ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت جداشده از برخی گونه‌های دارویی بومی استان گلستان

ساره حاتم‌زاده[۱]، کامران رهنما[۲*]، سعید نصراله‌نژاد[۲]، خلیل بردی فتوحی‌فر[۳]، خدایارهمتی[٤]، جیمز وایت[٥]

[۱]دکتری بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۲]دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۳]دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی،دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

[۴]دانشیار، گروه باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

[۵]استاد، گروه بیولوژی بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه راتگرز، نیوبرونزویک نیوجرسی، آمریکا

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۳۱

چکیده

گیاهان دارویی منبع بسیار غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند، قارچ‌های اندوفیت گیاهان دارویی درنتیجه همزیستی طولانی‌مدت با این گیاهان می‌توانند برخی خصوصیات زیستی گیاه میزبان خود و توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی را به دست آورده‌اند. ازاین‌رو در این پژوهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت همزیست با هفت گیاه دارویی از تیره Asteraceae شامل *Matricaria chamomilla, Anthemis triumfetii, Anthemis parthenium, Anthemis altissima var. altissima, Achillea millefolium, Achillea filipendulina, Cichorium intybus* موردبررسی قرار گرفت. نمونه‌برداری از گیاهان سالم و عاری از هرگونه علائم بیماری از بیشتر مناطق رویشگاه این گیاهان از ارتفاعات استان گلستان در بهار ۱۳۹۵انجام شد. پس از جداسازی قارچ‌ها و بررسی‌های ریخت‌شناسی و شناسایی مولکولی به روش چندژنی خاصیت آنتی‌اکسیدانی ۳۷ گونه قارچ اندوفیت به روش تخریب رادیکال‌های آزاد DPPH موردبررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد بین خواص آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت مشاهده گردید و دامنه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین ۳۲/۱۱ تا ۹۸/۸۳ درصد متغیر بود. کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به قارچ *Stemphylium amaranthi* که از بافت برگ گونه *Anthemis triumfetii* جدا شده بود و بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به قارچ *Trametes versicolor* جدا شده از بافت ساقه گونه بومادران زرد (*Achillea filipendulina*) بود. همچنین از نظر فعالیت انتی اکسیدانی گونه قارچ گوش ماهی *Schizophyllum commune* با میزان ۹۸/۸ درصد در یک گروه با قارچ *T. versicolor* از بازیدیومیست‌ها قرار گرفت. گونه‌هایی از جنس *Cladioporium* sp. شامل *Cladosporium cladosporioides* و *Cladosporium ramotenellum* میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را حدود ۹۷ درصد از خود نشان دادند. با توجه به زمان تولید کوتاه مدت و نرخ رشد بالای قارچ‌ها و عدم نیاز به تخریب اکوسیستم نسبت به حفظ ذخایر گیاهان دارویی می‌توانند اندوفیتها را به انتخاب خوبی برای تولید مواد آنتی‌اکسیدانی تبدیل کند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدانی، قارچ اندوفیت، گیاهان دارویی، Asteraceae

*نویسنده مسئول: Kamranrahnama1995@gmail.com

مقدمه

قارچ‌های اندوفیت از مهمترین میکروارگانیسم‌های نهفته همراه با گیاهان در طبیعت هستند که همراه با گیاهان تک لپه‌ای و دولپه‌ای بوده و در طی چند سال گذشته به اهمیت آنها در حفاظت از گیاهان در برابر استرس، خشکی و شوری خاک پی برده شده است. لیکن این عوامل از گیاهان دارویی کمتر در مقایسه با سایر گیاهان مورد مطالعه قرار گرفته است. اولین گزارش شناخته شده از قارچ‌های اندوفیت توسط دانشمندانی صورت گرفت که هیف‌های قارچی را در داخل دانه‌های به ظاهر سالم *Lolium temulentum*، گراسی که در زمان‌های قدیم به عنوان علف هرز سمی شناخته شده بود، مشاهده کردند (Sánchez Márquez et al., 2010). ژئو در سال ۱۹۹۹ قارچ‌های اندوفیت را در گیاه دارویی پالم‌فن چینی (*Livistona chinesis*) در هنک کنگ موردبررسی قرار داد و تعداد ٦٠ گونه بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی شناسایی کرد (Guo et al., 1999). سپس مطالعه قارچ‌های اندوفیت در درخت *Rubus parviflor* در کانادا انجام گرفت (Shamouna and Sieber, 2000). مطالعه فراوانی قارچ‌های اندوفیت در چهار گیاه رازیانه، کاهو، کاسنی و کرفس نشان داد که جنس‌های *Fusarium*، *Alternaria*، *Acremonium* در هر چهار گیاه یافت شدند و گونه *Plectosporium tabacinum* گونه غالب جداسازی شده بود (D'Amico et al., 2008). علی‌رغم مطالعات زیادی که روی قارچ‌های اندوفیت در دنیا انجام گرفته است، در ایران مطالعات در زمینه قارچ های اندوفیت گیاهان دارویی بسیار اندک می‌باشد. به منظور جداسازی قارچ های اندوفیت و بررسی تولید تاکسول در این قارچ‌ها از سرخدار بومی ایران *Taxus baccata*، تعداد ۸۰ جدایه اندوفیت جداسازی گردیده است که در این بین، پنج جدایه قادر به تولید تاکسول بودند (نصیری مدیسه و همکاران ۱۳۸۸). در مطالعه‌ای که در استان همدان برای بررسی حضور قارچ‌های اندوفیت در گیاه آویشن انجام گرفت، جنس‌های *Phoma*، *Alternaria*، *Fusarium*، *Stemphylium*، *Ulocladium* تحت عنوان اندوفیت از گیاه آویشن با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی شناسایی شدند (Masoumi et al., 2012).

در سال ۱۳۹۱ به منظور شناسایی قارچ‌های اندوفیت گیاه سرخدار معمولی نمونه‌هایی از بافت‌های سالم پوست و شاخه این گیاه از مناطق زرین گل شهرستان علی آباد استان گلستان و باغ گیاه‌شناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گونه‌های *C.*، *C. herbarum*، *Cladosporium cladosporioides*، *subtilissimum C. basiinflatum* و *C. perangustum* با استفاده از روش مورفولوژیکی شناسایی شدند (Jam Ashkezari et al., 2014).

