

بررسی اثر القاء ایستورها بر خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات ثانویه میسلیوم قارچ‌های *Arthrinium arundinis* و *Stereum hirsutum*, *Hyphodontia paradoxa* در استان گلستان

وحیده پیام نور^{۱*}، گل‌آیم لازمی^۲، جمیله نظری^۳، عمران عالیشاه^۴

^۱دانشیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
^۲کارشناسی ارشد، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^۳دکتری، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
^۴دانشیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات پنبه کشور، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۹/۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۲۵

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثر القاء ایستورها بر خواص آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات ثانویه میسلیوم قارچ‌های *Arthrinium arundinis*، همزیست گل‌سنگ، *Hyphodontia paradoxa* و *Stereum hirsutum* به میزبانی گیاه *Betula pendula* انجام شد. در تابستان ۱۳۹۵ نمونه برداری اولیه از پوست تنه درختان از منطقه سیاه مرزکوه استان گلستان از ارتفاع ۲۴۰۰ متری از سطح دریا انجام و خالص سازی قارچ انجام شد. در ۱۳۹۷ از ذخایر میسلیومی دوساله برای تحقیق حاضر با هدف بررسی تغییرات ترکیبات ثانویه استفاده گردید. تیمارهای نیترات سدیم، نانوفیبرسلولز و سولفات منیزیم به عنوان ایستور به کار برده شدند. همچنین ارزیابی اولیه میزان تری ترپنوئید با استفاده از دستگاه HPLC با کمک استاندارد بتولین و بتولینیک اسید، انجام و جهت اطمینان از تری ترپنوئید بودن پیک مربوطه از دستگاه LC-MS استفاده شد. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی میسلیوم قارچ‌های فوق با روش DPPH صورت گرفت. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پیک مربوط به تری ترپنوئیدها که مشتقات بتولین هستند در قارچ *H. paradoxa* در ایستور نانو فیبرسلولز و قارچ *S. hirsutum* در ایستور نیترات سدیم (به ترتیب ۶/۵ و ۶/۳۷ برابر شاهد) بیشترین مقدار بوده است. در قارچ *A. arundinis* تزریق ایستورها تاثیری بر میزان تری ترپنوئیدها نداشت و به طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش آن شد. میزان آنتی‌اکسیدان *H. paradoxa* در تیمار شاهد ۸۳/۱ درصد بود و القاء ایستورها نتیجه عکس داشته و میزان خواص را کاهش داد. مقدار آنتی‌اکسیدان قارچ *A. arundinis* با ایستور منیزیم سولفات از ۸۲/۰۵ به ۸۷/۱۲ درصد و در *A. arundinis* با افزودن نیترات سدیم به محیط از ۲۴/۶۲ به ۸۶/۰۴ درصد رسید.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ایستور، تری ترپنوئید، توس، میسلیوم، متابولیت ثانویه

آنتی‌اکسیدانی و فیتوشیمیایی ترامتس جیبوزا (*Trametes gibbosa*) مطالعه شده است (Tabari et al., 2013). نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالاتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر عصاره و در غلظت‌های پایین‌تر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر عصاره حاصل شد. بای و همکاران (Bai et al., 2012) ماده موثره بتولین را در شرایط سوسپانسیون به وسیله کشت میسلیموم‌های قارچ *Inonotus obliquus* تولید و بهینه‌سازی کرده و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدان این قارچ را نیز تعیین نموده‌اند. ژائی و همکاران (Zhai et al., 2011) با استفاده از ۴۰ میکروگرم در لیتر از محرک قارچی در کشت سوسپانسیون سلولی *B. platyphylla* میزان تری‌ترپنوئید را (۲۹/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) نسبت به شاهد ۷۸ درصد افزایش داده‌اند. نجفی و همکاران (Najafi et al., 2013) اظهار داشتند نانو ذرات نقره باعث افزایش محتوای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی گیاه بومادران (*Achillea millefolium*) شد و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه را تحت تاثیر قرار داد. راعی و همکاران (Raei et al., 2014) در کشت سوسپانسیون سلولی گیاه *Aloe vera* از نانو نقره و نانو TiO_2 برای افزایش متابولیت ثانویه آلوئین استفاده نمودند و میزان این ماده موثره پس از گذشت ۴۸ ساعت افزایش یافت. اثر الیسیتورهای زیستی (*Botrytis cinerea*) و غیر زیستی (متیل جاسمونات) و فنیدون (بازدارنده اختصاصی آنزیم لپوآکسیژناز) در میزان تأثیر آنزیم لپوآکسیژناز بر تولید سنگوئینارین، در محیط کشت، بررسی و میزان افزایش مقدار آن در محیط کشت تحریک شده توسط متیل جاسمونات پس از گذشت ۱۰ ساعت، ۹/۸ برابر و پس از تحریک توسط *B. cinerea* ۹/۲ برابر، گزارش شده است (Holková et al., 2010). نظری و همکاران (Nazari et al., 2017) به ارزیابی میزان جذب برخی متابولیت‌های ثانوی (بتولین، اسید بتولینیک، فنل،

قارچ‌ها دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه تولید می‌نمایند (Macheleidt et al., 2016). این ترکیبات به‌طور مستقیم برای رشد مورد نیاز نمیباشند، اما در فعالیت‌های مختلف زیستی (Yang et al., 2018) نقش مهمی دارند. متابولیت‌های ثانوی منحصر به گونه یا حتی نژاد و اغلب در طی یک دوره رشد و نموی خاص در گیاه تولید می‌شوند و دارای عملکردهای اکولوژیکی مهم در گیاهان مانند بقا، سازگاری و رقابت (Halder et al., 2019) هستند. این دسته از ترکیبات، در حفاظت گیاهان مقابل گیاهخواران و عوامل بیماری‌زای میکروبی، به عنوان جذب‌گرده افشان‌ها و جانوران منتشرکننده بذر (Wink, 2018)، رقابت گیاه با گیاه و همزیستی گیاه با میکروب نقش دارند (Wink, 2018). بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه پیچیده‌تر از متابولیت‌های اولیه می‌باشد و به آسانی از عوامل محیطی مختلفی تاثیر می‌پذیرد از جمله نور، دما، آب موجود در خاک و حاصلخیزی آن، شوری و بطور کلی برای بسیاری از گیاهان تغییر در یک عامل خاص حتی اگر سایر عوامل ثابت باشند (Yang et al., 2018). یکی از راه‌های افزایش کمی متابولیت‌های ثانویه استفاده از الیسیتورهاست. الیسیتورها (محرک‌ها)، مولکول‌هایی با وزن مولکولی پایین می‌باشند که باعث تحریک پاسخ دفاعی در گیاهان شده (Abdul Malik et al., 2020) و با توجه به منشأ تولیدشان، در دو گروه زنده و غیرزنده طبقه‌بندی می‌گردند. الیسیتورهای غیرزنده عوامل فیزیکی، شیمیایی و هورمونی و الیسیتورهای زنده مواد با منشأ بیولوژیکی را در بر میگیرند (Naik & Al-khayri, 2016). محرک‌ها ممکن است زن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی کرده و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه شوند. ویژگی‌های

