ارزیابی میزان جذب برخی متابولیت‌های ثانوی (بتولین، اسید بتولینیک، فنل، فلاونوئید) و فعالیت آنتی‌اکسیدان قارچ‌های چوب زی گیاه دارویی *Betula pendula* (L.) Roth. در استان گلستان

جمیله نظری[۱]، وحیده پیام‌نور[۲*]، محمدرضا کاوسی[۳]

[۱]دانشجوی دکتری رشته جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۲]دانشیار دانشکده علوم جنگل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۳]دانشیار دانشکده علوم جنگل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۰/۱٤ ؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۵/۰۶/۱۰

چکیده

قارچ‌های چوب زی نیازهای غذایی و متابولیت‌های ثانوی را از میزبان خود جذب نموده و یکی از منابع عظیم درمانی و حاوی عناصر فعال زیستی می‌باشند. تحقیق حاضر برای اولین بار بر روی قارچ‌های ماکروسکوپی چوب‌زی درخت توس *Betula pendula* (L.) Roth.، واقع درجنگل‌های سیاه‌مرزکوه استان گلستان انجام شد. دو متابولیت ثانوی بتولین و بتولینیک اسید با ارزش ضدسرطانی در پوست گونه‌های مختلف درخت توس سنتز می‌شود، با توجه به این‌که در ایران درخت توس درحال انقراض است و استخراج این مواد موثره از پوست این درخت ناممکن است، به این منظور شناسایی قارچ‌های ماکروسکوپی مستقر در پوست گونه مورد نظر،سنجش توانایی جذب ماده موثره بتولین و بتولینیک اسید در قارچ‌های شناسایی شده با استفاده از دستگاه HPLC و همچنین ارزیابی میزان فنل (با معرف فولن – سیوکالتو)، فلاونوئید (به روش رنگ‌سنجی آلومنیوم کلراید) و فعالیت آنتی اکسیدانی (به روش DPPH) قارچ‌ها انجام گرفت. نتایج منجر به شناسایی دو گونه قارچ ماکروسکوپی (*Hyphodontia paradoxa* و *Stereum hirsutum*) گردید که توانایی جذب بتولین و بتولینیک اسید را از میزبان خود داشتند. میزان جذب متابولیت ثانوی میزبان، خواص آنتی‌اکسیدان، فنل و فلاونوئید در سطح ۰/۰۱ درصد اختلاف معنی‌داری داشتند. میزان فنل کل و ماده موثره بتولین و بتولینیک اسید در بافت قارچ *S. hirsutum* برتری خاصی نسبت به قارچ دیگر داشت. بین دو حلال (متانول و اتانول) از نظر میزان فنل و خواص آنتی‌اکسیدان تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، در حالی که میزان فلاونوئید استخراج شده با حلال اتانول بیشتر از حلال متانول بود. با توجه به نتایج بدست آمده و تائید وجود متابولیت‌های ثانوی در بافت قارچ‌ها، می‌توان آن‌ها را به عنوان منبع جدید داروهای طبیعی به جامعه معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بتولین، بتولینیک اسید، توس، گلستان، فنل، فلاونوئید، قارچ.

*نویسنده مسئول: mnoori56@gmail.com

مقدمه

گروه بزرگی از منابع فعال زیستی را قارچ‌ها تشکیل می‌دهند. بسیاری از قارچ‌ها فعالیت‌های دارویی مهمی دارند و مشهور به داشتن مواد موثر جهت فعالیت‌های ضد قارچی، ضدالتهابی، ضدسرطانی، ضدویروسی، ضدباکتریایی، حفاظت کننده کبد و ضد دیابتی و غیره هستند (Ajith and Janardhanan, 2007). برخی از این ترکیبات زیست فعال در قارچ‌ها توانسته‌اند در شرایط درون شیشه رشد سلول‌های سرطانی را متوقف نمایند لذا ممکن است در برخی موارد بتوانند جایگزین مناسبی برای داروی شیمی درمانی باشند ضمن این‌که به عنوان منابع آنتی‌اکسیدانی قوی در تغذیه سالم مورد استفاده قرار گیرند (Eilbert et al., 2008). از این میان قارچ‌های ماکروسکوپی چوبزی میزبان‌های مختلف داشته و در تنه درختان مستقر شده و جهت بقای خود ازترکیبات درونی (مواد غذایی و متابولیت‌های ثانوی) درختان استفاده می‌نمایند (Faass, 2012). تحقیق حاضر بر اساس این دید که قارچ‌های چوب‌زی قادر به جذب متابولیت‌های ثانوی (عناصر فیتوشیمیایی) از بافت میزبان خود می‌باشند، انجام گرفت.با توجه به این‌که ماده موثره بتولین و بتولینیک اسید با خاصیت دارویی و درمانی مهم در پوست درختان توس سنتز و تجمع می‌یابند این امکان وجود خواهد داشت که قارچ‌های ماکروسکوپی رشد یافته در تنه درختان توس این مواد موثره را در بافت خود جذب نماید. در این‌صورت رسیدن به چنین نتایجی با توجه به این‌که درختان توس در ایران به دلیل در حال انقراض بودن (I.U.C.N, 2001) امکان قطع و بهره‌برداری ندارند تا بتوان این مواد پر ارزش دارویی را از آن استخراج نمود، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. علاوه بر آن قارچ‌ها از سرعت رشد بالایی برخوردار هستند و قابل مقایسه با رشد درختان نمی‌باشند. استخراج ماده موثره از بافت قارچ‌ها با شرایط موجود این درخت در ایران، یک اتفاق بسیار مهم می‌باشد.