اخیرا استفاده از گیاهان دارویی به خاطر کاربرد چند منظوره آنها و تنوع فراوان آنها برای منابع جدیدی از آنتی‌اکسیدان‌ها مورد مطالعه فراوان قرار گرفته‌اند (Srinivasan et al., 2010). علی‌الخصوص خاصیت آنتی‌اکسیدانی به‌میزان بالا برای ترکیب‌های فنولیک و فلاونوئید حاصل از گیاهان به اثبات رسیده است. یکی از مهمترین اثرات تخریبی رادیکال های آزاد شروع پراکسیداسیون لیپید می‌باشد که به تخریب غشای سلول منجر می‌شود. پراکسیداسیون لیپید باعث اختلال در سازمان‌بندی غشا و تغییر فعالیت آنزیم‌های وابسته به آن و پروتئین‌های دیگر می‌شود که همراه با آزاد کردن رادیکال‌های هیدروپراکسیل وآلکوپراکسیل به‌صورت بالقوه برای سلول مضر می‌باشد. وجود میزان بالا رادیکال‌های آزاد در بدن خطرناک است زیرا با آسیب به سلول‌ها

می‌توانند منجر به سرطان شوند (Jagadish et al., 2009).

بدن برای مقابله با رادیکال های آزاد شروع به تولید مقادیری آنتی‌اکسیدان‌های مورد نیاز می‌نماید. از این رو، مصرف آنتی‌اکسیدان در رژیم غذایی ضروری است. اندوفیتها میکروارگانیسم‌های هستند که در داخل گیاه بخصوص برگها، ساقه‌ها و ریشه‌ها به صورت همزیست زندگی می کنند و هیچ آسیبی آشکاری به میزبان نمی‌رسانند (Duan et al., 2010). تقریبا همه رده‌های گیاهان آوندی و گیاهان داروئی موردبررسی قرار گرفته تا به امروز میزبان موجودات اندوفیت هستند (Aly et al., 2011). قارچ‌های اندوفیت مخزن متابولیت‌های ثانویه میزبان خود بوده و حاوی ترکیبات فعال زیستی می‌باشند. قارچ های اندوفیت گیاهان دارویی درنتیجه همزیستی طولانی‌مدت با این گیاهان می توانند توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه جدید را به دست آورده‌اند (Arbaayah et al., 2013). محققین باور دارند، دلیل این‌که چرا قارچ‌های اندوفیت برخی ترکیبات شیمیایی شبیه به گیاهان را تولید می‌کنند این است که یک نوترکیبی ژنتیکی در طی تکامل بین اندوفیت و میزبانش رخ داده است (Strobel et al., 1996; Shahiri et al., 2016). علاوه براین مشخص شده که تولید محصولات با ارزش از منبع میکروبی آسان تر، با سرعت بالاتر و اقتصادی تر بوده و در کاهش قیمت فروش آن ها موثر است. در همین حال، تصور می شود که برخی گیاهان تولیدکننده محصولات طبیعی فعال زیستی با اندوفیت‌های تولیدکننده محصولات طبیعی مشابه در ارتباط اند و این واقعیت که با توجه به زمان تولید کوتاه مدت و نرخ رشد بالای میکروب ها، اندوفیت‌ها را به انتخاب خوبی برای تولید مواد کاربردی در طیف گسترده ای از عرصه های پزشکی، کشاورزی و صنعتی تبدیل کرده است. همچنین بسیاری از گزارش‌ها و مطالعات در مورد فعالیت‌های بیولوژیکی اندوفیت‌ها مانند اثرات ضدسرطان و اثرات ضد میکروبی منتشر شده در صورتی‌که خواص آنتی‌اکسیدانی قارچ اندوفیت گیاهان دارویی به میزان بسیار کم مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. با توجه به اینکه استان گلستان زیست بومی غنی از تنوع زیستی و بیولوژیکی گیاهان دارویی به شمار می‌آید و امروزه در قلمرو وسیع این گیاهان، تنها تعداد انگشت شماری از گونه های گیاهی همزیست با اندوفیت‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است. در این تحقیق خواص آنتی‌اکسیدانی قارچ های اندوفیت همزیست گیاهان دارویی تیره Asteraceae در استان گلستان موردبررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی و قارچی: استان گلستان را از نظر ناهمواری‌ها می‌توان به سه ناحیه کوهستانی، کوهپایه ای و جلگه ای تقسیم کرد. درجه حرارت نقاط مختلف استان یکسان نیست. هرچه از غرب به شرق و از جنوب به شمال برویم بر دمای محیط افزوده می‌شود . روش تحقیق بدین صورت بوده است که ابتدا استان گلستان به ٤ قسمت اراضی جنگلی، مراتع قشلاقی، مراتع ییلاقی و اراضی زراعی تقسیم شد. سپس با توجه به فصل رویش هر قسمت، مبادرت به انجام عملیات صحرایی و نمونه گیری از گیاهان شد. نمونه‌برداری از گیاهان سالم و عاری از هر گونه بیماری از گونه‌های *Matricaria chamomilla, Anthemis triumfetii, Anthemis parthenium, Anthemis altissima var. altissima, Achillea millefolium, Achillea filipendulina, Cichorium intybus* از مناطق بومی این گیاهان نظیر ارتفاعات توسکستان، چهارباغ، مراوه تپه، آق قلا، پارک ملی گلستان، منطقه حفاظت شده جهان‌نما، دهنه محمدآباد،کلاله، درازنو، چه‌جا، هزارپیچ و زیارت در

استان گلستان و در فصل بهار سال ۱۳۹۵ انجام گردید.ارتفاع مکان‌های نمونه‌برداری متفاوت بوده و بالاترین ارتفاع در منطقه درازنو حدود ۲۷۷۰ متر تا کمترین ارتفاع که حدود ٥٦ متر در محدوده شهر آق قلا بود.