و از میسلیوم‌های دو ساله استفاده گردیده است. در مقاله از مشتقات بتولین با عنوان تری‌ترپنوئیدها یاد می‌شود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری: قارچ‌های بازیدیومیست چوب‌زی و گل‌سنگ‌های پوست‌زی با جنگل‌گردشی از محدوده ارتفاعی ۲۴۰۰ متری از سطح دریا در منطقه سیاه مرکز شهرستان فاضل‌آباد استان گلستان به میزبانی گیاه *B.pendula* در تابستان ۱۳۹۵ جمع‌آوری و توسط نظری و همکاران خالص‌سازی و شناسایی گردید (Nazari et al., 2017; Nazari et al., 2018). قارچ همزیست گل‌سنگ، *Arthrinium arundinis* و قارچ‌های چوب‌زی *Stereum hirsutum* وجود *Hyphodontia paradoxa* تشخیص داده شد. وجود بتولین و بتولینیک اسید برای قارچ‌های ذکر شده محرز شده بود. جهت انجام کار از ذخایر میسلیومی دو ساله همین نمونه‌ها (موجود در آزمایشگاه) در سال ۱۳۹۷ استفاده شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها و محیط کشت: با استفاده از روش نوک هیف از قارچ‌های رشد کرده بر روی محیط PDA (سیب‌زمینی ۳۰۰ گرم + ۲۰ گرم دکستروز + ۱۷ گرم آگار)، برداشته و به محیط جدید منتقل و به مدت سه هفته در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه نگهداری شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها در محیط (PDB ۳۰۰ گرم سیب‌زمینی + ۲۰ گرم دکستروز) کشت و در روی شیکر مغناطیسی بدون گرما، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی و دور ۱۲۰ rpm به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند تا میسلیوم‌ها رشد کنند.

القا محرک بر روی قارچ‌های بازیدیومیست و گل‌سنگ منتخب: از محرک نیترات سدیم (NaNO_3) به‌عنوان منبع نیتروژن در غلظت یک و نیم گرم در لیتر

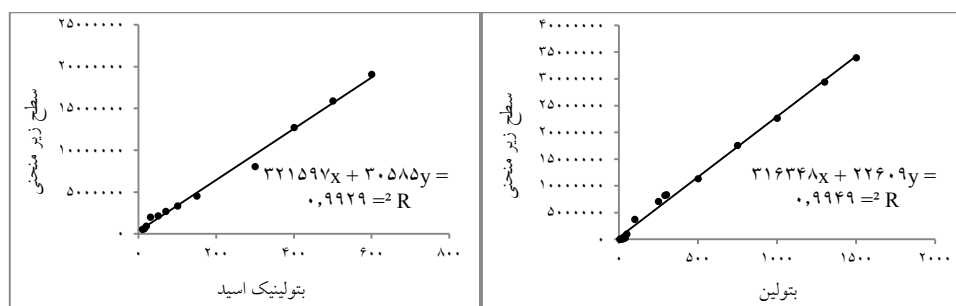
فلاونوئید) و فعالیت آنتی‌اکسیدان قارچ‌های چوب‌زی گیاه دارویی *Betula pendula* (L.) Roth در استان گلستان پرداختند. نتایج منجر به شناسایی دو گونه قارچ ماکروسکوپی (*Stereum hirsutum* و *Hyphodontia paradoxa*) گردید که توانایی جذب بتولین و بتولینیک اسید را از میزبان خود داشتند. میزان فنل کل و تری‌ترپنوئید بتولین و بتولینیک اسید در بافت قارچ *S. hirsutum* نسبت به قارچ دیگر برتری داشت. این محققین در مطالعه دیگری گل‌سنگ (*Ramalina sinensis*) و قارچ همراه آن (*Arthrinium arundinis*) را برای نخستین بار به عنوان منابع جدید حاوی دو ماده مؤثره بتولین و اسید بتولینیک معرفی نمودند (Nazari et al., 2018). تحقیق حاضر به نوعی ادامه آن تحقیق می‌باشد. بتولین و مشتقات آن خاصیت ضد توموری، ضد ویروسی، ضد قارچی و ضد باکتریایی فوق‌العاده‌ای دارند (Hordyjewska et al., 2019). تعداد زیادی مقاله علمی در این خصوص وجود دارد. احتمال تبدیل یا تجزیه شدن بتولین به مشتقات آن شامل اسید بتولینیک، اسید اورسولیک، اسید اولتانولیک، اریتریدیول و دیگر تری‌ترپنوئیدها وجود دارد (Kosyakov et al., 2014; Orsini et al., 2015). از آنجا که بسیاری از مشتقات مصنوعی این ترپن‌ها نتایج امیدوارکننده‌ای را به‌عنوان عوامل شیمی درمانی برای انواع مختلف سرطان نشان داده‌اند، توجه جهانی را به خود جلب کرده‌اند (Sousa et al., 2019)، ضمن اینکه این مشتقات مشکل غیر حلال بودن بتولین و بتولینیک اسید را تا حد یادی حل کرده‌اند (Csuk, 2014). در پژوهش حاضر به تعیین میزان آنتی‌اکسیدان و بررسی اثر القاء الیسیتورها بر میزان متابولیت‌های میسلیوم سه قارچ *S. hirsutum*، *A. arundinis* و *H. paradoxa* پرداخته می‌شود. لازم به ذکر است این تحقیق با فرض اثرگذاری زمان بر تبدیل بتولین و بتولینیک اسید به سایر مشتقات انجام

HPLC و ۹ میلی‌لیتر حلال کلروفوم مخلوط و به وسیله قیف دکانتور فاز آلی جدا گردید. فاز آلی به دست آمده در دمای ۵۱ درجه سانتی‌گراد خشک و در ۱ میلی‌لیتر متانول گرید HPLC حل شد و در تاریکی و دمای ۲۰- درجه در فریزر جهت تزریق به دستگاه HPLC نگهداری گردید (Nasiri-Madiseh, 2010).

سنجش میزان ماده موثره با دستگاه HPLC و LC-MS: دستگاه مورد استفاده هیتاچی آلمان-ژاپن و ستون مورد استفاده، (C18 250 در ۴/۶ میلی‌متر) با میکرومتر منافذ ستون بوده است. طول موج دستگاه روی ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد، سرعت جریان حلال یک میلی‌لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد و از فاز متحرک به صورت مخلوط حلال‌های استونیتریل و آب دیونیزه، به نسبت ۹۱:۹ استفاده شد. استاندارد بتولین و اسید بتولینیک از شرکت سیگما خریداری شد.