در داخل کشور در این زمینه تحقیقی صورت نگرفته است ولی در خارج ایران چندین مورد کار شده که اشاره می‌شود. بتولین و بتولینیک اسید جزء تری‌ترپنوئیدهای با ارزش می‌باشند که خواص درمانی داشته (درمان کننده انواع سوختگی‌ها‌و اگزما) و پیشگیری کننده گستره وسیعی از انواع مختلف سرطان‌ها و بیمارهای سخت مالاریا و هپاتیت می‌باشند (Feng et al., 2013). قارچ *Inonotus obliquus* به میزان مشخصی حاوی بتولین و بتولینیک اسید است که این دو ماده را از متابولسیم پوست درختان غان در حال رشد جذب می‌کند. این قارچ پلی‌پور که از خانواده بازیدیومیست‌ها است، به‌دلیل دارا بودن ماده موثره بتولین، لوپیول و میکرو استرول خاصیت ضدویروسی بسیار قوی دارد (Faass, 2012). ین و همکاران (Yin et al., 2007) پس از آزمون چند حلال مختلف موفق به استخراج بتولین از قارچ *I. obliquus* با استفاده از اتانول با ۷۵ درصد شدند. براساس آزمایشاتی که توسط جسیکا-مسیاک و همکاران (Jasicka-Misiak et al., 2010) بر روی سه گونه قارچ پلی‌پور *Piptoporus betulinus* *I. obliquus* و *Daedalea confragosa* انجام شد، میزان بتولین به‌ترتیب ۶۵/۸، ۲/۵ و ۰/۲ درصد گزارش گردید. یان –هونگ و همکاران (Yan-Hong et al., 2012) ماده موثره بتولین را در شرایط سوسپانسیون به‌وسیله کشت میسلیوم‌های قارچ *I. obliquus* تولید و بهینه‌سازی کردند و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان این قارچ را نیز تعیین نموده‌اند. در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدان و اندازه‌گیری فنل و فلاونوئید قارچ‌های بازیدیومست تحقیقاتی توسط طبری و همکاران (Tabari et al., 2013) روی قارچ پلی‌پور *Trametes gibbosa* در ایران و تیلایمهارانی و همکاران (Thillaimaharani et

al., 2013) روی قارچ دارویی *Pleurotus florida* در هند انجام شده است. با توجه به اثبات وجود ماده موثره بتولین و بتولینیک اسید در پوست درخت توس (*B. pendula*) در ایران که توسط پیام‌نور و همکاران (Payam noor et al., 2013) انجام شد. در تحقیق حاضر برای نخستین بار در کشور اقدام به شناسایی قارچ‌های چوبزی این گونه و بررسی میزان جذب این متابولیت‌ها از پوست این درختان ارزشمند و رو به انقراض، با امید یافتن جایگزین مناسب جهت تولید این ماده موثره پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: قارچ‌های ماکروسکوپی چوب‌زی در تابستان سال ١٣٩٣با جنگل‌گردشی در رویشگاه درخت توس (*B. pendula*) در منطقه سیامرزکوه شهرستان فاضل آباد استان گلستان واقع در فاصله ١٨ کیلومتری جنوب شرق شهر گرگان با عرض جغرافیایی'٤٤°٥٤ تا '٤٥°٥٤ و طول جغرافیایی '٣٨°٣٦ تا '٣٩°٣٦ جمع‌آوری گردید. دارای اقلیم مدیترانه‌ای با متوسط بارندگی سالیانه ٦٤٩ میلی‌متر و جهت دامنه به سمت شرق و غرب می‌باشد. خاک در قسمت پایین دامنه غنی‌تر و قطورتر و به سمت بالای دامنه ضعیفتر و سنگلاخی‌تر می‌گردد. پوشش گیاهی منطقه سیاه مرزکوه به دلیل مرتفع بودن و سخت‌تر شدن شرایط رویشی و کوتاه بودن دوره رویشی شامل درختان کوتاه و درختچه‌ها می‌باشد که از دامنه‌های پایین به سمت قله کوه‌ها از تراکم درختان و درختچه‌ها کاسته می‌شود. درختان توس در این منطقه به‌صورت پراکنده و در ارتفاعات بالا همراه با درختان دیگری مثل کچف و درختچه‌های کرپ و سرو کوهی در دامنه ارتفاعی بین ٢٦٠٠-٢٠٠٠ متر از سطح دریا و به صورت پراکنده دیده می‌شوند. به‌طوری‌که تشکیل یک توده واقعی ندادند. جهت شناسایی به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشکده علوم جنگل دانشگاه علوم کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان انتقال و با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر، شناسایی گردیدند.

عصاره‌گیری و تعیین میزان ماده موثره بتولین و اسید بتولینیک: قارچ‌ها شناسایی شده پس از قرار گرفتن در دمای محیط، خشک و سپس جهت عصاره‌گیری خرد شدند. از هر نمونه قارچی ١٠ گرم وزن و با ١٠٠ میلی‌لیتر اتانول ٩٥ درصد مخصوص دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با فشار بالا) مخلوط و به‌مدت حداقل ٤٨ ساعت بر روی شیکر مغناطیسی بدون حرارت قرار داده شد. پس از این مرحله به‌مدت ١٢ دقیقه نمونه‌ها در حمام اولتراسونیک قرار گرفتند. عصاره‌ها از صافی عبور و جهت تزریق به دستگاه HPLC در آزمایشگاه نگهداری شدند.استاندارد بتولین و بتولینیک اسید از شرکت سیگما خریداری شد. برای رسم منحنی استاندارد بتولین و بتولینیک اسید غلظت‌های متفاوت تهیه و به دستگاه HPLC تزریق و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید. با استفاده از معادله خط با ضریب همبستگی بالا حاصل از منحنی کالیبراسیون، غلظت بتولین و بتولینیک اسید در هر یک از نمونه‌های قارچی با استفاده از مساحت سطح زیر پیک آن‌ها محاسبه گردید (Zhao et al., 2007).