کشت و جداسازی قارچ‌های اندوفیت: از هر گونه گیاه دارویی ۳۰ گیاه سالم، شامل ریشه، ساقه، برگ و گل انتخاب گردید. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی در یخچال قبل از جداسازی قارچ‌های نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در زیر آب شیر شستشو سپس خشک گردیده و به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری تقسیم شده و ابتدا در اتانول ۷۵٪ به‌مدت ۱ دقیقه و در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ تا ۳ درصد به‌مدت ۳ تا ۵ دقیقه (بسته به ضخامت بافت) و سپس اتانول ۷۵ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شدند. نمونه ها پس از ضدعفونی سطحی ٦ بار در آب مقطر شسته شده و برای خشک شدن بر روی کاغذ فیلتر در شرایط استریل قرار داده شدند. پس از خشک شدن در پتری‌های حاوی PDA(Potato dextrose agar) حاوی استرپتومایسین (۲۰ میکروگرم / میلی لیتر) و کلرامفنیکل (۳۰ میکروگرم / میلی لیتر) برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها قرار داده شدند. این نمونه‌ها در دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ روز نگهداری گردیدند. سپس بررسی روزانه جهت رویت عدم حضور آلودگی ساپروفیتی و اطمینان از حضور قارچ های اندوفیت انجام گرفت. پس از رویت قارچ‌ها روی ریزنمونه‌ها به روش نوک هیف قارچ های رشد یافته از قطعات برگ جدا نموده و در محیط کشت جدید خالص سازی گردیدند. پس از خالص‌سازی ریسه‌های قارچ‌های اندوفیت در هر تیمار اقدام به تهیه اسلاید و بررسی خصوصیات ریسه‌ها، زیر میکروسکوپ و شناسایی با استفاده از بررسی‌های مورفولوژیک معتبر (Eliss, 1971) و همچنین روشهای مولکولی انجام گردید.

تهیه عصاره از قارچ‌ها: قارچ‌ها در محیط کشت PDA در ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦-۳ روز کشت شدند. برای تهیه محیط کشت سوسپانسیون برای رشد ریسه قارچ‌ها، از محیط کشت PDB (Potato dextrose broth) استفاده شد. قارچ‌ها خالص سازی شده و در قرص‌های مشخص به میزان ۵×۵ سانتی متر قطع شده و در ارلن‌های ۲۵۰ سی‌سی با ۲۰۰ سی‌سی محیط کشت PDB مایع کشت گردیده و ارلن‌های آماده شده درون شیکر در شرایط تاریکی، دمای ۲±۲۵ درجه و دور ۱۲۰ rpm برای مدت زمان ٤-۳ هفته نگهداری گردیدند. پس از گذشت این زمان ماده موثره موجود در محیط کشت قارچ استخراج گردید. بدین منظور ابتدا ریسه‌های قارچی به وسیله غربال از قسمت مایع جدا شده و با آب مقطر استریل سه بار شستشو شده و این مسیلیوم‌ها پس از پودر شدن با حجم برابر از حلال اتیل استات مخلوط و ٢٤ ساعت روی دستگاه شیکر در شرایط تاریکی، دمای ۲±۲۵ درجه و دور ۱۲۰rpm نگهداری شدند پس از طی این مدت زمان با استفاده از یک قیف دکانتور فاز آلی حاصل جداسازی و در دمای اتاق با استفاده از دستگاه روتاری تبخیر گردید. استخراج سه بار انجام گرفت و ماده خشک حاصل در یک میلی لیتر متانول حل و در ٤ درجه سانتی گراد نگهداری گردید (Jagadish et al., 2009).

بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی: برای انجام این مرحله ابتدا عصاره‌های قارچی متفاوت با متانول ۸۰ درصد مخلوط شده و به مدت ٢٤ ساعت برروی شیکر قرار داده شدند. سپس با دور ۳۵۰۰rpm به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش DPPH(2,2-diphenyl-1-

(picrylhydrazyl) استفاده شد. برای این منظور ابتدا محلول DPPH با غلظت ۰/۰۰٤ درصد تهیه و از آن یک میلی‌لیتر با یک میلی لیتر عصاره با غلظت ۱٪ درصد مخلوط و بشدت تکان داده شد. سپس محلول آماده شده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و میزان جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. سپس با استفاده از معادله زیر درصد دام اندازی رادیکال آزاد DPPH اندازه‌گیری گردید (Liu et al., 2007).

Scavenged%=Ab-As/Ab x 100

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

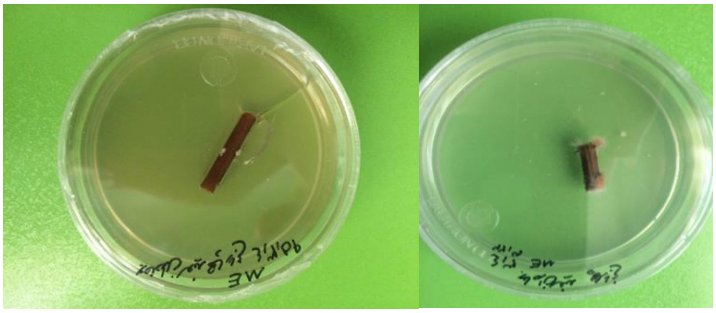
A_{sample} : جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر

طرح در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام پذیرفت و آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت پذیرفت.

شناسایی مولکولی قارچ‌های اندوفیت دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی: استخراج DNA ژنومی به روش CTAB انجام گرفت به این صورت که دیسک‌هایی از کلنی‌های رشد کرده روی محیط PDA در محیط کشت مایع PDB کشت داده شد. بطری‌های حاوی محیط کشت مایع به شیکر (با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه) انتقال یافت و پس از حدود یک هفته، میسلیوم‌های قارچ به‌دست آمد. پس از آب‌گیری، میسلیوم‌ها درهاون استریل پودر شده و ٦۰۰ میکرولیتر بافر CTAB به ویال های حاوی پودر میسلیوم اضافه و کاملاً مخلوط گردید. سپس به هرکدام از ویال‌ها ۲ میکرولیتر مرکاپتواتانول اضافه و سپس به بن ماری ٦۵C° منتقل گردیدند. پس از گذشت ٤۵ دقیقه، به‌منظور پروتیین‌زدایی، به هر ویال ٦۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم – ایزوآمیل الکل به نسبت ۱:۲٤ اضافه شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ سه فازتشکیل گرید فاز زیرین کلروفرم و فاز رویی محتوی DNA بود. بین این دو فاز مایع، لایه ای متشکل از بقایای دیواره سلولی قرار گرفت. فاز رویی با دقت به ویال‌های جدید منتقل گردید و هم حجم آن ایزوپروپانول خنک به محتویات ویال اضافه شده و بعد از ده بار وارونه کردن ویال ها، آنها را به مدت نیم ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از این مدت تیوب‌ها، به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ شده و در نهایت پس از رسوبDNA ، فاز مایع تخلیه و رسوب حاصله با اتانول ۷۰ درصد شستشو شد. بعد از خشک شدن رسوب DNA به هر ویال ۷۰ میکرولیتر آب مقطر تزریقی اضافه گردیده و پس از ۳۰دقیقه نگهداری در یخچال به فریزر ۲۰- انتقال یافت. برای تکثیر در PCR از پرایمرهای (LROR,LR5)، (BSANDRY,T1)، (EF1-983F, Efgr)، (ITS4, ITS5) هرکدام از پرایمرها به میزان ۱ میکرولیتر، DNA ژن.می به میزان ۲ میکرولیتر(٤۰ میکروگرم)، Red amplicon Master Mix 2x (۱۲,۵) میکرولیتر و آب دوبا تقطیر به میزان ۸,۵ میکرولیتر استفاده گردید (Raja et al., 2017). برای ارزیابی محصول، از آگارز یک درصد در بافر TBE با ولتاژ ۸۵ استفاده شد. رنگ آمیزی محصول PCR با استفاده از Gel red انجام گرفت و با دستگاه documentation system Gel عکس بردای انجام گرفت. سپس برای توالی یابی به روش سنگر به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. توالی ژنوم بدست آمده را ازطریق نرم افزار بلاست در NCBI موردبررسی قرار گرفت و شباهت آنها با سایر توالی موجود در بانک جهانی تعیین شده و مراحل ثبت ژن در این پایگاه انجام پذیرفت.

