermentation systems. *World Journal of Microbiol Biotechnology* 13: 203–206.
- Wang HN, Ke X, Zhou JP, Liu ZQ, Zheng YG, 2022. Recent advances in metabolic regulation and bioengineering of gibberellic acid biosynthesis in *Fusarium fujikuroi*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 38(8): 1–16.
- Wang H, Ke X, Jia R, Huang L, Liu Z, et al., 2023. Gibberellic acid overproduction in *Fusarium fujikuroi* using regulatory modification and transcription analysis. *Applied Microbiology & Biotechnology* 107(9): 13–84.
- Zhan L, Chen L, Hou Y, Zeng Y, Ji Z, 2024. Bakanae disease resistance in rice: current status and future considerations. *Agronomy* 14: 1507–1515. <https://doi.org/10.3390/agronomy14071507>.
- Zhang J, Cheng Y, Zhang H, 2012. Impact of rice bran on the production of gibberellins by *Fusarium fujikuroi* in submerged fermentation. *Bioresource Technology* 114: 408–413.
- Zhou H, Wu Q, 2011. Optimization of fermentation conditions for gibberellin production by *Fusarium fujikuroi* in solid-state fermentation. *Journal of Biological Engineering* 5(1): 1–10.