و نانوفیبر سلولز ((C5H10O5)n)) به عنوان منبع کربن در غلظت صد میلی‌گرم در لیتر و سولفات منیزیم (MgSO₄) به عنوان منبع مواد آلی در غلظت ۵ میلی‌مول به عنوان الیسیتور استفاده شد محلول مادری در آب تهیه و به منظور استریل اتوکلاو شدند. جهت اعمال تیمارها ابتدا در ظرف ۲۰۰ میلی‌لیتری، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB به همراه غلظت‌های مختلف الیسیتورهای مدنظر تهیه و با استفاده از پیپت پاستور ۴ قطعه از هیف قارچ‌های مورد بررسی جدا و به آن اضافه شد سپس ظروف کشت روی شیکر، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی و دور 120 rpm نگهداری و عصاره‌گیری پس از ۸ روز انجام شد.

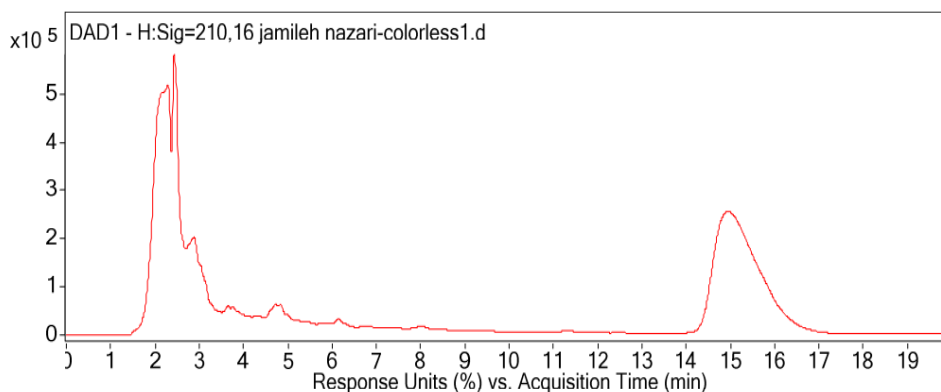
عصاره‌گیری از میسلیموم قارچ‌های بازیدیومیست و قارچ همراه گل‌سنگ: جهت عصاره‌گیری میسلیموم‌ها به وسیله ۳ بار غربال از قسمت مایع جدا شده سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت با ۱ میلی‌لیتر متانول گرید



شکل ۱: منحنی استاندارد بتولین و بتولینیک اسید

حصول اطمینان، نمونه عصاره‌گیری شده تحت شرایط رعایت شده برای دستگاه HPLC جهت تزریق به دستگاه LC-MS به دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی تهران ارسال شد که مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲).

بر طبق نتایج پیک شارپی در محل بعد از پیک‌های بتولین و اسید بتولینیک ایجاد شد که در تحقیقات دیگر محققین (Nazari, 2018; Orsini et al., 2015; Kosyakov et al., 2014) نیز آمده و نشان از تبدیل بتولین به سایر مشتقات مربوطه می‌باشد. جهت



شکل ۲: منحنی کروماتوگرافی عصاره کالوس تزریق شده به دستگاه LC-MS

جدول ۱: جرم مولکولی ترکیبات ثانویه عصاره کالوس تزریق شده به دستگاه LC-MS

جرم مولکولی	زمان (دقیقه)
۸۰۴/۷	۱۵/۲۷۶
۸۰۳/۷	۳۹۰/۸
۸۰۲/۶	۳۹۱/۷
۷۹۷/۷	۴۲۸/۷
۴۳۵/۸	۴۳۵/۸

محلول DPPH بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری نتایج: تجزیه و تحلیل تمامی داده‌های قارچ‌های مورد نظر بر اساس طرح فاکتوریل دو عامله و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون دانکن انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اعمال الیستورها بر مقدار تری ترپنوئید نشان می‌دهد که تیمارها بر میزان تری ترپنوئیدها (مشتقات بتولین) با احتمال ۹۵ درصد اثر معنی‌داری دارند (جدول ۲).

چنانچه در جدول ۱ مشاهده می‌شود جرم مولکولی تقریبی ۴۰۰، ترپنوئید بودن ترکیبات فوق را ثابت میکند. می‌دانیم که بتولین در اثر گذشت زمان به مشتقات آن تبدیل می‌گردد. جرم مولکولی دوبرابر مشاهده شده در جدول ۱ حاصل دایمر شدن برخی ترکیبات است. ضمناً نیاز به یادآوری است کلیه مشتقات بتولین خواص ضد سرطانی بالایی دارند.

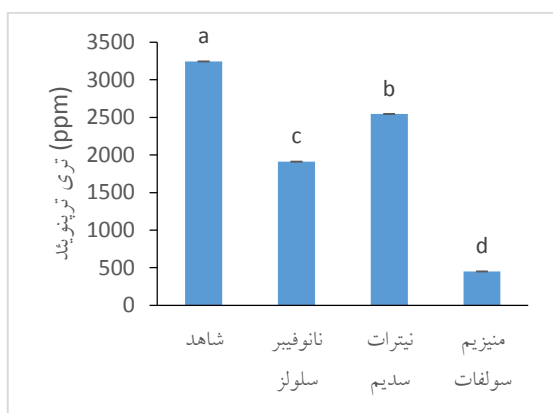
بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی: خواص آنتی‌اکسیدانی میسلیوم قارچ‌های *H. paradoxa* *S. hirsutum* و *A. arundinis* بر اساس روش مشایخی و آتشی (Mashayekhi and Atashi, 2014) و با

جدول ۲: تجزیه واریانس القاء الیستور بر میزان تری ترپنوئیدها (مشتقات بتولین) قارچ‌های *H. paradoxa* *S. hirsutum* و *A. arundinis*

F	میانگین مربعات	درجه آزادی	متغیر
۵/۶۸۳×۱۰ ^{۱۴**}	۶۳۱۴۶۰/۸۰۶	۲	نمونه
۱/۱۴۶×۱۰ ^{۱۵**}	۱/۲۷۴×۱۰ ^۷	۳	تیمار
۲/۵۸۰×۱۰ ^{۱۵**}	۲/۸۶۷×۱۰ ^۷	۶	نمونه×تیمار
	۱/۱۱۱×۱۰ ^۸	۲۴	اشتباه آزمایشی
		۳۵	کل

** معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹ درصد

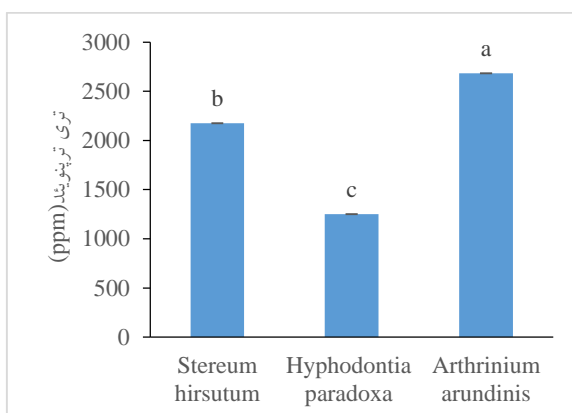
تیمار شاهد قارچ *A. arundinis* با $10^4 \times 1.034/27$ پی‌پی‌ام و کمترین غلظت تری‌ترپنوئید در تیمار نیترات سدیم *H. paradoxa* با $10^4 \times 1.052/52$ پی‌پی‌ام مشاهده شده است. در قارچ *S. hirsutum* غلظت تری‌ترپنوئیدها به ترتیب در تیمارهای نیترات سدیم، نانوفیبرسلولز، شاهد و منیزیم سولفات با مقادیر $10^4 \times 1.065/37$ ، $10^4 \times 1.135/4$ ، $10^4 \times 1.095/38$ و $10^4 \times 1.053/48$ پی‌پی‌ام، در قارچ *H. paradoxa* غلظت تری‌ترپنوئیدها به ترتیب در تیمارهای نانوفیبرسلولز، شاهد، منیزیم سولفات و نیترات سدیم با مقادیر $10^4 \times 1.3879/81$ ، $10^4 \times 1.645/16$ ، $10^4 \times 1.442/51$ و $10^4 \times 1.052/52$ پی‌پی‌ام، در قارچ *A. arundinis* غلظت تری‌ترپنوئیدها به ترتیب در تیمارهای شاهد، نیترات سدیم، نانوفیبرسلولز و منیزیم سولفات با مقادیر $10^4 \times 1.034/27$ ، $10^4 \times 1.0523/23$ ، $10^4 \times 1.0718/85$ و $10^4 \times 1.0355/18$ پی‌پی‌ام مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۴: مقایسه میانگین مقادیر تری‌ترپنوئید (مشتقات بتولین) در تیمارهای شاهد، نانوفیبرسلولز، نیترات سدیم و منیزیم سولفات، در سطح احتمال ۵ درصد

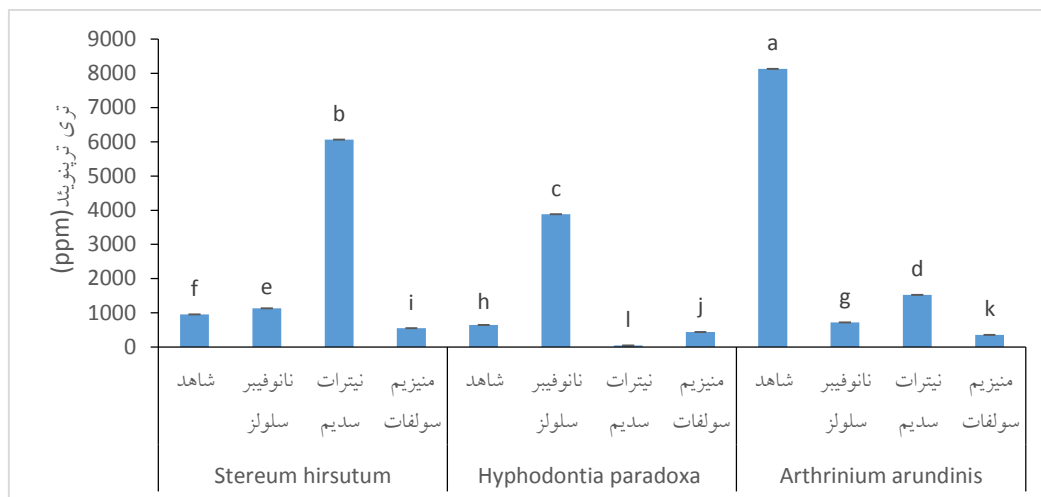
مقدار تری‌ترپنوئید نسبت به شاهد $6/37$ برابر گردد. با این حال مقدار تری‌ترپنوئید موجود در قارچ *A. arundinis* در تیمار شاهد نسبت به همه تیمارها بیشتر بوده است. پیک‌های مربوطه در شکل ۶ نمایش داده شده است.

مقایسه میانگین غلظت تری‌ترپنوئید در بین سه قارچ مورد مطالعه نشان داد که بیشترین غلظت تری‌ترپنوئید را قارچ *A. arundinis* با مقدار سطح زیر پیک $10^4 \times 2682/88$ پی‌پی‌ام داشته است و سپس *S. hirsutum* با مقدار $10^4 \times 2176/41$ پی‌پی‌ام و بعد از آن قارچ *H. paradoxa* با مقدار $10^4 \times 1252/25$ پی‌پی‌ام دارای کمترین غلظت تری‌ترپنوئید بوده است (شکل ۳). بررسی مستقل تیمارهای اعمال شده بر میزان تری‌ترپنوئید نشان می‌دهد که بیشترین غلظت تری‌ترپنوئید به ترتیب در تیمارهای شاهد، نیترات سدیم، نانوفیبرسلولز و منیزیم سولفات با مقادیر $10^4 \times 1911/35$ ، $10^4 \times 2543/37$ ، $10^4 \times 3243/60$ و $10^4 \times 450/39$ پی‌پی‌ام مشاهده شد (شکل ۴). نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل بین الیسیتورها و قارچ‌های مورد بررسی بر میزان تری‌ترپنوئیدها نشان می‌دهد که بیشترین غلظت تری‌ترپنوئید در بین کل تیمارها در

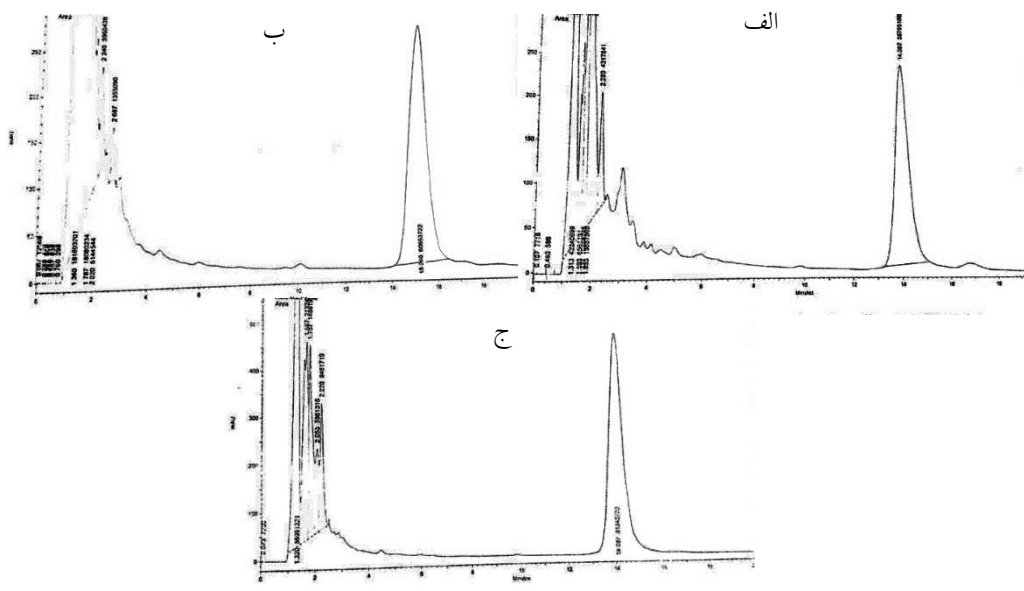


شکل ۳: مقایسه میانگین مقادیر تری‌ترپنوئید (مشتقات بتولین) در قارچ‌های *A. arundinis*، *H. paradoxa* و *S. hirsutum* در سطح احتمال ۵ درصد.