نتایج

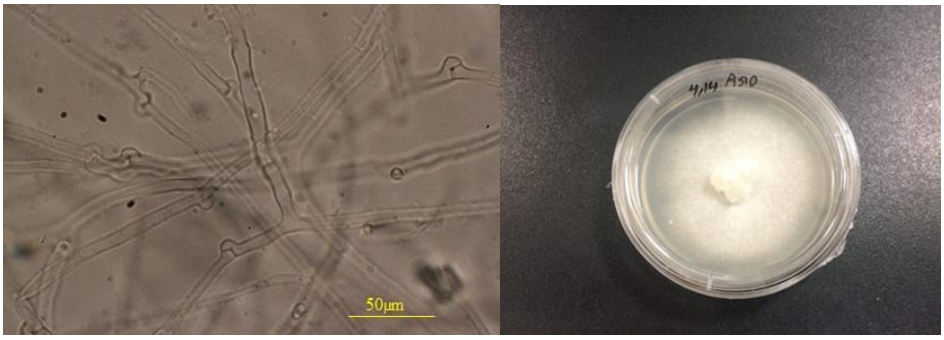
شناسایی قارچ‌های اندوفیت: در این بررسی ۸۲۷ ایزوله قارچی از هفت گونه گیاه دارویی مورد جداسازی قرار گرفت که پس از بررسی‌های مورفولوژیک و مطالعات مولکولی چند ژنی بر اساس پرایمرهای (LROR,LR5)، (BSANDRY,T1)، (EF1-983F, Efgr)، (ITS4, ITS5) تعداد ۱۰۴ گونه قارچی مورد شناسایی قرار گرفت و ژن‌های موردبررسی قرار گرفته در پایگاه داده‌های بیوتکنولوژی NCBI ثبت گردید. به دلیل تعدد گونه-های شناسایی شده از هرگونه گیاهی تعداد محدودی برای بررسی‌های انتی‌اکسیدانی در نظر گرفته شد (جدول۲). تمام این گونه‌های قارچی برای اولین بار از ایران و جهان به عنوان اندوفیت این گیاهان گزارش می‌شوند. گونه‌های *Septoria tormentillae*، *Preussia africana*، *Stephanonectria keithii* تاکنون از ایران گزارش نشده بوده و برای اولین بار در این بررسی از ایران گزارش می‌شوند و برای میکروفلور ایران جدید می‌باشند. همچنین جداسازی قارچ‌های اندوفیت از رده بازیدیومیست‌ها نظیر *Schizophyllum commune* ، *Bjerkandera adusta*، *Trametes versicolor* تا به امروز جز موارد نادر از گزارش این رده از قارچ‌ها به عنوان اندوفیت از گیاهان می‌باشند.



شکل ۱: خارج شدن قارچ‌های اندوفیت از بافت ساقه پس از ۱۴ روز روی محیط کشت PDA

گونه قارچ *Schizophyllum commune* (Fr): این گونه قارچ اندوفیت از گیاه *Anthemis altissima* جداسازی گردید و روی محیط کشت PDA پس از ۱۴ روز به رنگ سفید و پنبه‌ای، دارای نرخ رشد سریع، میسیلیوم دارای دیواره نازک، شفاف، اسپورها استوانه‌ای تا بیضوی به ابعاد ۳-۱ میکرومتر بودند، اندام باردهی قارچ در روی محیط کشت تشکیل گردید. بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناسی (Natrajan and Kolandavelu, 1998) و مولکولی جدایه مورد نظر شباهت ۹۹٪ را با گونه *Schizophyllum commune* نشان داد.

گونه قارچ *Trametes versicolor* (Fr.) pilat : این گونه قارچی که متعلق به شاخه بازیدیومایکوتا و معروف به قارچ رنگین کمان می‌باشد از بافت ساقه گونه بومادران زرد *Achillea filipendulina* جداسازی گردید و پرگنه‌های قارچ روی محیط کشت PDA پس از ۱۴ روز به رنگ سفید و پنبه ای،دارای نرخ رشد سریع، میسیلیوم دارای دیواره نازک، شفاف، منشعب و به قطر ۴-۲ میکرومتر بود. براساس خصوصیات ریخت‌شناسی (Ryvarden, L.; Johansen, I. 1980) و مولکولی چندژنی، جدایه‌ی بدست آمده *Trametes versicolor* (fr.) pilat شناسایی گردید.



شکل۲: راست: کلنی قارچ روی محیط کشت PDA. چپ:رویت قوس اتصال در قارچ *T. versicolor*

گونه قارچ *Preussia africana*(Arenal, Platas and Peláez): این گونه قارچی از گیاه *Achillea filipendulina* جداسازی گردید. کلنی قارچ روی محیط کشت PDA پس از ۱٤ روز در دمای ۲۵ درجه به قطر ۷۰ میلیمتر و به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه و فرورفته در محیط کشت بود. آسکوماتا پراکنده تا مجتمع و در بیشتر اوقات در بافت محیط کشت غوطه ور بود. سودوتسیوم به قطر ۲۸۸-۲۰۵ میکرومتر، گلابی شکل،صاف، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره دارای گردن باریک به قطر ٦۰-۵۲ ×٤۰-۲۲ میکرومتر، استوانه‌ای شکل و دارای هیف‌های به قطر ۲۰-۱۲×٤-۲ میکرومتر، پریدیوم به رنگ قهوه‌ای تیره، آسک ۱۱۰-۹۰×۱۷-۱٦ میکرومتر، هشت اسپوره،بیرنگ، استوانه‌ای شکل، اسکوسپورها به ابعاد ٤۲-۳۷×٤-۳ میکرومتر، استوانه ای شکل، بیرنگ تا قهوه‌ای تیره بودند.

