

A Study of Antioxidant Activity and Phytochemical Analysis of Endophytic Fungi Extracts from Hazel (*Corylus Avellana* L.) Plant

Arezoo Kashanian

Departement of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Zabol University, Iran, arezoo.kashanian66@gmail.com

Naser Panjehkeh

Departement of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Zabol University, Iran, naserpanjehkeh@gmail.com

Fakhtak Taliei*

Departement of Plant Production, Faculty of Agriculture and Natural resources, Gonbad Kavous University, Iran, taliei.fa@gmail.com

Abstract

Introduction: Diverse endophytic fungi exist within plant tissues that are valuable resources for plant growth promotion. These endophytes constitute a rich bio-resource to discover new natural products. Also, endophytic fungi have been recognized as useful sources of bioactive secondary metabolites including antibiotics, antioxidants, and anti-cancers. The aim of the present study was to investigate the antioxidant activity and the phytochemical properties of ethyl acetate extract of endophytic fungi from *Corylus avellana* L. plant.

Materials and methods: First, endophytic fungi were isolated from *C. avellana* plant using standard surface sterilization techniques. Ethyl acetate extracts of fungi were screened for the presence of characteristics of qualitative phytochemicals compounds and antioxidant activity. For this purpose, DPPH free radical scavenging was used to evaluate the antioxidant activity.

Results: Totally, 791 isolates belonging to 24 species were isolated from the stem, leaf, and root tissues. The identification of endophytic fungi was performed using both morphological characteristics and ITS sequence analysis. All sequences were deposited in NCBI's GenBank Database. The qualitative analysis of phytochemical compounds showed positive effects of flavonoids, alkaloids, tannin, phenols, steroids, terpenoids, diterpenes, flavanones, quinones, and coumarins in most of the fungus. Species *Paraphaeosphaeria sporulosa*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternate*, *Nothophoma quercina*, *Fusarium equiseti*, *Pleosporales* sp., *Neocucurbitaria unguis*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium* sp., *Fusarium fujikuroi*, *Epicoccum nigrum*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Bjerkandera adusta*, *Angustimassarina* sp., *Exophiala* sp., *Talaromyces amestolkiae* showed the highest antioxidant activity ranging from 50% to 97%.

Discussion and conclusion: DPPH free radical scavenging was considered an appropriate in-vitro model widely used to assess antioxidant activity in a short time. The results of this study indicated that metabolites produced by endophytic fungi isolated from *C. avellana* plant may serve as a potential source of natural antioxidants.

Key words: Antioxidant, Endophytic Fungi, DPPH, Phytochemicals

* Corresponding author

Received: July 29, 2020 / **Accepted:** December 15, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال دهم، شماره ۳۸، تابستان ۱۴۰۰، صفحه ۴۱ - ۵۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۲۵

Doi: [10.22108/BJM.2020.124212.1315](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.124212.1315)

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی عصاره قارچ‌های اندوفیت گیاه فندق (*Corylus avellana* L.)

آرزو کاشانیان: دانشجوی دکتری گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه زابل، ایران، arezoo.kashanian66@gmail.com
ناصر پنجه‌که: دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه زابل، ایران، naserpanjehkeh@gmail.com
فاختک طبعی*: استادیار گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، ایران، taliey.fa@gmail.com

چکیده

مقدمه: قارچ‌های مختلف اندوفیت در بافت‌های گیاهی وجود دارند که منابع ارزشمندی برای رشد گیاهان هستند. این اندوفیت‌ها یک منبع بیولوژیکی غنی را برای کشف محصولات طبیعی جدید تشکیل می‌دهند. همچنین، قارچ‌های اندوفیت به عنوان منابع مفید متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات ضدسرطان شناخته شده‌اند. این مطالعه به منظور ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خواص فیتوشیمیایی عصاره اتیل استات قارچ‌های اندوفیت از گیاه فندق انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا قارچ‌های اندوفیت با استفاده از تکنیک‌های استاندارد استریلیزاسیون سطحی از گیاه فندق جداسازی شدند. عصاره اتیل استات قارچ‌ها برای حضور ترکیبات فیتوشیمیایی کیفی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی غربال شدند. برای این منظور، از مهار رادیکال آزاد DPPH برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد.