نتایج نشان می‌دهد در قارچ *A. arundinis* تزریق الیسیتورها نه تنها تاثیری بر میزان تری‌ترپنوئید نداشتند بلکه به طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش شدند. در قارچ *H. paradoxa* تیمار نانو فیبرسلولز باعث افزایش $6/01$ برابری نسبت به شاهد شد. در قارچ *S. hirsutum* الیسیتور نیترات سدیم باعث شد



شکل ۵: تصاویر (مشتقات بتولین) در تیمارهای مختلف قارچ‌های *S. hirsutum*، *H. paradoxa* و *A. arundinis* در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۶: پیک حاصل از تزریق به دستگاه HPLC، (الف) تیمار نانوفیبر سلولز در قارچ *H. paradoxa*، (ب) تیمار نیترات سدیم در قارچ *S. hirsutum* (ج) تیمار شاهد در قارچ *A. arundinis*

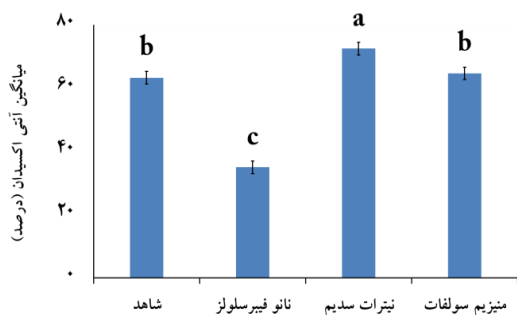
جدول ۳: نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار بر مقدار آنتی‌اکسیدان قارچ‌های *S. hirsutum*، *H. paradoxa* و *A. arundinis*

متغیر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
نمونه	۲	۲۱۱۹/۰۸۹	۴۹۱/۰۵۷**
تیمار	۳	۲۴۳۰/۲۲۹	۵۶۳/۱۵۷**
نمونه × تیمار	۶	۱۸۰۰/۹۰۹	۴۱۷/۳۲۵**
اشتباه آزمایشی	۲۴	۴/۳۱۵	
کل	۳۵		

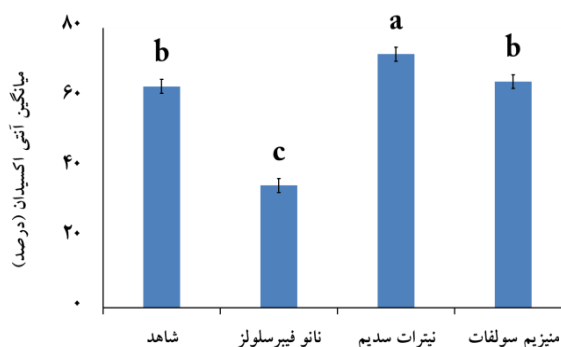
** معنی‌دار با اطمینان ۹۹ درصد

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمار بر مقدار آنتی‌اکسیدان قارچ‌ها با احتمال ۹۵ درصد دارای اثر معنی‌داری بوده است (جدول ۳). نتایج حاصل از بررسی میزان آنتی‌اکسیدان در قارچ‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد که بیشترین مقدار آنتی‌اکسیدان در قارچ

H. paradoxa با ۷۱/۱۱ درصد و سپس در قارچ *A. arundinis* با ۶۰/۶۱ درصد و کمترین مقدار در قارچ *S. hirsutum* با ۴۴/۷۲ درصد مشاهده شده است (شکل ۷).



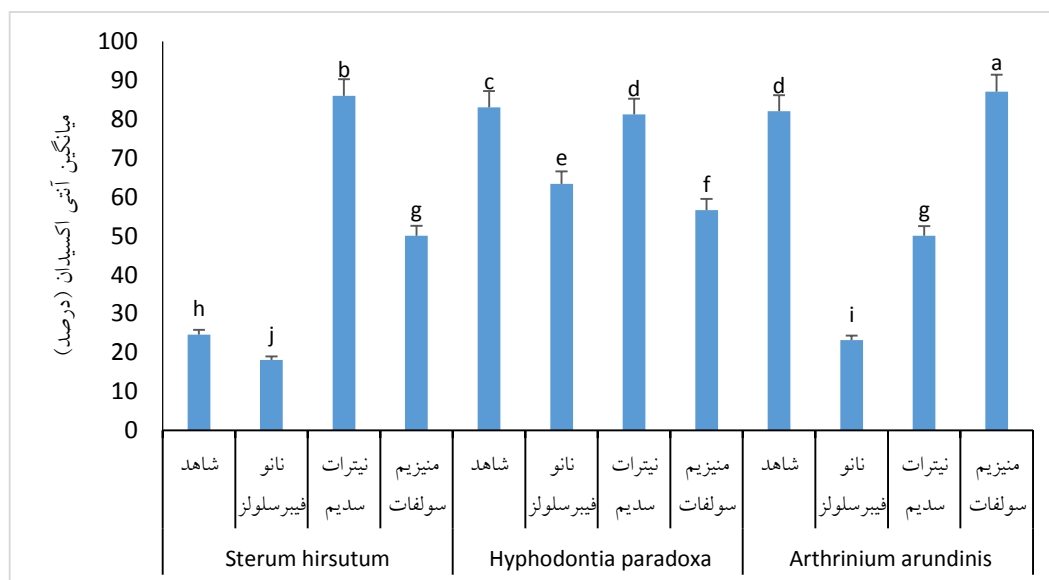
شکل ۸: مقایسه میانگین مقادیر آنتی‌اکسیدان در تیمارهای شاهد، نانوفیبر سلولز، نیترات سدیم و منیزیم سولفات، در سطح احتمال ۵ درصد.



شکل ۷: مقایسه میانگین درصد آنتی‌اکسیدان در قارچ‌های *A. arundinis*، *H. paradoxa*، *S. hirsutum* در سطح احتمال ۵ درصد.

بررسی اثر مستقل تیمارهای شاهد، نانوفیبر سلولز، نیترات سدیم و منیزیم سولفات نشان می‌دهد که بیشترین مقدار آنتی‌اکسیدان در تیمار نیترات سدیم با ۷۲/۴۵ درصد مشاهده شده است. در بین تیمارهای شاهد و منیزیم سولفات به ترتیب با مقادیر آنتی‌اکسیدان ۶۳/۲۶ و ۶۴/۶۲ درصد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و کمترین مقدار آنتی‌اکسیدان در تیمار نانوفیبر سلولز با ۳۴/۹۲ درصد مشاهده شده است (شکل ۸). نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل قارچ‌ها و الیسیتورهای اعمال شده نشان می‌دهد تیمار شاهد قارچ‌های *H. paradoxa* و *A. arundinis* به ترتیب با ۸۳/۱ و ۸۲/۰۵ درصد دارای بیشترین مقدار آنتی‌اکسیدان بوده و بر اثر اعمال الیسیتورها شاهد کاهش خواص آنتی‌اکسیدانی بودیم. در قارچ *S. hirsutum* با ۲۴/۶۲ درصد کمترین مقدار آنتی‌اکسیدان مشاهده شد. القاء الیسیتور نانو