شکل۳: سمت راست: آسکوکارپ قارچ *Preussia africana* سمت چپ: کلنی قارچ *Preussia africana* روی محیط کشت PDA پس از ۱٤ روز

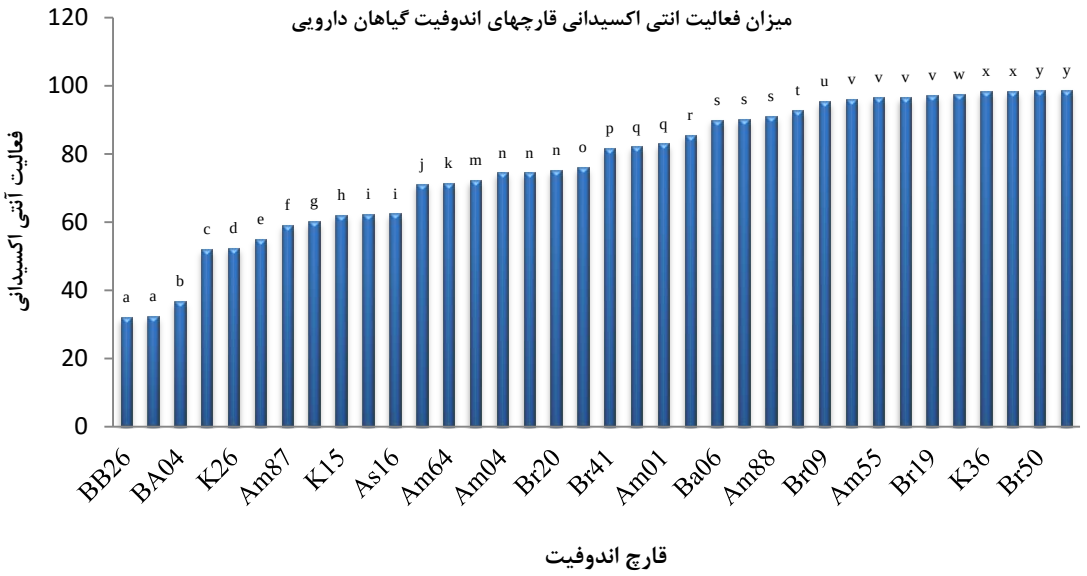
بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی: عصاره اتیل استاتی قارچ‌های اندوفیت هفت گونه گیاه دارویی از لحاظ میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفت. DPPH (۲ و ۲- دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل) رادیکال آزاد پایداری است که خصوصیت جذب آن در ۵۱۷ نانومتر برای مطالعه اثرات به دام اندازی رادیکال‌ها توسط عصاره، مورد استفاده قرار می‌گیرد. این رادیکال آزاد ارغوانی رنگ است، در تماس با ترکیب آنتی‌اکسیدان (عصاره) به ترکیب پایدار زرد رنگی تبدیل می‌شود که آنتی‌کسیدان‌ها، پروتون را به رادیکال‌های آزاد داده و سبب کاهش میزان جذب می‌شوند. کاهش میزان جذب معیاری برای سنجش به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد می‌باشد. ظرفیت به دام اندازی رادیکال‌های آزاد به روش DDPH در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج تجزیه واریانس بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی به روش ANOVA

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	سطح معنی‌دار
بین گروه‌ها	۳۵	۱۱۸۲/۳٤	۱/۰۵۳	۰/۰۰۰
درون گروه	۷۲	۱۱		
کل	۱۰۷			

بر اساس نتایج به دست آمده اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد بین خواص آنتی‌اکسیدانی قارچ‌ها مشاهده گردید که دامنه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین ۳۲/۱۱ و ۹۸/۸۳ درصد بود و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به قارچ *Stemphylium amaranthi* که از بافت برگ *Anthemis triumfetii* جدا شده بود و بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به قارچ *Trametes versicolor* از بافت ساقه گونه گیاهی بومادران زرد *Achillea santolina* بود. همچنین گونه بازیدیومیست *Schizophyllum commune* با میزان ۹۸/۸ درصد در یک گروه با قارچ *T.versicolor* قرار گرفت. در این بررسی گونه‌هایی از جنس *Cladosporium* sp. شامل *Cladosporium cladosporioides* و *Cladosporium ramotenellum* میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان دادند (جدول ۲).

بنابراین در این بررسی گونه‌های اندوفیت قارچی جدا شده از گیاه بومادران *Achillea filipendulina* فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به بقیه گیاهان از خود نشان دادند.



شکل ٤: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت از هفت گونه گیاه دارویی در استان گلستان

جدول۲: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت هفت گونه گیاه دارویی