نتایج: در مجموع، ۷۹۱ ایزوله متعلق به ۲۴ گونه از بافت ساقه، برگ و ریشه جدا شد. شناسایی قارچ‌های اندوفیت با استفاده از هر دو ویژگی مورفولوژیکی و تجزیه و تحلیل توالی ITS انجام شد. همه توالی‌ها در بانک داده‌های ژنی NCBI ثبت شدند. تجزیه و تحلیل کیفی ترکیبات فیتوشیمیایی، نتایج مثبت برای فلاونوئید، آلکالوئید، تانن، فنول، استروئید، ترپنوئید، دی‌ترپن، فلاونن، کوئینون و کومارین در بیشتر قارچ‌ها نشان دادند. گونه‌های *Nothophoma*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium herbarum*, *Paraphaeosphaeria sporulosa*, *Penicillium*, *Neocucurbitaria unguis*, *Pleosporales sp.*, *Fusarium equiseti*, *quercina*, *Gnomoniopsis idaeicola*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium sp. citrinum* و *Exophiala sp.*, *Angustimassarina sp.*, *Bjerkandera adusta*, *Cladosporium sphaerospermum* و *Talaromyces amestolkiae* بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی از ۵۰ تا ۹۷ درصد نشان دادند.

بحث و نتیجه‌گیری: روش مهار رادیکال آزاد DPPH یک مدل آزمایشگاهی مناسب است که به‌طور گسترده برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مدت زمان کوتاه استفاده می‌شود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهند متابولیت‌های تولیدشده توسط قارچ‌های اندوفیت جداشده از گیاه فندق را می‌توان به عنوان منبع بالقوه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به کار برد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، قارچ‌های اندوفیت، DPPH، فیتوشیمیایی

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

رادیکال‌های آزاد، گونه‌های اکسیژن و نیتروژن واکنش‌پذیرند که با فرایندهای مختلف فیزیولوژیکی در بدن ایجاد می‌شوند. تولید کنترل‌نشده رادیکال‌های آزاد منجر به حمله به لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و DNA، استرس اکسیداتیو و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۱). این گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS)^۱، مسئول بسیاری از بیماری‌های تخریب‌کننده انسانی مانند دیابت، سرطان، اختلالات عصبی، بیماری‌های آلزایمر، پارکینسون، التهابی و پیری است (۲). در بدن انسان سیستم‌های مختلف آنزیمی برای اصلاح رادیکال آزاد وجود دارند؛ اما ریزمغذی‌ها مانند ویتامین E، بتاکاروتن و ویتامین C آنتی‌اکسیدان‌های اصلی‌اند. این مواد باید در رژیم غذایی تأمین شوند؛ زیرا بدن این مواد مغذی را نمی‌تواند تولید کند (۳).

آنتی‌اکسیدان یک مولکول پایدار است که یک الکترون را به یک رادیکال آزاد در حال اکسایش اهدا می‌کند و واکنش زنجیره‌ای را قبل از آسیب‌دیدن مولکول‌های حیاتی خاتمه می‌دهد. خاصیت مهار رادیکال آزاد آنتی‌اکسیدان‌ها باعث تأخیر یا مهار آسیب‌های سلولی می‌شود (۴). مواد مشتق‌شده از گیاهان به‌تازگی به‌دلیل کاربردهای چندمنظوره بسیار مورد توجه قرار گرفته است. انواع زیادی از گیاهان برای منبع جدید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مطالعه شده‌اند؛ به‌ویژه ترکیبات فنولی و فلاونوئید به‌دست آمده از گیاهان که به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی و محافظ رادیکال آزاد شناخته شده‌اند (۵).

فندق^۲ متعلق به خانوادهٔ بتولاسه^۳ و جنس کوریلوس^۴ است. این گیاه یکی از محصولات مهم آجیل جهان به‌شمار می‌رود و بومی مناطق اروپایی و غربی قارهٔ آسیا و

شامل ۲۵ گونه است (۶). فندق در گذشته برای جنبه‌های تغذیه‌ای کشت می‌شد؛ اما اکنون به‌دلیل محتوای فیتوشیمیایی خود، شایان توجه قرار گرفته است (۷). ثابت شده است فندق منبع غنی بسیاری از ترکیبات آلی به‌ویژه ترکیبات فنولی است (۸). همچنین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ترکیبات فنولی هستهٔ مغز فندق و برخی از فرآورده‌های جانبی آن نیز بررسی شده‌اند (۹).