تهیه عصاره جهت اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدان، فنل و فلاونوئید: جهت تعیین مناسب‌ترین حلال، دو حلال متانول و اتانول ٨٠ درصد مورد آزمون قرار گرفتند. برای تهیه عصاره ١٠ گرم از نمونه‌های قارچ پودر شده به همراه ١٠ میلی‌لیتر از حلال‌های موردنظرمخلوط شدند. نمونه‌ها به‌مدت ٢٤ ساعت بر روی شیکر قرار گرفتند. سپس به‌مدت ١٠ دقیقه با دور ٣٥٠٠ rpm سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به‌منظور بررسی خواص آنتی‌اکسیدان، فنل و

فلاونوئید جداسازی گردید (Mashayekhi and Atashi, 2014).

سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH[1] (رادیکال آزاد چربی دوست) استفاده شد. ابتدا محلول DPPH با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار (۰/۰۴ گرم را در ۱۰۰ سی‌سی حلال) تهیه شد. یک میلی‌لیتر از محلول فوق با یک میلی‌لیتر عصاره با حلال‌های متانول و اتانول ۸۰ درصد مخلوط و به‌شدت تکان داده شد. سپس محلول آماده شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و در نهایت با استفاده از معادله زیر درصد دام‌اندازی رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری گردید (Mashayekhi and Atashi, 2014).

$$I=[(A_{blank}-A_{sample})] \times 100$$

A_{blank}: جذب DPPH در ۵۱۷ نانومتر (بدون عصاره قارچی)

A_{sample}: جذب نمونه ها در ۵۱۷ نانومتر

سنجش میزان فنل کل: مقدار ترکیبات فنل‌های کل با معرف فولن- سیکالتو[2] تعیین شد. ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین به ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌های متانولی و اتانولی قارچ‌ها، اضافه گردید. پس از اضافه کردن ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر به محلول آماده شده، نمونه‌ها ۵-۸ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. پس از آن ۳۰۰ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۱ مولار اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و حمام بخار (بن‌ماری) ۴۰ درجه قرار گرفتند. جذب نمونه‌ها در ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت و منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلفی از گالیک اسید تهیه گردید (Mashayekhi and Atashi, 2014).

تعیین میزان فلاونوئید کل: جهت اندازه‌گیری میزان فلاونوئید کل، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره‌های متانولی و اتانولی قارچ‌ها با ۱/۵ میلی‌لیتر حلال ۸۰ درصدی، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شده، سپس محلول‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و منحنی استاندارد با محلول کوئرستین در غلظت‌های مختلف تهیه گردید (Mashayekhi and Atashi, 2014).

تجزیه و تحلیل داده‌ها براساس آزمون فاکتوریل دو عامله و با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت. جهت آنالیز و تعیین سطح زیر پیک منحنی بتولین و اسید بتولینیک، از نرم‌افزار IZCO (استفاده شد و منحنی کالیبراسیون ترسیم گردید.

نتایج شناسایی قارچ‌ها: قارچ *Stereum hirsutum* (Wild ex Fr.) S. F. Gray از راسته بازیدیومیست و خانواده Stereaceae که در منابع از آن با Hairy Curtain Crust یاد شده است، شناسایی گردید. این قارچ بدون پایه، قهوه‌ایی رنگ و ساپروفیت بوده بر روی چوب‌های مرده پهن‌برگان به‌خصوص بلوط یافت می‌شود. بازیدیوکارپ آن ۸-۳ سانتی‌متر، نامنظم، نیم دایره با پرزهای مخملی در دوایر متحدالمرکز، حاشیه مواج در رنگ‌های مختلف و متنوع از طیف رنگی زرد، خرمایی، قهوه‌ای و قرمز می‌باشد و در شرایطی که در سایه رشد کرده باشد به رنگ سبز تمایل می‌یابد (شکل ۱). عضو تولید کننده هاگ[1] سطحی صاف، بدون خلل و فرج و رنگی کم رنگ‌تر از سطح رویی دارد. دارای هاگ بیضی، صاف آمیلوئید، سفید رنگ ۳/۵-۳ ×۷/۵-۶ می‌باشد. این قارچ در تمام فصل سال، مشاهده می‌شود (Kuo and Methven, 2010).

1. 2,2-Diphenyl- Picryl- Hydrazyl
2. Folin–Ciocalteu

الف ب

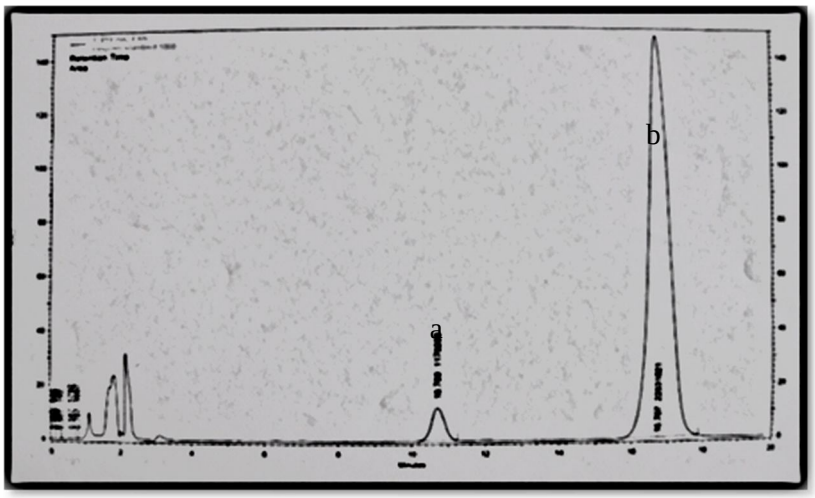
شکل ١: الف) بازیدیوکارپ *S. hirsutum* . و ب) میزان قارچ، درخت توس (*B. pendula*) در رویشگاه سیامرزکوه فاضل‌آباد