نام ایزوله	گیاه میزبان	بافت	گونه قارچ	درصد شباهت	کد ثبت شده در NCBI	درصد مهار
AM01	*Achillea millefolium*	برگ	*Leptosphaerulina saccharicola*	٪۱۰۰	MH583749	۸۳/۳
AM04	*Achillea millefolium*	ساقه	*Septoria lycopersici var. lycopersici*	٪۹۹	MH259172	۷٤/٤۹
AM13	*Achillea millefolium*	ریشه	*Fusarium redolens*	٪۱۰۰	MH259166	۵۸/۰۸
Am33	*Achillea millefolium*	ساقه	*Colletotrichum tanaceti*	٪۱۰۰	MH259188	۹۲/۷۵
AM51	*Achillea millefolium*	برگ	*Septoria tormentillae*	٪۱۰۰	MH259171	۷٤/٤۹
AM55	*Achillea millefolium*	ساقه	*Cladosporium ramotenellum*	٪۹۹	MH259170	۹٦/۵۵
Am64	*Achillea millefolium*	ساقه	*Nemania serpens*	٪۹۹	MH259183	۷۱/۵۲
Am84	*Achillea millefolium*	برگ	*Fusarium avenacearum*	٪۱۰۰	MG583742	۷۲/۳۵
Am87	*Achillea millefolium*	برگ	*Fusarium sp.*	٪۱۰۰	MH259177	۵۹/۱۲
Am88	*Achillea millefolium*	برگ	*Alternaria burnsii*	٪۹۹	MH259181	۹۱/۱۳
As01	*Achillea filipendulina*	ساقه	*Antennariella placitae*	٪۹۸	MH250008	۷٦/۰۵
As03	*Achillea filipendulina*	ساقه	*Preussia africana*	٪۹۹	MG583753	۷٦/۰۵
As10	*Achillea filipendulina*	ساقه	*Trametes versicolor*	٪۹۹	MG583750	۹۸/۸۳
As16	*Achillea filipendulina*	ساقه	*Acremonium sclerotigenum*	٪۱۰۰	MH250010	٦۲/٤٤
As23	*Achillea filipendulina*	ساقه	*Plectosphaerella cucumerina*	٪۱۰۰	MH250007	۳۲/۲٦
BA04	*Matricaria chamomilla*	ساقه	*Xylaria sp.*	٪۹۹	MH245101	۵۲/۱۲
BA06	*Matricaria chamomilla*	ساقه	*Phoma haematocycla*	٪۹۹	MH245096	۳٦/۷۲
BA18	*Matricaria chamomilla*	ساقه	*Epicoccum nigrum*	٪۱۰۰	MH245107	۹۰/۰۱
BA24	*Matricaria chamomilla*	ساقه	*Paramyrothecium roridum*	٪۹۹	MH245097	۸۵/۵۷
BB26	*Anthemis triumfetii*	برگ	*Stemphylium amaranthi*	٪۱۰۰	MH245085	۳۲/۱۱
Bg15	*Achillea filipendulina*	گل	*Arthrinium phaeospermum*	٪۱۰۰	MH245079	۹٦/٦۱
Br09	*Anthemis altissima*	ساقه	*Verticillium dahliae*	٪۹۹	MH245075	۹۵/٤۹
Br15	*Anthemis altissima*	برگ	*Cladosporium cladosporioides*	٪۹۹	MH245072	۹۸/۲۹
Br19	*Anthemis altissima*	ساقه	*Bjerkandera adusta*	٪۹۹	MH255558	۹۷/۱۵
Br20	*Anthemis altissima*	ساقه	*Plenodomus tracheiphilus*	٪۹۹	MH245105	۷۵/۱۲
Br38	*Anthemis altissima*	برگ	*Aspergillus calidoustus*	٪۹۹	MH245078	۷۱/۲۵
Br41	*Anthemis altissima*	برگ	*Ulocladium consortiale*	٪۹۹	MH245090	۸۱/٦۲
Br42	*Anthemis altissima*	برگ	*Didymella tanaceti*	٪۱۰۰	MH245108	٦۰/۲۰
Br50	*Anthemis altissima*	ساقه	*Schizophyllum commune*	٪۹۹	MH255552	۹۸/۸
K15	*Cichorium intybus*	ساقه	*Cladosporium tenuissimum*	٪۱۰۰	MG655161	٦۲/۰۸
K20	*Cichorium intybus*	ساقه	*Bjerkandera adusta*	٪۱۰۰	MH255560	۸۲/۰۹
K26	*Cichorium intybus*	برگ	*Diaporthe noveum*	٪۹۹	MH258985	۵۲/٤۵
K36	*Cichorium intybus*	ساقه	*Epicoccum nigrum*	٪۱۰۰	MH258972	۹۸/۲۸
K37	*Cichorium intybus*	برگ	*Fusarium avenaceum*	٪۹۹	MG655164	۵۲/۰۳
Kc01	*Cichorium intybus*	ساقه	*Stephanonectria keithii*	٪۹۹	MH258976	۹۰/۰۸
K101	*Cichorium intybus*	برگ	*Penicillium canescens*	٪۹۹	MG655175	۹۷/۵۸

بحث

تمام گونه‌های قارچی گزارش شده در این بررسی برای اولین بار به عنوان اندوفیت از گیاهان دارویی مطالعه شده از تیره آفتابگردان گزارش گردیدند. نتایج این بررسی به وضوح نشان می‌دهد که جدایه‌های قارچ‌های اندوفیت برخی گیاهان داوریی که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، از نظر خاصیت آنتی‌اکسیدانی، در گروه‌های مختلف آماری قرار می‌گیرند و قدرت آنها با آنتی اکسیدان‌های استاندارد قابل مقایسه بوده و می‌توانند به عنوان منابع میکروبی، که به مراتب تولید آنها در آزمایشگاه راحت تر از گیاهان بوده و موجبات تخریب محیط زیست را به واسطه برداشت بی رویه گیاهان دارویی رخ می‌دهد نمی‌شوند، برای تولید آنتی اکسیدان‌ها مورد استفاده قرار گیرند.

تصور می‌شود که اندوفیت‌ها و گیاهان میزبان آنها به‌صورت همزمان تکامل یافته باشند، قضاوت در رابطه با ین موضوع بر اساس این واقعیت است که گونه‌های اندوفیتی نزدیک به هم از خانواده‌های گیاهی یکسان جداسازی گردیده‌اند (Aly et al., 2011). بنابراین این فرضیه را که اندوفیت‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی را از گیاه میزبانشان به ارث برده‌اند، می‌توان مطرح کرد. بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاه بومادران نشان داده است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی این گیاه حدود ۹۰ درصد بوده است (Georgieva et al., 2015)، در صورتی که در این بررسی قارچ *T. versicolor* از رده بازیدیومیکوتا که از گیاه بومادران زرد *A. filipendulina* جداسازی گردیده است، بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را حتی نسبت به گیاه میزبانش از خود نشان داد. ابراهیم‌زاده و همکاران نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاهان به حضور ترکیبات فنلی در آنها مرتبط می‌باشد (Ebrahimzadeh et al., 2015). ولیخا و همکاران بیان کردند که روند استخراج ترکیبات فنلی فاکتوری مهم در تعیین ویژگیهای آنتی‌اکسیدانی عصاره است. دما، حلال، زمان عصاره‌گیری، قدرت استخراج و روش استخراج تأثیر بارزی در محتویات عصاره خواهد گذاشت (Valikha et al., 2008). چنانچه، تفاوت موجود بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی قارچ اندوفیت و گیاه میزبانش در این بررسی ممکن است مرتبط با تفاوت در روند استخراج ترکیبات باشد. تمام گونه-های اندوفیت جنس *Cladosporium* که در این بررسی از میزبانهای متفاوت جداسازی شده بودند، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا بودند و بالاترین میزان آن حدود ۹۸ درصد و مربوط به گونه *Cladosporium cladosporioides* جداسازی شده از بابونه و سپس گونه *Cladosporium ramotenellum* با میزان حدود ۹۶ درصد، بود. مطالعه (Mirzaie et al., 2010) نشان داده شده است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه بابونه بیشتر از بومادران است. که نتایج حاصل از خاصیت آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت جداشده از آنها در این تحقیق نیز این موضوع را تایید می‌کند. مطالعه انجام شده در رابطه با قارچ‌های اندوفیت گیاهان دارویی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی گونه *C. cladosporioides* حدود ۸۰ درصد گزارش گردیده است. (Hulikere et al., 2016) خاصیت ظرفیت کاهشی در عصاره قارچ‌ها به‌دلیل قابلیت انتقال هیدروژن آنها می‌باشد که مولکول‌های مربوطه را با پذیرش یون‌های هیدروژنی از عصاره‌ها و پایان دادن به زنجیره‌های رادیکال تثبیت می‌کند. بنابراین، خاصیت ظرفیت کاهشی می‌تواند به‌عنوان یک شاخص قابل توجه از پتانسیل آنتی‌اکسیدانی یک ترکیب بیان شود. نتایج برخی پژوهش‌ها نشان داده است که قارچ *S. commune* در مقایسه با سایر قارچ‌های ماکروبازیدیومیست خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارد که با نتایج حاصل از این