طبق تحقیقات انجام‌شده، علاوه بر گیاهان، برخی از میکروارگانیسم‌ها نظیر قارچ‌ها و باکتری‌های اندوفیت نیز تولیدکنندهٔ متابولیت‌های ثانویه‌اند؛ ازجمله آنتی‌اکسیدان‌ها و ترکیبات فیتوشیمیایی نظیر آلکالوئیدها، بنزوپرانون‌ها، بنزوکینون‌ها، فلاونوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها و ترپنوئیدها، فنول، ترکیبات فنولی، فیل پروپانوئیدها، ترالون‌ها، زانتان‌ها و سایر ترکیبات (۱۰). قارچ‌های اندوفیت میکروبهایی‌اند که در بافت‌های زندهٔ گیاهی زندگی می‌کنند؛ بدون اینکه صدمه‌ای جدی به میزبان خود وارد کنند (۱۱). اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌های بسیار متنوعی‌اند و قادرند ترکیبات شیمیایی تولیدشده توسط گیاه میزبان را سنتز کنند. اندوفیت‌ها طیف وسیعی از مکانیسم‌ها را برای تسهیل رشد گیاهان به کار می‌برند؛ برای مثال، برخی از اندوفیت‌ها هورمون‌های گیاهی تولید می‌کنند، بنابراین بر رشد گیاه و تحمل آن در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی تأثیر می‌گذارند (۱۲). همچنین، میکروارگانیسم‌های اندوفیت، آنتی‌اکسیدان‌های گیاهان میزبان را به‌ویژه در شرایط تنش‌های غیرزیستی افزایش می‌دهند (۱۳).

مطالعات متعددی روی پتانسیل‌های زیست‌محیطی و فعالیت‌های بیولوژیکی اندوفیت‌ها مانند اثرات ضدویروسی، ضدسرطان، ضددیابتی و ضد میکروبی

جدید منتقل شدند و خالص سازی جدایه‌ها به روش نوک هیف انجام شد (۱۶).

بررسی مولکولی جدایه‌ها: جدایه‌های قارچی در محیط کشت سیب زمینی دکستروز براث (PDB مرک آلمان) کشت داده شدند و پس از رشد قارچ‌ها و تشکیل توده‌های میسلومی، استخراج DNA به روش ژانگ و همکاران^۷ انجام شد (۱۷). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز تعیین شد. برای شناسایی مولکولی از آغازگرهای عمومی ITS5-5.8SrRNA-ITS4 استفاده شد (جدول ۱) (۱۸). واکنش زنجیره پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad انجام شد. چرخه حرارتی برای تکثیر این نواحی ژنی شامل واسرشت سازی اولیه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه در ۴۰ سیکل، ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۸ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه به مدت ۴۰ ثانیه و سپس گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول پی سی آر (PCR)^۸ در ژل آگارز یک درصد تحت جریان الکتروفورز قرار گرفت و سپس برای شناسایی به روش توالی سگر به مرکز ژنوم بالگاج سوئیس^۹ ارسال شد. توالی‌های حاصل از طریق بلاست در سایت NCBI^{۱۰}

تحلیل شدند. (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) تجزیه و

تهیه عصاره قارچی: به منظور تهیه عصاره قارچی ابتدا جدایه‌ها روی محیط کشت PDA کشت داده و به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس از حاشیه پرکنه‌های در حال رشد جدایه‌ها، دیسک‌هایی در اندازه ۰/۵ × ۰/۵ سانتی متر تهیه شدند و

انجام شده‌اند (۱۴)؛ اما گزارش‌های منتشر شده درباره ظرفیت آنتی اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت بسیار اندک است. مطالعه حاضر با هدف جداسازی اندوفیت‌های مختلف از گیاه فندق و بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ترکیبات فیتوشیمیایی مختلف در آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی قارچ‌های اندوفیت:

