بسم الله الرحمن الرحيم

۱۲۹۵۲۶

دانشگاه شهید بهشتی

دانشکده علوم زیستی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

علوم گیاهی (سیستماتیک - اکولوژی)

عنوان:

جمع آوری، شناسایی و کشت قارچ های دارویی *Phellinus* از ایران

و

بررسی فیتوشیمیایی، خواص آنتی باکتریال و آنتی اکسیدان آن ها

دانشجو:

فریبا حکم اللهی

استاد راهنما:

دکتر حسین ریاحی

دکتر حسن رفعتی

استاد مشاور:

دکتر محمد حسین حکیمی میبدی

مرداد ۱۳۸۸

۱۳۸۸/۱۰/۲۷

۱۲۹۵۲۶

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

دانشگاه شهید بهشتی

بسمه تعالی

« صورتجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد»

ن ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
ی: ۲۹۹۰۱

بازگشت به مجوز دفاع۲۰۰/۱۷۳۶/د مورخ ۸۸/۵/۷ جلسه هیأت داوران ارزیابی پایان نامه خانم فریبا حکم اللهی به شماره شناسنامه ۵۶ صادره از یزد متولد ۱۳۶۴ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی علوم گیاهی – سیستماتیک اکولوژی

با عنوان :

جمع آوری و شناسایی گونه های **Phellinus** از شمال ایران و بررسی فیتوشیمیایی ، خواص آنتی اکسیدان و آنتی باکتریال آنها

به راهنمائی:

۱- آقای دکتر حسین ریاحی
۲- آقای دکتر حسن رفعتی

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۱۳۸۸/۵/۲۲ تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ۱۹٫۸ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما: آقای دکتر حسین ریاحی

۲- استاد راهنما: آقای دکتر حسن رفعتی

۳- استاد مشاور: آقای دکتر محمد حسین حکیمی

۴- استاد داور : آقای دکتر طاهر نژادستاری

۵- استاد داورو نماینده تحصیلات تکمیلی : آقای دکتر داریوش مینائی تهرانی

تقدیم به:

پاکترین واژه هستی، زیباترین تندیس عشق، مهربان مادرم

که سایه اش بر سرم همه مهر است و نثارم به پایش همه شرم،

او که تاب و توانش رفت و مویش سپیدی گرفت تا رویم سپید بماند.

و

پدر، برادر، خواهر، عموها، عمه، دایی، خاله ها و معلم عزیزم خانم ملیحه لاور که زلال نگاهشان صفای زندگیم،

گرمی کلامشان گرمابخش جانم

و

همراهیشان تنها نیاز بودن است.

سپاس

سپاس ایزد یکتا که مرا در خانواده ای خوشبخت به دنیا آورد و موجبات علم آموزی را برایم فراهم نمود.

از زحمات اساتید گرانقدر و دلسوزم آقایان دکتر حسین ریاحی، دکتر حسن رفعتی و دکتر محمد حسین حکیمی میبدی که با راهنمایی های ارزشمند خویش مرا در این پژوهش و تحقیق هدایت نمودند، تشکر می گردد.

سپس از اساتید و دانشجویان پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی و دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی و همچنین دانشکده منابع طبیعی دانشگاه یزد به دلیل در اختیار قرار دادن منابع اطلاعاتی فوق العاده ارزشمند و مفید و نیز از آقایان دکتر فروتن و مهندس موسی زاده به خاطر کمک و همراهی در جمع آوری نمونه های قارچی سپاس گزاری می گردد.

از خانم دکتر آتوسا علی احمدی به دلیل کمک و راهنمایی ایشان در بخش میکروبی این پایان نامه بسیار سپاسگزارم. از استاد عزیز آقای دکتر حسین شاکر که بسیار مهربان و خوش اخلاق بودند و نیز از دوستان مهربان و همه عزیزانی که با خورشید محبتشان یخ وجودم را آب کردند و تحمل سختی را برایم آسان نمودند.

چکیده

ماکرومیست ها منابع جدیدی برای کشف ترکیبات جدید دارویی با اثرات مختلف بیولوژیک به شمار می‌آیند و با دارا بودن موادی چون پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنول‌ها، ترپنوئیدها و ...، در زمینه تحقیقات بیولوژیکی به‌کار گرفته می‌شوند.