دیگر قارچ شناسایی شده، قارچ *Hyphodontia paradoxa* (Schrad.) Langer and Vesterh از دسته قارچ بازیدیومیست و خانواده *Schizoporaceae* است که مترداف آن *Schizopora paradoxa* (Schrad.) Donk می‌باشد. شبیه قارچ Irpex بدون ساقه است. ساپروفیت و گاهی اوقات پارازیت بوده و بر روی خشکه‌دارها دیده می‌شود. دارای بازیدیوکارپ، پرزدار، سفید مخملی متمایل به کرم رنگ، خاکستری و سخت گوشت می‌باشد. به‌غیر از حاشیه بازیدیوکارپ قارچ منافد از حالت حفره‌ای به شکل تیغه تغییر شکل پیدا می‌کند (شکل ٢). عضو تولید کننده هاگ منافذ سفید به اندازه ٢-٣ میلی‌متر دارد و هاگ آن شفاف، بیضوی، ٧-٥ × ٣-٢ میکرون بوده و این قارچ در تمام طول سال مشاهده می‌شود (Knudsen and Hansen, 1996).

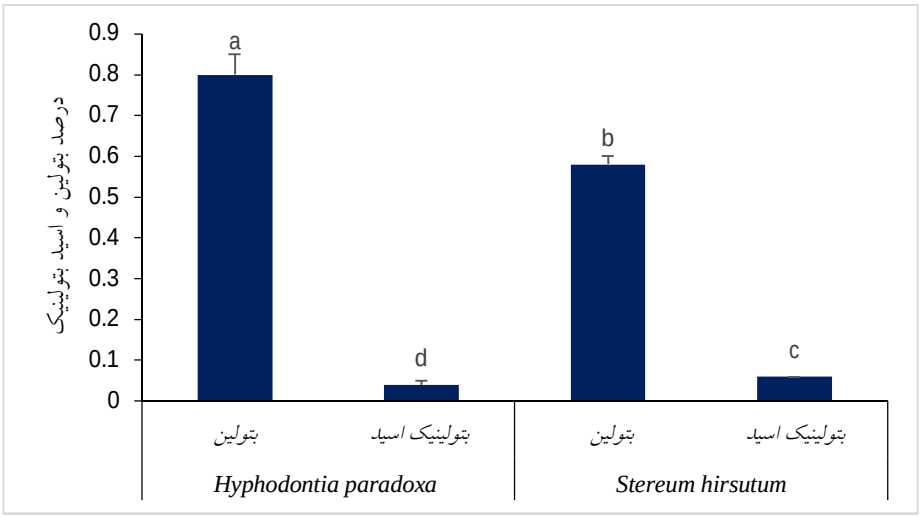
الف **ب**

شکل ٢: الف) بازیدیوکارپ و ب) سطح تیغه‌های *H. paradoxa* روی درخت توس (*B. pendula*) در منطقه سیامرزکوه فاضل آباد

ارزیابی میزان بتولین و اسید بتولینیک: با تزریق استاندارد خالص بتولین به دستگاه HPLC پس از ٢٠ -٢٢ دقیقه پیک مربوط به بتولین ظاهر شد (شکل ٣). تشخیص پیک هر نمونه در کروماتوگرام حاصل با مقایسه زمان بازداری ظاهر شدن پیک بتولین خالص (استاندارد) تزریق شده و پیک‌های حاصل از عصاره‌های تزریقی انجام گرفت. میزان بتولین هر یک از نمونه‌ها با اندازه‌گیری سطح زیر پیک نمونه در زمان موردنظر تعیین و با قرار دادن این سطح در معادله خط حاصل از تزریق غلظت‌های مختلف محاسبه شد.



شکل ۳: پیک حاصل از تزریق استاندارد (a: بتولینیک اسید و b: بتولین)



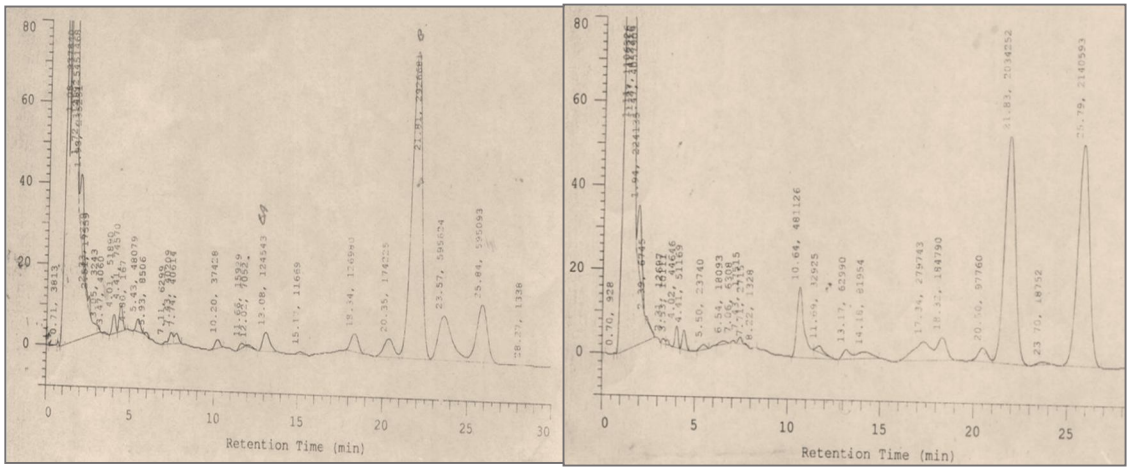
شکل ٤: مقایسه میانگین اثر متقابل میزان ماده موثره بتولین و بتولینیک اسید و گونه قارچ توس (*B. pendula*)