فیبر سلولز باعث کاهش مجدد آن شد ولی دو الیسیتور نیترات سدیم و منیزیم سولفات به ترتیب باعث افزایش ۳/۵ و ۲ برابری آنتی‌اکسیدان شدند. مقدار آنتی‌اکسیدان تحت تاثیر نانوفیبر سلولز در قارچ *H. paradoxa* ۶۳/۴۲ درصد و سپس در قارچ‌های *A. arundinis* و *S. hirsutum* به ترتیب ۲۳/۲۳ و ۱۸/۱۳ درصد مشاهده شد (شکل ۹). میزان آنتی‌اکسیدان در قارچ‌های *H. paradoxa*، *S. hirsutum* و *A. arundinis* تحت تاثیر تیمار نیترات سدیم به ترتیب ۸۶/۰۴، ۸۱/۲۵ و ۵۰/۰۵ درصد می‌باشد. در تیمار منیزیم سولفات بیشترین میزان آنتی‌اکسیدان در قارچ *A. arundinis* با ۸۷/۱۲ درصد و کمترین مقادیر به ترتیب در قارچ‌های *H. paradoxa* و *S. hirsutum* با ۵۶/۶۸ و ۵۰/۰۸ درصد مشاهده شده است (شکل ۹).



شکل ۹: مقایسه میانگین مقادیر آنتی اکسیدان در تیمارهای مختلف قارچ‌های *H. paradoxa*، *S. hirsutum* و *A. arundinis* در سطح احتمال ۵ درصد.

اریتریدیول و دیگر تری‌پنویئیدها (Sousa et al., 2019) حاصل شده است. تبدیل بتولین به مشتقات مربوطه هزینه بر و به نسبت سخت می‌باشد؛ در این تحقیق تبدیلات فوق فقط بر اثر گذشت زمان اتفاق افتاده و منبع خوبی از تولید این مواد موثره مفید با هزینه تولید ارزان ارائه گردیده است. نتایج نشان داد میزان این ترکیبات در قارچ *S. hirsutum* < *A. arundinis* می‌باشد. در این مطالعه از الیستورهای نیترات سدیم و سولفات منیزیم و همچنین از نانوفیبر سلولز با هدف افزایش مقدار ترکیبات ثانویه استفاده گردید. مشخص شد القاء الیستورها می‌تواند بر میزان ماده موثره میسلیم قارچ‌های مورد مطالعه تاثیرگذار باشد. در قارچ *H. paradoxa* نانوفیبر سلولز باعث افزایش ۶/۵ برابری ترکیبات ثانویه و در قارچ *S. hirsutum* الیستور نیترات سدیم باعث ۶/۳۷ برابری این ترکیبات نسبت به شاهد گردید. در قارچ *A. arundinis* تزریق الیستورها تاثیری بر میزان تری‌پنویئیدها که مشتقات بتولین هستند نداشت و به‌طور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش آن شد (شکل ۵). اثر القاء الیستورها به‌طور مختلف بر میزان ماده موثره قارچ‌ها توسط محققین مختلفی چون جاسیکامیسیاک و

بحث

مطالعه حاضر اولین گزارش از بررسی اثر گذاری القاء الیستور بر روی قارچ همزیست گل‌سنگ (*Arthrinium arundinis*) و میسلیم‌های قارچ‌های بازیدیومیست *Hyphodontia paradoxa* و *Stereum hirsutum* می‌باشد. پژوهش حاضر به نوعی ادامه تحقیق نظری و همکاران (Nazari et al., 2017؛ Nazari et al., 2018) می‌باشد. در دو تحقیق قبلی وجود ترکیبات ثانویه بتولین و بتولینیک اسید در میسلیم قارچ‌های مورد مطالعه به اثبات رسیده بود. با توجه به اینکه امکان تبدیل این دو ترکیب ثانویه به مشتقات آن در اثر گذشت زمان قبلا در کشت‌های سلولی گزارش شده بود (Nazari, 2018) در تحقیق حاضر از ذخایر دو ساله میسلیم قارچ‌ها استفاده گردید تا این موضوع در کشت‌های قارچی نیز کنترل شود. نتایج قابل توجه بود چرا که این تبدیلات اتفاق افتاده و پیک شاری پس از زمان بازداری مربوط به بتولین و بتولینیک اسید مشاهده گردید که تری‌پنویئید بودن آن با استفاده از جرم مولکولی (LC-MS) اثبات شد. در سالهای اخیر نتایج امیدوار کننده در کنترل انواع مختلف سرطان با استفاده از بتولین و مشتقات آن شامل اسید بتولینیک، اسید اورسولیک، اسید اولئانولیک،

کوچک‌سازی ابعاد فیبرهای میکرومتری سلولز با نیروهای مکانیکی به دست می‌آید (Yousefi et al., 2011). نانو مواد از لحاظ ساختاری طول به قطر بالایی دارند که هر چه این نسبت بالاتر، در هم پیچیدگی این شبکه بیشتر شده، نقاط اتصال زنجیره‌ها به هم زیادتر و شبکه تشکیل شده محکم‌تر می‌شود (Spagnol et al., 2012). این ایستتور در *A. arundinis* باعث کاهش شدید ترپنوئیدها نسبت به شاهد گردید ولی افزایش مقادیر را در دو گونه *S. hirsutum* و *H. paradoxa* موجب گردید. خواص آنتی‌اکسیدانی در هر سه گونه قارچ مورد مطالعه در این تیمار کاهش یافت. نانوفیبر سلولز در دو قارچ *P. citrinum* و *F. cicatricum* نیز سبب حداکثر میزان سنتز تری‌ترپنوئیدها در مطالعه نظری گردید (Nazari, 2018) که همراستا با نتایج مطالعه حاضر برای دو گونه *S. hirsutum* و *H. paradoxa* بوده و با نتایج مربوط به قارچ *A. arundinis* در یک راستا نمی‌باشد.