بررسی مطابقت دارد (Arbaayah and Umi, 2013). بازیدیومیست‌ها گروه مهمی از قارچ ها هستند که برخی از آنها ارزش خوراکی داشته و جهت استفاده به‌صورت غذا کشت می‌گردند. همچنین بازیدیومیست‌ها به خاطر تولید انواع مواد ویژه از لحاظ طعم، عطر، رنگ و خصوصیات سمی مورد توجه می‌باشند و در علوم پزشکی، کشاورزی و صنعت مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Mirfat et al., 2010). قارچ بازیدیومیست *T. versicolor* دارای بیشترین خاصیت انتی اکسیدانی به میزان حدود ۹۸ درصد بود که در مقایسه با مطالعه ای که توسط (Jhan et al., 2016) انجام گرفته و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این قارچ را حدود ۹۰ درصدگزارش کرده، بیشتر است و این موضوع نشان دهنده این است که احتمالا همزیستی بین این قارچ و گیاه دارویی بومادران موجب افزایش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی این قارچ گردیده است. از سوی دیگر قارچ بازیدیومیست *S. commune* نیز میزان خاصیت انتی‌اکسیدانی حدود ۹۷ درصد از خود نشان داد که در مطالعه محققان دیگر (Mirfat et al., 2010) میزان آن حدود ۸۳ درصد گزارش گردیده است. اگرچه این تفاوت می‌تواند به منطقه جمع‌آوری گیاه و شرایط اکولوژیک آنها نسبت داده شود. امروزه محققین، علاقه زیادی به مطالعه اندوفیت‌های گیاهان دارویی و استخراج آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از آنها، برای کاربرد آنها به‌عنوان جانشین آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی دارند. آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی سالم تر هستند؛ فواید بیشتری دارند و با توجه به زمان تولید کوتاه مدت و نرخ رشد بالای میکروب‌ها و عدم نیاز به تخریب اکوسیستم نسبت به حفاظت از ذخایر گیاهان دارویی می‌توانند اندوفیت‌ها را به انتخاب بسیار مناسبی برای تولید مواد آنتی‌اکسیدانی تبدیل کند (Srinivasan et al., 2010; Arbaayah and Umi, 2013).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که قارچ‌های اندوفیت بازیدیومیست با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا جزء قارچ‌های دارویی ارزشمند مطرح بوده و می‌توانند به‌عنوان منابع آنتی‌اکسیدانی بالقوه در آینده نزدیک در صنایع دارویی مورد توجه قرار گیرند.

Reference

1. Aly, A.H., Debbab, A. and Chaidir, C. 2011. Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises. Applied Microbiology and Biotechnology, 90(6):1829-45.
2. Arbaayah, H.H. and Umi K.Y. 2013. Antioxidant properties in the oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) and split gill mushroom (*Schizophyllum commune*) ethanolic extracts. Mycosphere, 4 (4): 661-673.
3. Arona, M.B., Cano, A. and Acosta, M. 2001. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. Food Chemistry, 73: 239-244.
4. Barros, L., Ferreira, M.J., Queirós, B., Ferreira, C.F.R. and Baptista, P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, β-carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chemistry, 103: 413-419.
5. Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1999. Illustrated genera of imperfect fungi. APS press, 217pp.
6. D'Amico, M., Frisullo S. and Cirulli M. 2008. Endophytic fungi occurring in fennel, lettuce, chicory, and celery–commercial crops in southern Italy. Mycological Research, 112: 100-107.
7. Duan, X.J., Zhang, W.W., Li, X.M. and Wang, B.G. 2006. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*. Food Chemistry, 95: 37-43.