به‌منظور تعیین میزان بتولین و بتولینیک اسید در قارچ‌ها به‌ترتیب از معادله y=3729.8x – 23891 با ضریب همبستگی R^2= 0.9979 و y= 3430.3x - 11496.7 با ضریب همبستگی R^2= 0.9953 استفاده شد. نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد را بین دو گونه قارچ، ماده موثره (بتولین و اسید بتولینیک) و اثر متقابل آن‌ها نشان می‌دهد.

جدول ۱: تجزیه واریانس میزان بتولین و بتولینیک اسید دوگونه قارچ ماکروسکوپی *B. pendula*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌دار
دو گونه قارچ (*S. hirsutum* و *H. paradoxa*)	۱	۰/۰۳۰	۴۰/۵۰۴	۰/۰۰۰
ماده موثره (بتولین و بتولینیک اسید)	۱	۱/۲۳۱	۱۶۴۰/۵۳۹	۰/۰۰۰
اثر متقابل دو گونه قارچ و ماده موثره	۱	۰/۰۴۳	۵۵/۹۱۸	۰/۰۰۰
خطای باقیمانده	۸	۰/۰۰۱		
کل	۱۱			

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل دو گونه قارچ و میزان بتولین و بتولینیک اسید در شکل ۴ ارائه شده است. طبق نمودارمشاهده می‌شود که بیشترین میزان ماده موثره بتولین که در گروه اول آماری قرار گرفته مربوط به قارچ *H. paradoxa* (۰/۸ درصد) می‌باشد و میزان بتولینیک اسید در گروه سوم آماری قرار گرفته و میزانش در گونه قارچ *S. hirsutum* نسبت به قارچ *H. paradoxa* بیشتر می‌باشد (شکل ۵).



ب الف

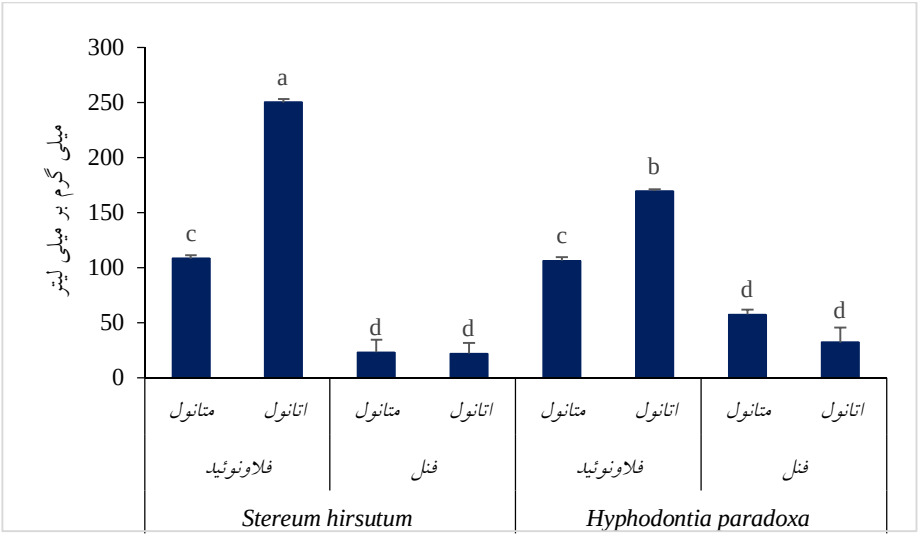
شکل ۵: الف) پیک حاصل از تزریق عصاره قارچ *S. hirsutum*
ب) پیک حاصل از تزریق عصاره قارچ *H. paradoxa*

نتایج ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدان، فنل و فلاونوئید کل قارچ‌های شناسایی شده: تجزیه واریانس اثر نوع گونه، حلال و اثر متقابل آن‌ها در جدول ۲ ارائه شده است. همان‌طورکه مشاهده می‌شود با اطمینان ۹۹ درصد اختلاف معنی‌داری بین خواص آنتی‌اکسیدان، فنل و فلاونوئید کل دو گونه قارچ شناسایی شده، وجود دارد. بین حلال‌ها و اثر متقابل آن‌ها (گونه و حلال) در مورد خواص آنتی اکسیدان و فنل کل اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود، در حالی که در مورد فلاونوئید کل بین حلال اتانولی و متانولی و اثر متقابل آن‌ها رابطه معنی‌داری مشاهده شد. نتایج خواص آنتی‌اکسیدان بین دو گونه قارچ نشان داد که، قارچ *S. hirsutum* با ۹۱/۵ درصد خاصیت آنتی‌اکسیدان بیشتری نسبت به قارچ *H. paradoxa* با ۸۱/۲ درصد داشت. همچنین از نظر میزان فلاونوئید کل دو گونه قارچ نتایج همانند خواص آنتی‌اکسیدان بود، طوری‌که قارچ *S. hirsutum* با ۱۷۹/۱۶۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حاوی فلاونوئید بیشتری از *H. paradoxa* (۱۳۷/۶۶۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود. نتایج فنل کل متفاوت از فلاونوئید و آنتی‌اکسیدان بود، به‌طوری‌که قارچ *H. paradoxa* با ۴۹/۸۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر میزان فنل بیشتری از *S. hirsutum* (۲۲/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) داشت.