نمونه‌های گیاهی فندق از گیاهان تازه و سالم از سه بافت برگ، ساقه و ریشه از شش استان (گلستان، مازندران، گیلان، اردبیل، زنجان و قزوین) با شرایط آب و هوایی متفاوت جمع آوری شدند. نمونه‌ها در پاکت‌های کاغذی سر بسته به آزمایشگاه، منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا تجزیه و تحلیل بیشتر نگهداری شدند. به منظور جداسازی اندوفیت‌ها از بافت‌های گیاهی، ضد عفونی سطحی به روش تان و همکاران^۵ انجام شد (۱۵). نمونه‌ها به طور کامل شسته شدند تا بقایا و آلودگی‌های سطحی حذف شوند. نمونه‌های گیاهی ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ۲ تا ۸ دقیقه (با توجه به نوع بافت) و اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه ضد عفونی سطحی شدند؛ در نهایت، چندین بار با آب مقطر سترون شستشو داده و روی کاغذ صافی سترون در زیر هود لامینار خشک شدند. نمونه‌های استریل شده به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتی متری تقسیم شدند و به محیط غذایی سیب زمینی دکستروز آگار (PDA، مرک^۶ آلمان) به همراه ۵۰ میلی گرم در لیتر تراسایکلین به منظور جلوگیری از رشد باکتری، منتقل و به مدت ۲ تا ۴ هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ ± ۲ درجه سانتی گراد در شرایط تاریکی نگهداری شدند. قارچ‌های اندوفیت رشد کرده به تشک‌های پتری

به محیط کشت PDB، منتقل و به مدت ۱۰ روز در دمای اتاق روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. به این ترتیب، ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال اتیل‌استات به کشت‌های مایع و توده‌های میسلومی اضافه شد و به

مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار داده و با دستگاه تبخیرکننده چرخان در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط خلأ تغلیظ شدند.

جدول ۱- توالی آغازگرهای استفاده‌شده برای شناسایی جدایه‌های اندوفیت

منبع	توالی	جهت	نام آغازگر
۱۸	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	Forward	ITS4
۱۸	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	Reverse	ITS5

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش دی فنیل پیکریل هیدراز ۱۱ (DPPH): بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با استفاده از رادیکال‌های پایدار DPPH به روش برند - ویلیامز و همکاران^{۱۲} (۱۹) انجام گرفت. ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره متانولی $10^{-5} \times 6$ مولار به ۳/۹ میلی‌لیتر محلول DPPH، اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس میزان جذب محلول در طول موج ۵۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom Libra S22) خوانده شد. در نهایت، میزان فعالیت مهار رادیکال (^{۱۳}RSA) DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%RSA = [1 - (A_c - A_s)/A_c \times 100]$$

در این رابطه، A_s = میزان جذب نمونه، A_c = میزان جذب شاهد و RSA = فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد است.

تعیین مقدار فنول کل و فلاونوئید: محتوای فنول کل عصاره اتیل‌استات قارچ‌های اندوفیت با استفاده از روش مبتنی بر معرف فولین - سیوکالتیو^{۱۴} اندازه‌گیری شد (۲۰). عصاره هر قارچ در متانول (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) حل و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول (۵۰ درصد) واکشگر فولین - سیوکالتیو و سپس ۱/۵ میلی‌لیتر

سدیم کربنات ۲۰ درصد اضافه شد. مخلوط حاصل با افزودن آب مقطر در حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر، ساخته و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش مرئی (Biochrom Libra S22) قرائت شد. مقادیر فنول کل عصاره‌ها با استفاده از منحنی استاندارد براساس میلی‌گرم گالیک‌اسید در گرم عصاره اندازه‌گیری شدند (۲۱).

به منظور سنجش میزان محتوای فلاونوئید هر عصاره از روش رنگ‌سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد (۲۲). ۲۵۰ میکرولیتر از هر عصاره به‌طور جداگانه با ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷۵ میکرولیتر سدیم‌نیتريت ۵ درصد ترکیب شد. سپس بعد از ۵ دقیقه ۱۵۰ میکرولیتر محلول کلرید آلومینیوم ۱۰ درصد اضافه شد؛ در نهایت بعد از ۶ دقیقه، ۵۰۰ میکرولیتر سدیم‌هیدروکسید و ۲۷۵ میکرولیتر آب مقطر، اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. شدت رنگ صورتی مخلوط حاصل در طول موج ۵۱۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر فرابنفش مرئی قرائت شد. محتویات فلاونوئید براساس منحنی کالیبراسیون کوئرستین، محاسبه و نتایج به‌صورت میلی‌گرم معادل

کوئرتستین در گرم عصاره بیان شدند.