الیستور منیزیم سولفات مقدار ترکیبات ترپنوئیدی را در هر سه گونه قارچی کاهش داد ولی خواص آنتی‌اکسیدانی در این تیمار فقط در قارچ *H. paradoxa* کاهش و در دو گونه دیگر باعث افزایش شد. این محرک در مطالعه بای و همکاران در قارچ *I. obliquus* باعث افزایش مقدار بتولین نسبت به شاهد گردید که با نتایج تحقیق حاضر همراستا نمی‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که قارچ‌های *S. hirsutum*, *H. paradoxa*, *A. arundinis* دارای خواص آنتی‌اکسیدانی به ترتیب در حد ۸۲/۰۵، ۸۳/۱ و ۲۴/۶۲ درصد می‌باشند که برای دو گونه اول مقادیر قابل‌تاملی است. خواص آنتی‌اکسیدانی در بسیاری از قارچ‌ها از جمله *Mucor circinelloides* (Hameed et al., 2017)، *Phellinus torulosus* (Hokmollahi et al., 2011)، *Trametes gibbosa* (Tabari et al., 2013)، *Ganoderma lucidum* (Wong et al., 2004) نیز گزارش شده است. تاکنون آنتی‌اکسیدان‌های سنتز شده بسیاری شناسایی شده‌اند که در غذاها، به‌عنوان

همکاران (Jasicka-Misiak et al., 2010) بر روی قارچ‌های *Piptoporus betulinus J. obliquus* و *Daedalea confragosa*، مورد بررسی قرار گرفته است، نتایج بررسی‌های این محققین تاثیر گذاری القاء ایستتور را نشان داد. اگر چه بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در شرایط درون شیشه‌ای^۱ به‌طور ژنتیکی کنترل می‌شود، اما به شدت تحت تاثیر عوامل محیطی و به‌ویژه ترکیبات محیط کشت قرار می‌گیرد. از بین کلیه عوامل محیطی، کیفیت و کمیت منبع نیتروژن مورد استفاده در محیط رشد، تأثیر ویژه‌ای نه تنها در رشد و تمایز، بلکه در بیوسنتز بسیاری از متابولیت‌های ثانویه شناخته شده قارچی دارد (Raei Tudzynski, 2014, et al., 2017). در تحقیق حاضر از سدیم نیترات به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده شد. این ایستتور فقط در قارچ *S. hirsutum* باعث افزایش ترپنوئیدها (مشتقات بتولین) نسبت به شاهد شد. ایستتور نیترات سدیم در تحقیق بای و همکاران باعث افزایش تولید بتولین در محیط کشت میسلیموم قارچ *I. obliquus* شد که همراستا با نتایج مطالعه حاضر *S. hirsutum* می‌باشد (Bai et al., 2012). در دو قارچ دیگر این ایستتور کاهش مقادیر را باعث شد. این نتایج در مورد خواص آنتی‌اکسیدان نیز تکرار گردید. قارچ‌ها به تغییرات در دسترس بودن ازت با تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و فعال سازی فرایندهای تمایز پاسخ می‌دهند (Tudzynski, 2014). آزمایشات ژنومی *Fusarium fujikuroi* نشان داد کمیت و کیفیت منبع نیتروژن روی ۳۰ ژن از ۴۵ ژن بیان‌کننده متابولیت‌های ثانویه تاثیرگذار است (Wiemann et al., 2013).

نانوفیبر سلولز با فرمول $(C_5H_{10}O_5)_n$ با پلی‌مرهای گلوکزی به ضخامت معمول ۲۰ – ۴۰ نانومتر و طول بلندتر از ۵ میکرومتر شامل هر دو مناطق کریستالی و آمورف می‌شود که به‌طور عمده از طریق

A. arundinis میسلیوم دو ساله قارچ‌های *A. arundinis* و *H. paradoxa* به مشتقات آن تبدیل می‌شود. بالاترین مقدار تری ترپنوئید (مشتقات بتولین) در قارچ *A. arundinis* در تیمار شاهد مشاهده گردید. الیستورهای نانو فیبر سلولز در *H. paradoxa* و نیترات سدیم در *S. hirsutum* باعث افزایش قابل ملاحظه این ترکیبات نسبت به شاهد شدند با هدف افزایش خواص آنتی اکسیدانی در قارچ *S. hirsutum* الیستور نیترات سدیم و در قارچ *A. arundinis* سولفات منیزیم پیشنهاد می‌گردد. با توجه به اینکه منبع تولید بتولین و مشتقات آن یعنی درختان توس در ایران رو به انقراض است به نظر می‌رسد این قارچ‌ها گزینه بسیار مناسب، سهل الوصول و ارزان برای تحقیقات بعدی با هدف بهره‌گیری از خواص مربوطه باشند.

نگهدارنده به کار می‌روند (Lourenco et al., 2019) اما از آنجایی که این مواد غیرطبیعی بوده و ممکن است عوارض سمی و جانبی دیگری داشته باشد، لذا بهتر است که منابع طبیعی حاوی آنتی اکسیدان شناسایی شده و جهت مصرف معرفی گردد. ممکن است بتوان به میسلیوم دو قارچ *A. arundinis* و *H. paradoxa* در این خصوص بیشتر توجه کرد. مقدار آنتی اکسیدان گونه *S. hirsutum* بدون اعمال الیستور در حد ۲۴/۶۲ درصد بود که با افزودن نیترات سدیم به محیط کشت به ۸۶/۰۴ درصد رسید که که مقدار بالایی بوده و بسیار امیدوار کننده است.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این مطالعه نشان داد بتولین موجود در

References

1. Abdul Malik, N.A., Kumar, I.S. and Nadarajah, K. 2020. Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of Plant Defense and Immunity. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 963.
2. Bai, Y-H., Feng, Y-Q., F., Mao, D-B. and Xu, Ch-P. 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.
3. Halder, M., Sarkar, S. and Jha, S. 2019. Elicitation: A biotechnological tool for enhanced roduction of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci.*, 19: 880-895.
4. Hameed, A., Hussain, S.A., Yang, J., Ijaz, M.U., Liu, Q., Suleria, H.A.R. and Song, Y. 2017. Antioxidants potential of the filamentous fungi (*Mucor circinelloides*). *Nutrients*, 9(10): 1101.
5. Hokmollahi, F., Rafati, H., Riahi, H., Hakimi, M., Aliahmadi, A. and Heydari, H. 2011. Collection and identification of a medicinal mushroom, *phellinus conchatus* in iran and investigation of the antibacterial activity of total methanol extract and fractional extracts. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 18 (6):521-530.
6. Holková, I., Bezáková, L., Sek Bilka, F., Bala_zová, A. and Blanáriková, V. 2010. Involvement of lipoxygenase in elicitor-stimulated sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48: 887-892.
7. Hordyjewska, A., Ostapiuk, A., Horecka, A. and Kurzepa, J. 2019. Betulin and betulinic acid: triterpenoids derivatives with a powerful biological potential. *Phytochem Rev*, 18:929-951.
8. Jasicka-Misiak, I., Lipok, J., Swider, I. and Kafarski, P. 2010. possible fungistatic implications of betulin presence in *betulaceae* plants and their *Hymenochaetaceae* Parasitic Fungi. *Z. Naturforsch*, 65 c: 201-206.
9. Kosyakov, D.S., Ul'yanovskii, N.V. and Falev, D.I. 2014. Determination of Triterpenoids from birch bark by liquid chromatography—tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 69 (13): 1264-1269.
10. Lourenço, S., Moldão-Martins, M. and Alves, V. 2019. Antioxidants of natural plant origins: from sources to food industry applications. *Molecules*,