جنس *Phellinus* یکی از بزرگترین جنس‌ها، که انتشار گسترده ای در دنیا دارد متعلق به خانواده Hymenochaetaceae، راسته Aphyllophorales و شاخه Basidiomycota با بیش از ۳۵۵ گونه می باشد. تاکنون ۱۲ گونه از این قارچ از شمال ایران گزارش شده اند و در طب سنتی کشورمان استفاده ای ندارند این در حالی است که در تعدادی از کشورهای آسیایی برای درمان انواع بیماری‌ها مورد استفاده قرار می گیرند و دارای خواص دارویی مختلفی مثل ضد سرطان، ضد باکتری و آنتی اکسیدان می باشند. با توجه به اهمیت آن‌ها و کمبود تحقیقات پیرامون گونه های *Phellinus* ایرانی مطالعه حاضر انجام پذیرفت.

این تحقیق با هدف جمع‌آوری، شناسایی و کشت گونه‌های این جنس و بررسی فعالیت‌های بیولوژیکی ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره‌های دو گونه *P. torulosus* و *P. conchatus* و تعیین میزان ترکیبات پلی ساکاریدی و پلی فنولی آن‌ها انجام پذیرفت. نمونه‌های مختلف قارچ‌ها، تابستان و پائیز ۱۳۸۷ از شهرهای شمالی ایران جمع آوری شدند. گونه‌ها با استفاده از خصوصیات ماکرومورفولوژیکی و میکرومورفولوژیکی فروتینگ بادی، خصوصیات کشت، روابط میزبانی، پراکنش و... مورد شناسایی قرار گرفتند. عصاره گیری با متانول، کلوروفورم و بوتانول جهت انجام آزمون‌های زیست سنجی و آنتی اکسیدان و بررسی فیتوشیمیایی صورت گرفت. ابتدا آزمون زیست سنجی به روش انتشار روی دیسک انجام شد و اندازه ی هاله های عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد گرفته شد. سپس حداقل غلظت مهارکننده ی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) باکتری ها نیز به وسیله روش استاندارد رقت سازی با حجم کم در میکروپلیت تعیین شد. فعالیت آنتی اکسیدانی به دو روش تخریب رادیکال‌های آزاد DPPH و قدرت آنتی اکسیدانی کاهش یون‌های فریک (Ferric reducing antioxidant power) انجام شد.

در نهایت پنج گونه *P. torulosus, P. punctatus, P. pectinatus, P. glausecence* و *P. conchatus* شناسایی شدند که گونه *P. conchatus* برای فلور قارچی ایران گونه جدید محسوب می شود.

نتایج حاصل از آزمون زیست سنجی، در مورد هر دو گونه اثرات بازدارنده عصاره متانولی تام، برش کلروفورمی و به خصوص برش بوتانولی آن روی سه باکتری *Staphylococcus aureus*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Bacillus cereus* مشاهده می شود و احتمالا ماده موثره در برش بوتانولی می باشد. در مورد هر دو گونه، عصاره متانولی تام و بخصوص برش بوتانولی آن فعالیت قابل ملاحظه ای در تخریب رادیکال‌های آزاد و کاهش یون‌های فریک نشان می دهد. مواد فعال در عصاره کل متانول بیشتر در برش بوتانولی تجمع یافته اند و با افزایش مواد فنولی در عصاره ها به ویژه عصاره ی بوتانولی، خاصیت آنتی اکسیدانتی نیز به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد، تحقیقات بیشتری جهت جداسازی ترکیبات موثره ضد باکتری و آنتی اکسیدان این گونه‌ها ضروری می باشد.

کلمات کلیدی: قارچ دارویی *Phellinus*، شناسایی، کشت، بررسی فیتوشیمیایی، آزمون‌های آنتی باکتریال، آزمون‌های آنتی اکسیدان