قارچی با ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ، نشان دهنده وجود کوئینون و فلاونون در نمونه‌ها است (۲۵). وجود دی‌ترین‌ها با ترکیب ۲ میلی لیتر از عصاره قارچی با ۵-۴ قطره محلول کوپر استات مس اثبات شد؛ به‌طوری‌که رنگ سبز زمردی نشان دهنده وجود دی‌ترین‌ها است (۲۷). همچنین، ۱ میلی لیتر از عصاره قارچی با ۱ میلی لیتر از سدیم هیدروکسید ۵ درصد ترکیب شد؛ رنگ زرد نشان دهنده وجود کومارین در نمونه‌ها است (۲۵).

نتایج

شناسایی قارچ‌های اندوفیت: در مطالعه حاضر، در مجموع ۷۹۱ قارچ اندوفیت از بافت‌های برگ، ساقه و ریشه گیاه فندق از شش منطقه جغرافیایی (استان‌های گلستان، مازندران، گیلان، زنجان، اردبیل و قزوین) جداسازی شد که از رویشگاه‌های اصلی فندق در ایران‌اند. جدایه‌ها براساس خصوصیات مورفولوژیکی و شناسایی مولکولی به ۲۴ گونه طبقه‌بندی شدند که از این میان، ۲۳ گونه متعلق به شاخه آسکومایکوتا^{۱۵} و یک گونه متعلق به شاخه بازیدیومایکوتا^{۱۶} بود. توالی قارچ‌های شناسایی شده با اخذ شماره دستیابی در بانک ژن ذخیره شدند (جدول ۲).

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های قارچی:

این مطالعه همچنین با هدف به دست آوردن جدایه‌هایی با فعالیت آنتی اکسیدانی از گیاه فندق انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتیل استاتی گونه‌های قارچی مورد مطالعه به روش DPPH اندازگیری و با نمونه استاندارد (اسید آسکوربیک با فعالیت آنتی اکسیدانی ۹۸ درصد) مقایسه شد. در این روش تغییر رنگ رادیکال آزاد DPPH از ارغوانی به زرد نشان دهنده قدرت مهار

غربالگری فیتوشیمیایی کیفی عصاره‌های قارچی:

به‌منظور بررسی متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره‌های قارچی، تست‌های مختلفی با روش‌های استاندارد انجام شدند که به شرح زیرند:

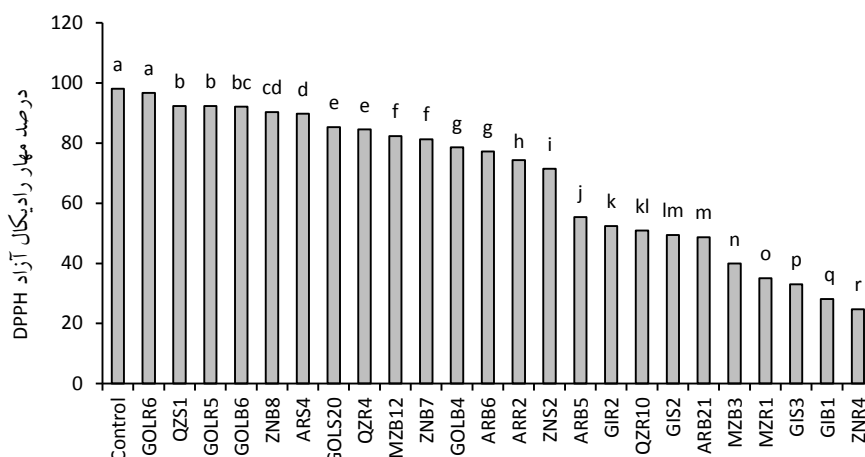
به‌منظور اثبات وجود فلاونوئید، ۲ میلی لیتر از عصاره قارچی با ۲ میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید رقیق ترکیب شد. تغییر رنگ از زرد به بی‌رنگ نشان دهنده وجود فلاونوئید است (۲۳). برای سنجش وجود آلکالوئیدها، ۱ میلی لیتر از عصاره‌های قارچی با چند قطره لوگول ترکیب شد؛ رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای نشان دهنده وجود آلکالوئیدها است (۲۴). وجود تانن، با اضافه کردن کلرید آهن (III) ۱ درصد به‌صورت قطره قطره به ۵ میلی لیتر از عصاره قارچی اثبات شد؛ به‌طوری‌که رنگ سیاه مایل به آبی نشان دهنده تانن است (۲۵). برای تست وجود ترکیبات فنولی، ۲ میلی لیتر از عصاره قارچی با ۲ میلی لیتر از محلول کلرید آهن (III) ۵ درصد ترکیب شد؛ رنگ سبز تیره نشان دهنده وجود ترکیبات فنولی است (۲۶). وجود استروئیدها با ترکیب ۲ میلی لیتر از عصاره قارچی با ۲ میلی لیتر کلروفرم و سپس افزودن اسید سولفوریک به‌صورت قطره قطره تأیید شد؛ به‌طوری‌که رنگ سبز نشان دهنده وجود استروئید در نمونه‌ها است (۲۶). به‌منظور اثبات وجود ترپنوییدها، ۲۰۰ ماکرولیتر از عصاره قارچی با ۱ میلی لیتر کلروفرم و ۱ میلی لیتر اسید سولفوریک ترکیب شد؛ رنگ خاکستری مایل به صورتی نشان دهنده وجود ترپنویید در نمونه‌ها است (۲۴). ظهور رنگ نارنجی و قرمز تیره بر اثر ترکیب ۱ میلی لیتر عصاره