- 24(22): 4132.
11. Macheleidt, J., Mattern, DJ., Fischer, J., Netzker, T., Weber, J., Schroeckh V., et al. 2016. Regulation and role of fungal secondary metabolites. Annual review of genetics, 50: 371-392.
 12. Mashayekhi, K. and Atashi, S. 2014. The analyzing methods in plant physiology. Sirang press. Gorgan. 310 p. (In Persian).
 13. Naik, PM. and Al-Khayri, JM. 2016. Impact of abiotic elicitors on in vitro production of plant secondary metabolites: A Review. J. Adv. Res. Biotech 1(2): 7. DOI: 10.15226/2475-4714/1/2/00102.
 14. Najafi, S., Heidari, R. and Jamei, R. 2013. Influence of silver nanoparticles and magnetic field on phytochemical, antioxidant activity compounds and physiological factors of *Phaseolus vulgaris*. Technical Journal of Engineering and Applied Sciences, 3(21): 2812-2816.
 15. Nasiri-Madiseh, Z., Mofid, M.R., Ebrahimi, M., Khayyam-Nekoei, S.M. and Khosro-Shahli, M., 2010. Isolation of taxol-producing endophytes fungi from Iranian yew (*Taxus baccata* L.). Journal of Shahrekord University Medicinal Science, 11(4): 101-107.
 16. Nazari, J. 2018. Identification and effect of basidiomycete and endophytic fungus of *Betula pendula* to triterpenoids amount in cell suspension culture and effect of stem cells extract on apoptosis in esophageal cancer cells. Ph.D thesis in Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
 17. Nazari, J., Payamnoor, V. and Kavosi, M.R. and Asadi J. 2018. Extraction of anti-cancer triterpenoids (betulinic acid and betulin) from the birch bark-inhabiting lichen (*Ramalina sinensis*). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 34 (4): 64-616.
 18. Nazari, J., Payamnoor, V. and Kavosi, M.R., 2017. The evaluation absorption of some secondary metabolites (betulin, betulinic acid, phenol, flavonoids) and antioxidant activity of woodinhabiting agaric fungi on medicinal birch tree (*Betula pendula* Roth.) in Golestan province. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plant, 14(2): 44-55.
 19. Orsini, S., Ribechini, E., Modugno, F., Klügl, J., Di Pietro, J. and Colombini, M.P. 2015. Micromorphological and chemical elucidation of the degradation mechanisms of birch bark archaeological artefacts. Heritage Science, 3: 2-11.
 20. Raei, M., Angaji, SAH, Omid, M. and Khodayari, M. 2014. Effect of abiotic elicitors on tissue culture of Aloe vera. Int J Biosci, 5(1): 74-81.
 21. Raei, M., Esna-Ashari, M. and Khodayari, M. 2017. Abiotic elicitors and medicinal plants biotechnology. Journal of Cell & Tissue, 7(4):1-11.
 22. Roberts, S.C. and Shuler, M.L. 1997. Large-scale plant cell culture. Current Opinion in Biotech, (8): 154-159.
 23. Sousa, J., Freire, C., Silvestre, A. and Silva, A. 2019. Recent developments in the functionalization of betulinic acid and its natural analogues: A Route to New Bioactive Compounds. Molecules, 24: 355: 1-33.
 24. Spagnol, C., Rodrigues, F.H.A., Pereira, A.G.B., Fajardo, A.R., Rubira, A.F. and Muniz, EC. 2012. Superabsorbent hydrogel composite made of cellulose nanofibrils and chitosan-graft-poly (acrylic acid). Carbohydrate Polymers, 87:2038-2045.
 25. Tabari, SH, Ghorbanli, M., Safaian, Sh. and Moosazade, S. 2013. Comparison of antioxidant and phytochemical properties of *Trametes gibbosa*. J. Cell Mol. Biotech, 10(3):73-78
 26. Tudzynski, B. 2014. Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. Front Microbiol, 5: 656.
 27. Wiemann, P., Sieber, C.M.K., von Bargen, K.W., Studt, L., Niehaus, E.M., Huß, K. 2013. Deciphering the cryptic genome: genome-wide analyses of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites. PLoS Pathog. 9:e1003475 10.1371/ journal.ppat.1003475.
 28. Wink, M. 2018. Plant secondary metabolites modulate insect behavior-steps toward addiction? Front. Physiol. 9:364. DOI: 10.3389/fphys.2018.00364

29. Wong, K.L., Chao, H.H., Chan, P., Chang, L.P. and Liu, C.F. 2004. Antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* in acute ethanol-induced heart toxicity. *Phytother Res*, 18(12):1024-6.
30. Yang, L., Wen, K., Ruan, X., Zhao, Y., Wei, F. and Wang, Q. 2018. Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*. 23(4): 762. DOI: 10.3390/molecules 23040762.
31. Yousefi, H., Nishino, T., Faezipour, M., Ebrahimi, G.H. and Shakeri, A. 2011. Direct fabrication of all-cellulose squeezing flow viscometry. *Journal of Procedia Food Science*, 1: 1997-2002.
32. Zhai, Q., Fan, G. and Zhan, Y. 2011. Accumulation of triterpenoids in *Betula platyphylla* suspension culture induced by a fungal elicitor. *Scientia Silvae Sinicae*, 47(6):42-47.

Evaluation the effect of elicitors on antioxidant properties and mycelial secondary metabolites of *Stereum hirsutum*, *Hyphodontia paradoxa* and *Arthrinium arundinis* from Golestan province

Payamnoor, V.^{1*}, Lazemi, G.², Nazari, J.³, Alishah, O.⁴

¹Associate Professor, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

²M.Sc. Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

³Ph.D. Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

⁴Associate Professor, Education and Extension Organization (AREEO), Cotton Research Institute of Iran, Gorgan, Iran

Received: 27-11-2019; Accepted: 15-8-2020

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of elicitors on antioxidant properties and mycelial secondary metabolites of *Arthrinium arundinis*, Lichen symbiont, and *Hyphodontia paradoxa* and *Stereum hirsutum* hosted by *Betula pendula*. In the summer of 2016 preliminary sampling was performed from tree barks of Siah-Marzkouh, Golestan province, from an altitude of 2400 m above sea level. Then, fungal purification was achieved. In 2018, biennial mycelial reserves were used to investigate changes in secondary compounds. The following treatments were applied as elicitor: sodium nitrate, nanofibers cellulose and magnesium sulphate. Initial evaluation of triterpenoids was performed by HPLC using standard betulin and betulinic acid, and LC-MS was used to confirm the corresponding peak as triterpenoid. Antioxidant properties in mycelia of these fungi were studied by DPPH method. Based on the results, the highest peak of triterpenoids which are derivatives of betulin was in *H. paradoxa* treated by nanofibers cellulose, while in *S. hirsutum* it was by sodium nitrate (6.5 and 6.37 times in comparison to control, respectively). In *A. arundinis*, elicitors had no effect on triterpenoids amount and significantly reduced it. The antioxidant activity of *H. paradoxa* in the control treatment was 83.1% and the induction of elicitors had the opposite effect on this activity. The antioxidant activity of *A. arundinis* decreased from 82.05 to 87.12% with magnesium sulfate elicitor, meanwhile by adding sodium nitrate to the medium it increased from 24.62 to 86.04%.

Keywords: Antioxidant, Birch, Elicitor, Triterpenoids, Mycelium, Secondary metabolites

*Corresponding author; mnoori56@gmail.com