فهرست مطالب

صفحه

مقدمه ۱

۱- قارچ‌های دارویی ۲

۲- اهداف تحقیق ۳

مروری بر مطالعات انجام شده ۴

۲- جایگاه تاکسونومیکی گونه ها ۵

۲-۱- راسته Aphyllophorales ۵

۲-۱- ۱-کشت آزمایشگاهی ۶

۲-۲- خانواده Hymenochaetaceae Donk و اختصاصات تاکسونومیک آن ۶

۲-۲-۱- ارزش اقتصادی خانواده Hymenochaetaceae ۸

۲-۲-۲- پراکندگی و بوم شناسی جنس‌های خانواده Hymenochaetaceae ۹

۲-۳- جنس Phellinus Quélet ۹

۲-۳-۱-شرح جنس Phellinus Quélet (شرح تاکسونومی) ۱۰

۲-۳-۲- پراکندگی جغرافیایی جنس Phellinus در جهان و ایران ۱۰

۲-۳-۳- محصولات تهیه شده از گونه های Phellinus و اهمیت اقتصادی آن‌ها ۱۱

۲-۴- بازیدیو میکوتا منبعی از مواد فعال بیولوژیک ۱۱

۲- ۴-۱- جنس Phellinus وخواص ضد سرطانی آن ۱۲

۲-۴-۲- جنس Phellinus و خواص ضد میکروبی آن ۱۳

۲-۴-۳- جنس Phellinus و خواص آنتی اکسیدانتی ۱۴

۲-۵- جایگاه قارچ داروئی Phellinus در طب سنتی و مصارف دارویی امروزه ۱۵

۲-۶- متابولیت‌های ثانویه گونه‌های Phellinus ۱۶

۲-۶-۱- کربوهیدرات‌ها ۱۶

۲-۶-۲- پلی ساکاریدها ۱۶

۲-۶-۳- پلی ساکاریدهای موجود در قارچ Phellinus ۱۶

۲-۶-۴- پلی فنول‌ها و فنول‌ها ۱۷
۲-۶-۵- پلی فنول‌ها و فنول‌های موجود در گونه‌های مختلف Phellinus ۱۷
۲-۷-روش‌های متداول برای جداسازی و شناسایی مواد مؤثره ۱۸
۲-۷-۱- کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) ۱۸
۲-۷-۲- کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد (HPLC) ۱۸
۲-۷-۳- الکتروفورز ۱۹
۲-۷-۴- کروماتوگرافی گازی (GC) ۱۹
۲-۷-۵- اسپکترومتری جرمی(MS) ۱۹
۲-۷-۶- تلفیق سیستم کروماتوگرافی گازی – اسپکترومتری جرمی (GC/MS) ۱۹
۲-۸- معرفی باکتری‌ها ۲۰
۲-۸-۱- باکتری‌های گرم-منفی ۲۰
۲-۸-۱-۱- Pseudomonas aeroginosa ۲۰
۲-۸-۱-۲- Escherichia coli ۲۰
۲-۸-۲- باکتری‌های گرم-مثبت ۲۰
۲-۸-۲-۱- Bacillus cereus ۲۰
۲-۸-۲-۲- Enterococcus faecalis ۲۱
۲-۸-۲-۳- Staphylococcus aureus ۲۱
مواد و روش‌ها **۲۲**
۳- جمع آوری نمونه‌های قارچی ۲۳
۳-۱- شناسایی نمونه‌های قارچی ۲۴
۳-۱-۱- بررسی صفات ماکرومورفولوژی ۲۴
۳-۱-۲- بررسی صفات میکرومورفولوژی ۲۴
۳-۱-۳- شیوه بررسی صفات ماکرومورفولوژیکی ۲۶
۳-۱-۴- شیوه بررسی صفات میکرومورفولوژیکی ۲۷
۳-۱-۴-۱- طرز گرفتن برش و مشاهده ی نمونه ها زیر میکروسکوپ ۲۷

۳-۱-۴-۲- کالیبره کردن میکروسکوپ ۲۷
۳-۱-۴-۳- کالیبره کردن Camera lucida و کشیدن نمونه ها با آن ۲۸
۳-۱-۴-۴- صفات میکرومورفولوژیکی مورد بررسی ۲۹
۳-۱-۵- کلیدهای مورد استفاده ۳۱
۳-۲- انواع کشت قارچ‌ها ۳۱
۳-۲-۱- کشت گونه‌های Phellinus روی PDA (Potato dextrose agar) ۳۱
۳-۲-۲- کشت مایع (Submerged culture) گونه P. torulosus ۳۱
۳-۳- عصاره گیری از فروتینگ بادی دو گونه P. torulosus و P. conchatus ۳۲
۳-۴- آزمون زیست سنجی (بررسی فعالیت ضد باکتریایی) ۳۵
۳-۴-۱- سویه های میکروبی ۳۵
۳-۴-۲- روش‌های بررسی فعالیت ضد باکتری ۳۵
۳-۴-۲-۱- روش انتشاری (Disk diffusion testing) ۳۵
۳-۴-۲-۲- آزمایش‌های رقتی ۳۷
۳-۴-۲-۲-۱- تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد باکتری‌ها ۳۷
۳-۴-۲-۲-۲- روش رقت سازی با حجم کم در میکروپلیت (Microbroth dilution) ۳۸
۳-۴-۲-۲-۳- تعیین حداقل غلظت کشنده باکتری‌ها ۳۹
۳-۵- بررسی‌های فیتوشیمیایی ۴۰
۳-۵-۱- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ۴۰
۳-۵-۱-۱- روش DPPH ۴۰
۳-۵-۱-۲- روش FRAP ۴۱
۳-۵-۲- بررسی فیتوشیمیایی برای شناسایی و اندازه‌گیری متابولیت‌های ثانویه قارچ ۴۱
۳-۵-۲-۱- اندازه‌گیری میزان پلی ساکاریدها ۴۱
۳-۵-۲-۱-۱- رسم منحنی استاندارد برای قند ۴۲
۳-۵-۲-۱-۲-اندازه‌گیری پلی ساکاریدهای کل قارچ ۴۲
۳-۵-۲-۱-۳- استخراج برای شناسایی قندهای موجود در عصاره آبی ۴۳