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس خاصیت آنتی‌اکسیدان، فنل و فلاونوئید کل دو قارچ‌های ماکروسکوپی توس (*B. pendula*)

	منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌دار
آنتی‌اکسیدان	گونه قارچ (*S. hirsutum* و *H. paradoxa*)	۱	۳۲۳/۲۵۴	۹/۲۹۵	۰/۰۱۶
	حلال (اتانول و متانول)	۱	۹۴/۱۷۰	۲/۷۰۸	۰/۱۳۸
	اثر متقابل دو گونه قارچ × حلال	۱	۲۹/۶۹۸	۰/۸۵۴	۰/۳۸۲
	خطای باقیمانده	۸	۳۴/۷۷۷		
	کل	۱۱			
فنل کل	گونه قارچ (*S. hirsutum* و *H. paradoxa*)	۱	۲۲۶۸/۷۵۰	۳۶/۰۱۲	۰/۰۰۰
	حلال (اتانول و متانول)	۱	۲۰۰/۰۸۳	۳/۱۷۶	۰/۱۱۳
	اثر متقابل دو گونه قارچ × حلال	۱	۱۴۰/۰۸۳	۲/۲۲۴	۰/۱۷۴
	خطای باقیمانده	۸	۶۳/۰۰		
	کل	۱۱			
فلاونوئید کل	گونه قارچ (*S. hirsutum* و *H. paradoxa*)	۱	۵۱۶۶/۷۵۰	۷۷۵/۰۱۳	۰/۰۰
	حلال (اتانول و متانول)	۱	۳۱۷۲۴/۰۸۳	۴۷۵۸/۶۱۲	۰/۰۰۰
	اثر متقابل دو گونه قارچ × حلال	۱	۴۶۸۰/۷۵۰	۷۰۲/۱۱۳	۰/۰۰۰
	خطای باقیمانده	۸	۶/۶۶۷		
	کل	۱۱			

نتایج ارزیابی میزان فنل و فلاونوئید قارچ‌های شناسایی شده: برای تعیین محتوای فنل کل از گالیک اسید به عنوان استاندارد استفاده و منحنی استاندارد آن رسم گردید. سپس با استفاده از معادله خط حاصل y=0.0059x-0.0068 با ضریب همبستگی R^2= 0.9967 محتوای فنل کل هر نمونه قارچ ماکروسکوپی تعیین شد. همچنین به‌منظور تعیین محتوای فلاونوئید کل عصاره‌های قارچی از کوئرستین به‌عنوان استاندارد استفاده و منحنی استاندارد آن رسم گردید. سپس با استفاده از معادله خط حاصل y=0.0057x-0.0785 با ضریب همبستگی R^2= 0.9927، مقدار فلاونوئید کل هر نمونه قارچ تعیین شد.



شکل ٦: مقایسه میانگین اثر متقابل فنل و فلاونوئید کل گونه قارچ ماکروسکوپی در حلال مختلف.

طبق نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل میزان فلاونوئید کل دو گونه قارچ در دو حلال مختلف (اتانول و متانول) که در شکل ۶ نمایش داده شده است سه کلاسه‌مختلف آماری مشاهده می‌شود. براساس نتایج بیشترین میزان فلاونوئید کل، در گونه قارچ *S. hirsutum* در حلال اتانولی به میزان ۲۵۰/۳۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد.

بحث

بازیدیومیست‌ها گروه مهمی از قارچ‌ها هستند که برخی از آن‌ها ارزش خوراکی داشته و جهت استفاده به‌صورت غذا کشت می‌گردند. همچنین بازیدیومیست‌ها به خاطر تولید انواع مواد ثانوی ویژه خود از لحاظ طعم، عطر، رنگ و خصوصیات سمی مورد توجه می‌باشند و در علوم پزشکی، کشاورزی و صنعت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Ajith and Janardhanan, 2007). نتایج تحقیق حاضر نشان داد بنا به شرایط اکولوژیکی نامساعد رویشگاه توس در منطقه سیامرزکوه فاضل آباد استان گلستان تنها دو گونه قارچ ماکروسکوپی با نام‌های *H. paradoxa* و *S. hirsutum.* قادر به رشد در تنه این‌درختان بودند که این دو قارچ جزء قارچ‌های بازیدیومیست می‌باشند. با توجه به شرایط اکوفیزیولوژی قارچ‌ها با میزبان خود در رویشگاه سیامرزکوه ارتباطات فیتوشیمیایی بین آن‌ها برقرار شده بود، طوری‌که ترکیبات عصاره قارچ‌های جداسازی شده از تنه گونه توس (*B. pendula*) با استفاده از دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با فشار بالا)مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص گردید که این دو قارچ ماکروسکوپی حاوی ماده موثره (بتولین و بتولینیک اسید) میزبان خودبودند. وجود این مواد ثانوی در بافت قارچ‌های شناسایی شده اثبات کننده نتایج تحقیق فس (Faass, 2012) که نشان داد قارچ‌ها با میزبان خود ارتباط فیتوشیمیایی داشته مواد غذایی و متابولیت‌های ثانوی میزبان خود را جذب می‌کنند، می‌باشد. همچنین در برخی موارد بسته به شرایط اکولوژیکی گیاهان و درختان ارتباط بسیار قوی شده طوری که به قارچ‌ها اجازه می‌دهد برخی اعمال مانند سنتز ترکیبات شیمیایی میزبان خود را انجام دهند.