8. Ebrahimzadeh, M.A., Hosseinimehr, S.J., Hamidinia, A. and Jafari, M. 2008. Antioxidant, and free radical scavenging activity of *Feijoa sallowiana* fruits peel and leaves. Pharmacology, 1: 7-14.
9. Ellis, M.B. 1997. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonw. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England, 608pp.
10. Georgieva, L., Gadjalova, A., Mihaylova, D. and Pavlov, A. 2015. *Achillea millefolium* L. – phytochemical profile and in vitro antioxidant activity. International Food Research Journal, 22(4): 1347-1352.
11. Guo, L.D. 1999. Identification of endophytic fungi in *Livistona chinesis* (Palmae). Ph. D dissertation, Department of Ecology and Biodiversity, University of Hong Kong. 243pp.
12. Guo, B. 2000. Cytonic acids A & B: novel tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytonaema* species. Journal of Natural Product, 63: 602-604.
13. Hatamzadeh, M., Rahnama, K., Nasrollahnejad, S., Fotowhifar, K., Hemmati, Kh. and White, J. 2017. Isolation and Identification of some endophytic fungi of four species of Camomille in Golestan province. 3rd Iranian Mycological Congress, Kurdistan, Sanandaj, Iran.
14. Hatamzadeh, M., Rahnama, K., Nasrollahnejad, S., Fotowhifar, K., Hemmati, Kh. and White. J. 2017. Effect of plant tissue and culture media on the isolation rate of endophytic fungi of some medicinal plants. 3rd Iranian Mycological Congress, Kurdistan, Sanandaj, Iran.
15. Hulikere, M.M., Joshi, G.C.D., Jagadeesh J. and T. Nivya. 2016. Antiangiogenic, wound healing and antioxidant activity of *Cladosporium cladosporioides* (Endophytic Fungus) isolated from seaweed (Sargassum wightii). Mycology, 20(40): 22-29.
16. Jagadish, L.K., Krishnan, V.V., Shenbhagaraman, R. and Kaviyarasan, V. 2009. Comparitive study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach before and after boiling. African Journal of Biotechnology, 8(4): 654-661.
17. Jam Ashkezari, S., Fotouhifar, K. and Farzaneh, M. 2014. Identification of some endophytic fungi of common yew trees (*Taxus baccata*) in Iran. Rostaniha, 15(1): 50-64.
18. Jhan, M.H., Yeh, C.H., Tsai, C.C., Kao, C.T., Chang, C.K. and Hsieh, C.W. 2016. Enhancing the antioxidant ability of Trametes versicolor polysaccharopeptides by an enzymatic hydrolysis process. Molecules. 21: 215-220.
19. Leong, L.P. and Shui, G. 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. Food Chemistry, 76: 69-75.
20. Jagadish, L.K., Krishnan, V.V., Shenbhagaraman, R. and Kaviyarasan, V. 2009. Comparative study on the antioxidant, anticancer and antimicrobial property of *Agaricus bisporus* imbach before and after boiling. African Journal of Biotechnology, 8: 654-661. Liu, X., Mingsheng D., Xiaohong Ch., Mei J., Xin L.V. and Guijun, Y. 2007. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo* biloba. Food Chemistry, 105: 548-554.
21. Masoumi, S., Mirzai, S., Kalvandi. R. and Zafari D. 2012. Identification of fungal endophytes of thyme in Hamedan province. 20th Iranian Plant Protection Congress, Shiraz, Iran, 127.
22. Mirfat, A.H.S., Noorlidah A. and Vikineswary, S. 2010. Scavenging activity of *Schizophyllum commune* extracts and its correlation to total phenolic content. Journal of tropical agriculture and food science, 38(2): 231-238.
23. Mirzaei, A., Akbartabartori, M., Sadeghi, H. and Sharifi B. 2010. The evaluation of total phenol and antioxidant activity yarrow, wormwood and chamomile. Journal of Armaghane Danesh. 15: 243-252.
24. Natarajan, K. and Kolandavelu K. 1998. Resupinate Aphyllophorales of Tamil Nadu, India. Centre for advanced study in Botany, University of Madras, 133pp.

25. Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J. and Oberlies, N.H. 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. Journal of Natural Product, 80(3): 756-770.
26. Ryvarden, L. and Johansen, I. 1980. A preliminary polypore flora of East Africa. Fungiflora, Oslo, 636pp.
27. Sánchez Márquez, S., Bills G.F., Domínguez Acuña, L. and Zabalgogeazcoa, I. 2010. Endophytic mycobiota of leaves and roots of the grass *Holcus lanatus*. Fungal Diversity 41: 115-123.
28. Shahiri Tabarestani, M., Rahnam, K., Nasrollanejad. S. and Fatemi. M.H. 2016. Identification of Volatile Organic Compounds from *Trichoderma virens* (6011) by GC-MS and Separation of a Bioactive Compound via Nanotechnology. International Journal of Engineering, 29 (10): 1347-1353.
29. Shamouna, S.F. and Sieber, T.N. 2000. Colonisation of leaves and twigs of *Rubus parviflorus* and *R. spectabilis* by endophytic fungi in a reforestation site in British Columbia. Mycological Research, 104: 841-845.
30. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricuture and Food Chemistry, 40 (6): 945-948.
31. Silva, F., Ferreres, J.O. and Malva, A.C.P. 2005. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. Food Chemistry, 90 (2): 157-167.
32. Srinivasan, K., Jagadish, L.K., Shenbhagaraman, R. and Muthumary, J. 2010. Antioxidant activity of endophytic fungus *phyllosticta sp.* isolated from guazuma tomentosa. Journal of Phytology, 2(6): 37-41.
33. Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. S. and Hess, W. M. 1996. Taxol from Pestalotiopsis microspora, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana.* Microbiology, 142: 435-440.
34. Taga, M.S., Miller, E.E. and Pratt, D.E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemists Society, 61: 928-993.
35. Tan, R.X., and Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Natural Product Reports, 18: 448-459.
36. Vilkha, K., Mawson, R., Simons, L. and Bates, D. 2008. Application and opportunities for untrasound assisted extraction in food industry; a review. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 9: 161-169.

Evaluation of antioxidant activity of endophytic fungi isolated from some native medicinal species of Golestan province

Hatamzadeh, S.[1], Rahnama, K.[2], Nasrollahnejad, S.[2], Berdi Fotowhifar, Kh.[3], Hemmati, Kh.[4], White, J.[5]

[1]Ph.D of plant pathology,Department of Plant Protection, Faculty of plant production, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[2]Associate professor, Department of Plant Protection, Faculty of plant production, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[3]Associate professor ,Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, college of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

[4]Associate professor Department of Horticulture, Faculty of plant production, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[5]Professor, Department of Plant Biology, Rutgers University, New Brunswick, New Jersey, U.S.A.

Received: 2019-1-22; Accepted: 2019-5-21

Abstract

Medicinal plants are a very rich source of antioxidant compounds. Endophytic fungi of medicinal plants, due to long-term coexistence with these plants produce plant secondary metabolites. Therefore, in this study, the antioxidant properties of endophytic fungi isolated from 7 medicinal plants of the Asteraceae family includeing *Matricaria chamomilla, Anthemis triumfetii, Anthemis parthenium, Anthemis altissima* var. *Altissima, Achillea millefolium, Achillea filipendulina, Cichorium intybus* was investigated. The samplings were done from healthy plants and free of any diseases from most areas of Golestan province during 2016 spring. After morphological and molecular identification of endophytic fungi, the antioxidant property of 37 species of endophytic fungi was evaluated by DPPH free radicals metod. Based on the results, a significant difference of 99% was observed between the antioxidant properties of endophytic fungi. The lowest (32.1%) and highest (98.8%) antioxidant activity were related to the *Stemphylium amaranthi* and *Trametes versicolor* fungi isolated from *Anthemis triumfetii* leaf and *Achillea santolina* stem tissues, respectively. In addition, the *Schizophyllum commune* with 98.8% antioxidant activity was placed in the same group with *T. versicolor*. The *Cladioporium* spp. such as *Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium ramotenelum* showed a high antioxidant activity of about 97%. Considering short-term production and the high growth rate of fungi, endophytes maybe a good choice for the production of antioxidant substances.

Keywords: Antioxidant activity, Asreraceae family, Endophytic fungi, Medicinal plants

*Corresponding author; Kamranrahnama1995@gmail.com