۳-۵-۲-۲- اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی ۴۴
۳-۵-۲-۲-۱- رسم منحنی استاندارد گالیک اسید ۴۴
نتایج ۴۸
۴- شناسایی گونه‌ها ۴۹
۴-۱- شرح گونه‌ها ۴۹
۴-۱-۱- Phellinus torulosus (Pers.) Bourd. & Galz. ۴۹
۴-۱-۲- Phellinus punctatus (P. Karsten) Pilát ۵۲
۴-۱-۳- Phellinus pectinatus (Klotzsch) Quélet ۵۴
۴-۱-۴- Phellinus glaucescens (Petch.) Ryvarden ۵۶
۴-۱-۵- Phellinus conchatus (Persoon) Quélet ۵۸
۴-۲- بررسی صفت‌های تاکسونومیکی ۶۰
۴-۳- نتایج حاصل از کشت گونه‌ها ۶۱
۴-۴- آزمون زیست سنجی ۶۲
۴-۴-۱-نتایج بررسی خواص ضد باکتریایی عصاره متانولی تام و عصاره‌های به دست آمده با قطبیت متفاوت گونه *P. torulosus* ۶۲
۴-۴-۲- نتایج بررسی خواص ضد باکتری عصاره های متانولی تام و عصاره‌های بدست آمده با قطبیت متفاوت فروتینگ بادی *P. conchatus* ۶۳
۴-۴-۲-۱- نتایج حاصل از روش انتشار روی دیسک
۴-۴-۲-۲- نتایج MIC و MBC عصاره متانولی تام و عصاره‌های بدست آمده با قطبیت متفاوت فروتینگ بادی *Phellinus conchatus* به روش رقت سازی در حجم کم ۶۶
۴-۵- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ۶۷
۴-۵-۱- نتایج بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره متانولی تام و عصاره‌های به دست آمده با قطبیت متفاوت فروتینگ بادی *P. torulosus* به روش تخریب رادیکال‌های آزاد DPPH ۶۷
۴-۵-۲- نتایج بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره متانولی تام و عصاره‌های به دست آمده با قطبیت متفاوت فروتینگ بادی *P. torulosus* به روش کاهش یون‌های فریک (Ferric Reducing Antioxidant Power) ۶۸
۴-۵-۳- نتایج بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره متانولی تام و عصاره‌های به دست آمده با قطبیت متفاوت فروتینگ بادی *P. conchatus* به روش تخریب رادیکال‌های آزاد DPPH ۶۹

۴-۵-۴- نتایج بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره‌ی متانولی تام و عصاره‌های به دست آمده با قطبیت متفاوت فروتینگ بادی *P. conchatus* به روش کاهش یون‌های فریک (Ferric Reducing Antioxidant Power) ۷۰

۴-۶- نتایج بررسی فیتوشیمیایی برای شناسایی و اندازه گیری متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها ۷۲

۴-۶-۱- نتایج حاصل از اندازه گیری میزان کل پلی ساکاریدها ی قارچ ها ۷۲

۴-۶-۲- شناسایی قندها با دستگاه GC/MS ۷۲

۴-۶-۳- نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنولی قارچ ها ۷۸

بحث ۷۹

۵-۱- شناسایی گونه‌ها ۸۰

۵-۲- فعالیت ضد باکتریایی و میزان ترکیب‌های فنولی ۸۲

۵-۳- فعالیت آنتی اکسیدانی و میزان ترکیب‌های فنولی ۸۳

پیشنهادات ۸۴

مراجع i-vii

فهرست جدول‌ها

صفحه

جدول (۲-۱) : جایگاه تاکسونومیکی گونه ها ۵

جدول(۲-۲): محصولات تهیه شده از گونه‌های *Phellinus* و اقتصاد ۱۱

جدول (۳-۱) : اطلاعات هرباریومی و کد هرباریومی گونه های جنس *Phellinus* ۲۳

جدول (۳-۲): مشخصات باکتری های مورد استفاده ۳۵

جدول (۴-۱) : صفات میکرومورفولوژیکی و ماکرومورفولوژیکی مورد بررسی به منظور شناسایی گونه های جنس *Phellinus* ۶۰