نتایج ارزیابی ترکیبات عصاره قارچ‌ها نشان داد که قارچ *H. paradoxa* با ۰/۸ درصد بتولین بیشتری از قارچ *S. hirsutum* با ۰/۶ درصدجذب نموده است و بتولینیک اسید برعکس طوری که قارچ *S. hirsutum*، ۰/۶۰ درصد و قارچ *H. paradoxa*، ۰/۴۰ درصد جذب نموده است. اگر چه میزان ماده موثره در بافت قارچ‌ها نسبت به پوست درخت گونه‌های توس در ایران که درتحقیقی توسط مهری‌راد (Mehrirad, 2014) انجام گرفته وحدود ۲-۷ درصد گزارش نموده، کمتر می‌باشد ولی بنا به‌دلیل درحال انقراض بودن گونه‌های این درخت در ایران امکان قطع و بهره‌برداری آن‌ها جهت استفاده در صنعت داروسازی و آرایشی و بهداشتی وجود ندارد (I.U.C.N, 2001). بر اساس این موضوع که اجازه بهره‌برداری از گونه‌های توس با هدف استخراج ماده موثره وجود ندارد از چند سال اخیر در ایران تحقیقات جدیدی با استفاده از تکنیک-های نوین کشت بافت و سلول و با استفاده از محرک‌ها و پیش‌ماده‌ها شروع شده و میزان بتولین را در بافت کالوس ریزنمونه برگی درخت توس ۰/۱ درصد اندازه‌گیری نمودند (Mehrirad, 2014) که این میزان در مقایسه با استخراج طبیعی از پوست درخت بسیار کم و هزینه‌بردار می‌باشد و در حالی‌که در تحقیق حاضر به‌صورت طبیعی میزان این ماده موثره در بازیدیوکارپ قارچ‌ها حدود ۸ برابر بیشتر از آخرین تحقیقات گزارش شده در ایران که توسط مهری‌راد (Mehrirad, 2014) در شرایط درون شیشه‌ای انجام شده، می‌باشد، که دستیابی به چنین

نتیجه‌ای بسیار حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین با دستیابی به چنین نتیجه که امکان تولید ماده موثره میزبان در بافت قارچ‌های استقرار یافته وجود دارد، می‌توان با تکثیر آن‌ها، ماده موثره مد نظر را مستقیما از بافت قارچ‌ها استخراج نمود. علاوه براین مشخص شده که تولید محصولات با ارزش از منبع میکروبی آسان‌تر، با سرعت بالاتر و اقتصادی‌تر بوده و در کاهش قیمت فروش آن‌ها موثر است (kartal et al,. 2004). نتایج تحقیق حاضر بیان کننده این امکان است که با جمع‌آوری دو قارچ (*S. hirsutum* و *H. paradoxa*) مستقر در پوست درخت توس و تکثیر آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی و یا عرصه‌ایی می‌توان بتولین و بتولینک اسید و دیگر ترکیبات ثانوی را مستقیما از آن‌ها استخراج نمود، درحالی که میزبان با ارزش آن (درخت توس در حال انقراض) از گزند قطع و بهره‌برداری حفظ می‌گردد.

نتایج تحقیق حاضر از نظر وجود ماده موثره با ارزش بتولین و بتولینک اسیددر بافت قارچ‌های ماکروسکوپی که خواص درمانی داشته (درمان کننده انواع سوختگی‌هاو اگزما) و پیش‌گیری کننده گستره وسیعی از انواع مختلف سرطان‌ها و بیمارهای سخت مالاریا و هپاتیت (Feng et al., 2013) با نتایج تحقیقات ین و همکاران (Yin et al., 2007)، جسیکا-مسیاک و همکاران (Jasicka-Misiak et al., 2010) و فس و همکاران (Faass et al., 2012) هم‌راستا می‌باشد.

امروزه بسیاری از متخصصان تغذیه برای تأمین آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز بدن،این مواد را از گیاهان، قارچ‌ها و پوست درختان استخراج می‌کنند که عوارض جانبی کمتر و اثر بخشی بیشتری دارند (Rice-Evans, 2004). براساس نتایج ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی این دو گونه قارچی، قارچ *S. hirsutum* بیشترین خاصیت را با ۹۱/۵ درصد نسبت به قارچ *H. paradoxa* با ۸۱/۲ درصد داشت. تحقیق تیلایمهارانی و همکاران (Thillaimaharani et al., 2013) نشان داد میزان خواص آنتی‌اکسیدان قارچ *P. florida* که با ۴ حلال مختلف (اتانول، متانول، کلروفرم و اتیل استات) اندازه‌گیری نمودند در حلال اتانولی بیشترین مقدار را داشته است. در تحقیق حاضر بین حلال اتانولی و متانولی از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و از نظر میزان خواص آنتی‌اکسیدان، حلال متانولی درصد بالاتری از حلال اتانولی نشان داد که با نتایج آزمایشات تحقیق حاضر در یک راستا نمی‌باشند.

اندازه‌گیری میزان کل ترکیبات فنلی قارچ‌های بازیدیومیست درخت توس (*B. pendula*) نشان داد که گونه‌های مختلف قارچی حاوی میزان قابل توجهی فنل در ساختمان سلولی خود می‌باشند که از آن‌ها می‌توان در مصارف دارویی استفاده نمود (Tabari et al., 2013). میزان فنل کل مربوط به قارچ *H. paradoxa* با ۴۹/۸۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشتر از قارچ *S. hirsutum* (۲۲/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بود.معنی‌دار نبودن تاثیر حلال‌ها در پس دادن فنل کل در عصاره قارچی تحقیق حاضر با نتایج تحقیق تیلایمهارانی و همکاران (Thillaimaharani et al., 2013) که بیشترین میزان فنل را در حلال اتانولی معرفی نمودند، همراستا نمی‌باشد. به لحاظ فلاونوئید کل دو قارچ‌های ماکروسکوپی، بیشترین میزان آن مربوط *H. paradoxa* با ۲۵۰/۳۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آن هم در حلال اتانولی می‌باشد که از این نظر با تحقیق تیلایمهارانی و همکاران (Thillaimaharani et al., 2013) هم‌خوانی دارد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که قارچ‌های *S. hirsutum* و *H. paradoxa* از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی، فنل و فلاونوئید بالا جزء قارچ‌های دارویی ارزشمند مطرح بوده و در تامین نیازهای

دارویی جامعه بشری امروزه نقش موثری دارد. این قارچ‌ها با داشتن چنین ترکیبات ثانوی قابل استفاده در صنعت داروسازی، بیوشیمی، تولید لوازم آرایشی و بهداشتی می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق قارچ‌های بازیدیومیست شناسایی شده از میزبان درخت گونه توس (*B. pendula*) حاوی متابولیت‌های ثانوی گوناگونی بودند که این نتایج براساس پیک‌های حاصل از منحنی کروماتوگرافی دستگاه HPLC حاصل شده و از جمله قارچ‌های دارویی با خاصیت آنتی بیوتیک، ضدباکتریایی و دارای خواص بالای آنتی‌آکسیدان می‌باشد (Ajith and Janardhanan, 2007)، درنتیجه می‌توان به‌عنوان یکی از امیدبخش‌ترین موجودات زنده‌ای که در تحقیقات زیست فناوری (در عرصه‌های صنعت، پزشکی و کشاورزی) با خاصیت درمان طبیعی معرفی شوند.

References

1. Ajith, T.A., Janardhanan, K.K. 2007. Indian medicinal mushroom as a source of antioxidant and antitumor agents. Journal Clinical Biochemical Nutrition, 40 (3): 157-62.
2. Eilbert, F., Engler-Lohr, M., Anke, H., Sterner, O. 2008. Bioactive sesquiterpenes from basidiomycete resupinatus leghtonii. Journal of natural products, 63: 1286-1287.
3. Faass, N. 2012. The healing powers of wild Chaga; an interview with Cass Ingram, MD. Journal of health and healing, 35(4):6-11.
4. Feng, Y., Li, M., Liu, J., Xu, T.Y., Fang, R.S., Chen, Q.H., He, G.Q. 2013. A novel one-step microbial transformation of betulin to betulinic acid catalyzed by Cunningham Ella blakesleeana. Journal of Food chemistry, 136: 73-79.
5. I.U.C.N. 2001. Red list categories and criteria. IUSN, Gland, Switzerland.
6. Jasicka-Misiak, I., Lipok, J., Swider, I., Kafarski, P. 2010. Possible fungistatic implications of betulin presence in betulaceae plants and their hymenochaetaceae parasitic fungi. Z. Naturforsch, 65 c: 201-206.
7. Kartal, M., Konuklugil, B., Indrayanto, G., Alfermann, A.W. 2004. Comparison of different extraction methods for the determination of podophyllotoxinand 6-methoxypodophyllotoxin in *Linum* species. Journal of Pharmacology, 35: 441-447.
8. Knudsen, H., Hansen, L. 1996. Nomenclatural notes to Nordic Macromycetes Vol. 1 and 3. Nordic Journal of Botany, 16(2): 211-221.
9. Kuo, M., Methven, A. 2010. 100 Cool Mushrooms. Ann Arbor: University of Michigan Press. Michigan, USA, 210p.
10. Mashayekhi, K., Atashi, S. 2014. The analyzing methods in plant physiology. Sirang press. Gorgan, 310p. (In Persian)
11. Mehrirad, N. 2014. Possibility to increase Betulin extract of *Betula litwinowii* callus in *In vitro* condition, M.Sc. thesis in Sylviculture and Forest Ecology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, 74p.
12. Payamnoor, V., Nazari, J., Alizade, M. 2013. Report of research and technology faculty of forest sciences in iran, callogenesis of birch and evaluation of betulin compared to other vegetative organs of the tree using HPLC techniques, 30p.
13. Rice-evans, C. 2004. Flavonoids and is flavones (absorption, metabolism and bioactivity). Free Radical Biology and Medicine, 36: 827-830.
14. Tabari, Sh.M., Ghorbanli, M., Safaiyan, Sh., Mosazade, S.M. 2013. Compare features antioxidant and phytochemical *Trametes gibbosa*. New cellular and molecular biotechnology journal, 3(10): 74-78. (In Persian)
15. Thillaimaharani, K.A., Sharmila, K., Thangaraju, P., Karthick, M., Kalaiselvam, M. 2013. Studies on antimicrobial and antioxidant properties

of oyster mushroom *Pleurotus florida*. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 4(4): 1540-1545.

16. Yan-Hong, B., Yong-Qiang, F., Duo-Bin, M., Chun-Ping, Xu. 2012. Optimization for betulin production from mycelia culture of *Inonotus obliquus* by orthogonal design and evaluation of its antioxidant activity. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 43:663–690.
17. Yin, Y., Cui, Y., Ding, H. 2007. Optimization of betulin extraction process from *Inonotus Obliquus* with pulsed electric fields. Journal of Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9: 306–310.
18. Zhao, G., Yan, W.D., Cao, D. 2007. Simultaneous determination of Betulin and Betulinic acid in white birch bark using RP–HPLC, Journal of Pharmacology Biomedical Anal. 43: 959–962.