جدول (۴-۲): نتایج MIC قارچ *Phellinus torulosus* ۶۲

جدول (۴-۳): نتایج MIC قارچ *Phellinus conchatus* ۶۶

جدول (۴-۴) : مقادیر $IC_{۵۰}$ (میکروگرم بر میلی لیتر) و میکرومول آهن بر ۲۰۰ گرم عصاره ی قارچ *Phellinus torulosus* ۶۹

جدول (۴-۵): مقادیر $IC_{۵۰}$ (میکروگرم بر میلی لیتر) و میکرومول آهن بر ۲۰۰ گرم عصاره ی قارچ *Phellinus conchatus* ۷۱

جدول (۴-۶): زمان بازداری و نام مونوساکاریدها ۷۲

جدول (۴-۷): مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌های قارچ *Phellinus torulosus* ۷۸

جدول (۴-۸): مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره‌های قارچ *Phellinus conchatus* ۷۸

فهرست نمودارها

صفحه

نمودار (۴-۱): اثر عصاره‌های مختلف علیه باکتری Staphylococcus aureus ۶۳
۳۰ Chloro = کلرامفنیکل ۳۰ میکروگرم، ۱۵ Eryth = اریترومایسین ۱۵ میکروگرم
نمودار(۴-۲): اثر عصاره های مختلف علیه باکتری Bacillus cereus ۶۴
۳۰ Chloro = کلرامفنیکل ۳۰ میکروگرم، ۱۵ Eryth = اریترومایسین ۱۵ میکروگرم
نمودار(۴-۳): اثر عصاره‌های مختلف علیه باکتری *Pseudomonas aeroginosa* ۶۴
۳۰ Chloro = کلرامفنیکل ۳۰ میکروگرم، ۱۵ Eryth = اریترومایسین ۱۵ میکروگرم
نمودار(۴-۴) : میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف قارچ P. torulosus در آزمایش تخریب رادیکال‌های DPPH..... ۶۷
نمودار(۴-۵):میزان‌فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی مقادیر مختلف عصاره‌ی‌بوتانولی قارچ P. torulosusدر آزمایش تخریب‌رادیکال‌های DPPH.. ۶۷
نمودار(۴-۶):میزان فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌عصاره‌های‌مختلف‌قارچ P. torulosus درآزمایش قدرت آنتی‌اکسیدانی‌کاهش‌یونهای فریک ۶۸
نمودار(۴-۷):میزان‌فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌مقادیرمتفاوت‌ازعصاره‌بوتانولی‌قارچ P. torulosusدرآزمایش‌قدرت‌آنتی‌اکسیدانی‌کاهش‌یون-های فریک ۶۸
نمودار(۴-۸) : میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف قارچ Phellinus conchatus در آزمایش تخریب رادیکال های DPPH ۷۰
نمودار(۴-۹) : میزان فعالیت آنتی اکسیدانی مقادیر مختلف عصاره‌ی بوتانولی قارچ Phellinus conchatus در آزمایش تخریب رادیکال های DPPH..... ۷۰
نمودار(۴-۱۰): میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های مختلف قارچ P. conchatus در آزمایش قدرت آنتی اکسیدانی کاهش یون های فریک ۷۱
نمودار(۴-۱۱): میزان فعالیت آنتی اکسیدانی مقادیر مختلف عصاره‌ی بوتانولی قارچ P. conchatus در آزمایش قدرت آنتی اکسیدانی کاهش یون های فریک ۷۱

فهرست تصویرها

صفحه

تصویر (۲-۱): ساختارهای نازا موجود در گونه‌های راسته Aphyllophorales و ستاها در جنس‌های خانواده *Hymenochaetaceae* ۷

تصویر (۲-۲): دیاگرام انواع مختلف ریسه‌های موجود در فروتینگ بادی‌های قارچ‌های راسته Aphyllophorales ۸

تصویر (۲-۳): ترکیب‌های پلی فنولی جنس *Phellinus* ۱۸

تصویر (۳-۱): سمت راست، جمع آوری نمونه های قارچ ها به همراهی دکتر فروتن و مهندس موسی زاده و سمت چپ، نقطه چین های سبز و آبی به ترتیب پراگندگی گونه های *Phellinus* درایران و جمع آوری های صورت گرفته را نشان می دهد ۲۳

تصویر (۳-۲): مواد و معرف های لازم جهت بررسی صفات میکرو و ماکرو مورفولوژیکی گونه‌ها ۲۶

تصویر(۳-۳): لام مدرج استاندارد ۲ میلیمتری جهت کالیبره کردن میکروسکوپ نوری ۲۸

تصویر(۳-۴): Camera lucida وسیله‌ای جهت رسم نمونه‌های میکروسکوپی روی کاغذ ۲۸

تصویر(۳-۵): محیط کشت مایع به همراه گلوله‌های میسلیوم تولید شده پس از ۴ روز ۳۲

تصویر (۳-۶): عصاره‌ی متانولی تام و عصاره‌های بدست آمده با قطبیت متفاوت از اندام زایای قارچ‌ها ۳۳

تصویر (۳-۷): دستگاه Blender جهت خرد کردن و مخلوط کردن ۳۳

تصویر (۳-۸): دستگاه تبخیر کننده‌ی دوار جهت تغلیظ عصاره‌ها ۳۴

تصویر(۳-۹): دستگاه Sonic bath جهت حل کردن محلول‌های مختلف و ساختن عصاره‌ها ۳۴

تصویر(۳-۱۰): میکروپلیت الایزا جهت انجام روش رقت سازی با حجم کم در میکروپلیت ۳۸

تصویر (۳-۱۱): منحنی استاندارد رسم شده برای غلظت‌های مختلف گلوکز، جهت تعیین میزان قند قارچ‌های *P. torulosus* و *P. conchatus* ۴۲

تصویر(۳-۱۲): منحنی استاندارد گالیک اسید جهت اندازه گیری ترکیبات فنولی قارچ‌های *P. torulosus* و *P. conchatus* ۴۴

تصویر(۳-۱۳): دستگاه Vortex جهت یکنواخت کردن محلول‌ها ۴۵

تصویر(۳-۱۴): دستگاه UV-Visible جهت اندازه‌گیری جذب در نواحی ماوراء بنفش و مرئی ۴۶

تصویر(۳-۱۵): دستگاه GC/MS جهت شناسایی قندهای قارچ *P. torulosus* ۴۷

تصویر (۴-۱): قارچ *Phellinus torulosus* که در پایین درخت انجیلی روئیده است ۵۰

تصویر (۴-۲): قارچ *Phellinus torulosus* که روی تنه ی درخت انجیلی روئیده است ۵۰

تصویر (۴-۳): ویژگی‌های میکروسکوپی قارچ *P. torulosus* ۵۱

تصویر (۴-۴): *Phellinus punctatus* روی تنه ی درخت زالزالک روئیده است ۵۲

تصویر (۴-۵): ویژگی‌های میکروسکوپی *P. punctatus* ۵۳

تصویر (۴-۶): *Phellinus pectinatus* روی درخت ازگیل می روید ۵۴

تصویر (۴-۷): ویژگی‌های میکروسکوپی *P. pectinatus* ۵۵

تصویر (۴-۸): *Phellinus glausecence* روی درخت آلوچه ی وحشی می روید ۵۶

تصویر (۴-۹): ویژگی‌های میکروسکوپی *P. glausecence* ۵۷

تصویر (۴-۱۰): قارچ *Phellinus conchatus* که روی درخت ازگیل می روید ۵۸

تصویر (۴-۱۱): ویژگی‌های میکروسکوپی *P. conchatus* ۵۹

تصویر (۴-۱۲): کشت گونه‌های *Phellinus* روی PDA ۶۱

تصویر(۴-۱۳): سمت راست، هاله‌ی عدم رشد عصاره‌ی متانولی و شکل سمت چپ، هاله‌های عدم رشد عصاره‌های آبی و بوتانولی علیه باکتری *Staphylococcus aureus* ۶۵

تصویر(۴-۱۴): راست به چپ به ترتیب، دیسک‌های استاندارد آنتی بیوتیک، عصاره‌های متانولی، آبی و بوتانولی علیه باکتری *Bacillus cereus* ۶۵

تصویر (۴-۱۵): کروماتوگرام اصلی GC/MS حاصل از تحلیل قندها ۷۳

تصویر (۴-۱۶): قند سوربیتول و طیف جرمی آن..... ۷۴
تصویر (۴-۱۷): قند گالاکتوز و طیف جرمی آن..... ۷۵
تصویر (۴-۱۸): قند گلوسیتول و طیف جرمی آن..... ۷۶
تصویر (۴-۱۹): قند مانوز و طیف جرمی آن..... ۷۷
(تصویر ۵-۱): قارچ *P. torulosus* و ویژگی‌های میکروسکوپی آن، مورد تایید خانم دکتر معصومه قباد نژاد..... ۸۱

فصل ۱

مقدمه

۱-قارچ‌های دارویی

استفاده از قارچ‌های دارویی تاریخچه‌ای طولانی در طب سنتی شرقی دارد. بسیاری از قارچ‌هایی که به طور سنتی استفاده می شوند، دارای ویژگی‌های دارویی مهمی هستند (Ohno, *et al.*,۲۰۰۷).

در میان منابع عظیم قارچ‌ها، بازیدیومیست ها بخصوص قارچ های ماکروسکوپی دارای منابع عظیم درمانی و عناصر مفید و فعال به لحاظ بیولوژیک هستند. تقریبا ۷۰۰ گونه از بازیدیومیست ها وجود دارند که دارای فعالیت های دارویی مهمی می باشند. امروزه مطالعات علمی جدید روی قاچ های دارویی گسترش پیدا کرده است، در طول دو دهه گذشته، نه تنها در ژاپن، کره و چین بلکه در کشور آمریکا به طور گسترده ای مطالعات علمی برای نشان دادن نقش ترکیب های مشتق شده از قارچ ها در سیستم های زیستی انجام پذیرفته است. در بسیاری از کشورهای مختلف دنیا تلاش در جهت استفاده از قارچ ها و کشف متابولیت‌های آن‌ها برای درمان انواعی از بیماری ها در حال انجام است. مهم ترین اثر دارویی قارچ ها و متابولیت های آن‌ها که توجه زیادی را به خود جلب کرده است، قابلیت ضد سرطانی آن‌هاست. اولین بار Lucas و همکاران در سال ۱۹۵۷ فعالیت ضد سرطانی قارچ های بازیدیومیست را نشان دادند. قارچ های دارویی مانند *Ganoderma lucidum*، *Phellinus rimosus* و ... دارای فعالیت‌های ضد سرطان وآنتی اکسیدان بسیار هستند که نشان می دهد این قارچ ها می توانند منابع با ارزش ترکیبات آنتی تومور و آنتی اکسیدان باشند. مهم ترین ویژگی های فیزیولوژیک و اثرات داروشناختی قارچ ها، تنظیم زیستی، درمان بیماری های مختلف و پیشگیری و درمان بیماری های تهدید کننده حیات انسان مثل سرطان، آسیب های مغزی و بیماری های قلبی است. داروهای با منشاء قارچی مثل Penicillin، Griseofulvin، Ergot alkaloids و Cyclosporine و هم چنین داروهای ضد سرطان با منشاء قارچی مثل Krestin، Lentinan و Scizophyllan ترکیب‌های مشتق شده از قارچ‌ها هستند که برخی از آن‌ها قبل یا در طول شیمی درمانی به طور موثری اثرات جانبی این درمان‌ها را کاهش و اثر شیمی درمانی را افزایش می دهند (Ajith and Janardhanan, ۲۰۰۷).

با توجه به گرایش روز افزون بشر به درمان توسط مواد طبیعی، قارچ‌ها می توانند منبعی مناسب برای تـأمین این خواسته باشند. مؤثر بودن، ارزان بودن و سهولت استفاده (تهیه و مصرف) قارچ‌ها از مزایای آن‌ها در درمان به شمار می رود.

در سال‌های اخیر جمع آوری اطلاعات و تحقیق در زمینه قارچ‌های دارویی در ایران پیشرفت چشمگیری داشته است. از جمله این تحقیقات می توان به گزارش و معرفی بزرگترین قارچ خوراکی با خاصیت دارویی در مراتع ییلاقی استان مازندران (موسی زاده، ۱۳۸۰)، کشت برخی از قارچ‌های دارویی (شیتاگه، گنودرما لوسیدم، هریسیوم و پلوروتوس ارینگی) و بررسی خواص بیولوژیک و برخی خواص شیمیایی گنودرما لوسیدم (سرگزی، ۱۳۸۶) و همچنین شناسایی قارچ *Ganoderma lucidum* (Basidiomycota) از ایران و بررسی خواص ضد باکتریایی آن (کی پور، ۱۳۸۷) اشاره کرد.

۲-اهداف تحقیق

انگیزه جمع آوری و شناسایی گونه‌های جنس *Phellinus*، اهمیت دارویی گونه‌های این جنس و نیز کمبود تحقیقات و اطلاعات در زمینه شناسایی این گونه‌ها و بررسی فعالیت‌های بیولوژیکی آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی آن‌ها در ایران بوده است، که زمینه بررسی‌های گسترده ای را در ابعاد مختلف در ارتباط با این گروه از قارچها فراهم می آورد.

در ذیل اهداف کلی این تحقیق به اختصار آمده است:

۱- جمع آوری گونه های *Phellinus* از شمال کشور در تابستان و پائیز ۱۳۸۷

۲- شناسایی گونه های آن بر طبق کتاب‌های کلید و منابع اینترنتی بر اساس ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی بازیدیوکارپ و صفت‌های مهم دیگر

۳- کشت بافت گونه‌ها جهت کمک به شناسایی آن‌ها و به دست آوردن میسلیوم خالص، مورد استفاده در کشت مایع

۴- عصاره گیری از فروتینگ بادی دو گونه *P. torulosus* و *P. conchatus* و بررسی خواص ضد باکتریایی آن‌ها به روش‌های مختلف

۵- عصاره گیری از فروتینگ بادی دو گونه *P. torulosus* و *P. conchatus* و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن‌ها به روش‌های مختلف

۶- اندازه گیری کل ترکیب‌های فنولی و پلی ساکاریدی، دو متابولیت مهم در این گروه از قارچها

فصل ۲

مروری بر مطالعات انجام شده

۲- جایگاه تاکسونومیکی گونه ها

گونه های *Phellinus torulosus*، *Phellinus punctatus*، *Phellinus pectinatus*، *Phellinus glausecence* و *Phellinus conchatus* متعلق به شاخه Basidiomycota، راسته Aphyllophorales، خانواده Hymenochaetaceae، و جنس *Phellinus* جدول (۲-۱) می باشند.

جدول (۲-۱) : جایگاه تاکسونومیکی گونه ها

Kingdom	**Fungi**
Phylum	Basidiomycota
Class	Homobasidiomycetes
Order	Aphyllophorales
Family	Hymenochaetaceae
Genus	*Phellinus*
Species ۱	*P. torulosus*
Species ۲	*P. punctatus*
Species ۳	*P. pectinatus*
Species ۴	*P. glausecence*
Species ۵	*P. conchatus*

۲-۱- راسته Aphyllophorales

قارچهای متعلق به این راسته به دلیل اینکه انگل بسیاری از درختان جنگلی هستند و باعث تخریب شدید آن‌ها می شوند به لحاظ اقتصادی از اهمیت ویژه ای برخوردارند. همچنین اهمیت دیگر قارچهای تخریب کننده چوب در نقش تجزیه ای آن‌ها در تجزیه مواد آلی در اکوسیستم های جنگلی است (Natarajan & Kolandavelu, ۲۰۰۱). اولین گزارش ها در مورد شناسایی این راسته از قارچها در ایران مربوط به (Boissier & Buhse, ۱۸۶۰)و (Rabenhorst, ۱۸۷۱) می باشد. گزارش های دیگری نیز توسط سایر قارچ شناسان ایرانی و خارجی انتشار یافته که با مراجعه به کتاب قارچهای ایران (ارشاد، ۱۳۷۴) می توان اطلاعاتی در مورد آن‌ها به دست آورد. تحقیقات اساسی بعدی بر روی این راسته از قارچها بخصوص Polyporaceae s. l. توسط صابر (۱۳۵۱ و ۱۳۶۶) و سلیمانی (۱۹۷۶) صورت گرفته است. والتینگ و سوئینی (Walting & Sweeney) قارچ شناسان انگلیسی، در سال ۱۹۷۴، نیز ضمن گزارش از قارچهای ماکروسکوپی ایران از گونه های متعددی متعلق به راسته مزبور نام برده اند. تحقیقات این دانشمندان بر اساس نمونه های گردآوری شده توسط سایر محققین خارجی در سالهای ۱۹۶۹، ۱۹۷۰ و ۱۹۷۱ می باشد (صابر،۱۳۶۶). همچنین Hallenberg قارچ شناس سوئدی با سفرهای خود در سال‌های ۱۹۷۸ و ۱۹۷۹ به ایران به همراهی دکتر جعفر ارشاد و مهندس بهمن دانش پژوه و جمع آوری نمونه های بسیاری از قارچهای راسته Aphyllophorales و Heterobasidiomycetes چوب زی از مناطق جنگلی شمال ایران موفق به شناسایی و معرفی ۸ گونه، ۲ فرم و یک جنس جدید برای اولین بار در جهان و هم چنین ۸۰ گونه جدید برای ایران گردید (۱۹۷۸, ۱۹۷۹،۱۹۸۰،۱۹۸۱ Hallenberg).