P. N. unguis, *Pleosporales* sp., *equiseti*,
E. nigrum, *F. fujikuroi*, *Fusarium* sp., *citrinum*,
B. adusta, *C. sphaerospermum*, *G. idaeicola*,
T. Exophiala sp., *Angustimassarina* sp.,
amestolkiae به‌ترتیب با مقادیر بالای ۵۰ درصد،
 بیشترین فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH را نشان دادند؛
 درحالی‌که *P. chrysogenum* دارای کمترین فعالیت
 آنتی‌اکسیدانی بود (شکل ۱).

رادیکال‌های آزاد با آنتی‌اکسیدان‌های مربوطه است.
 نتایج نشان دادند اختلاف میان فعالیت به دام‌اندازی
 رادیکال DPPH در عصاره حاصل از قارچ‌های مختلف
 و نمونه شاهد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود
 ($P < 0.01$) (جدول ۳). گونه *P. sporulosa* که بیشترین
 فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد با نمونه شاهد در یک
 گروه قرار گرفت (شکل ۱). سایر گونه‌ها نظیر *C.*
F. N. quercina, *A. alternata*, *herbarum*

جدول ۲- نام قارچ‌های اندوفیت جداشده از گیاه فندق به همراه کد ثبت‌شده در بانک ژن (NCBI)

شماره جدایه‌ها	نام قارچ	اندام‌های گیاهی	کد دستیابی در بانک ژن
GOLB4	<i>Epicoccum nigrum</i>	برگ	(MN963671)
GOLB6	<i>Nothophoma quercina</i>	برگ	(MN963672)
GOLS20	<i>Neocucurbitaria unguis</i>	ساقه	(MN963673)
GOLR5	<i>Alternaria alternata</i>	ریشه	(MN963674)
GOLR6	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>	ریشه	(MN963675)
MZB3	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	برگ	(MN963676)
MZB12	<i>Fusarium</i> sp.	برگ	(MN963694)
MZR1	<i>Fusarium proliferatum</i>	ریشه	(MN963677)
GIB1	<i>Diaporthe</i> sp.	برگ	(MN963678)
GIS2	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	ساقه	(MN963679)
GIS3	<i>Pyrenochaetopsis</i> sp.	ساقه	(MN963680)
GIR2	<i>Exophiala</i> sp.	ریشه	(MN963681)
ZNB7	<i>Fusarium fujikuroi</i>	برگ	(MN963682)
ZNB8	<i>Fusarium equiseti</i>	برگ	(MN963683)
ZNS2	<i>Bjerkandera adusta</i>	ساقه	(MN963684)
ZNR4	<i>Penicillium chrysogenum</i>	ریشه	(MN963685)
ARB5	<i>Angustimassarina</i> sp.	برگ	(MN963689)
ARB6	<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	برگ	(MN963686)
ARB21	<i>Cercospora</i> sp.	برگ	(MN963687)
ARS4	<i>Pleosporales</i> sp.	ساقه	(MN963690)
ARR2	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	ریشه	(MN963688)
QZS1	<i>Cladosporium herbarum</i>	ساقه	(MN963691)
QZR4	<i>Penicillium citrinum</i>	ریشه	(MN963692)
QZR10	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	ریشه	(MN963693)



شکل ۱- مقایسه میانگین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره‌های قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه فندق. حروف مختلف بیان‌کننده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است.

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر گونه قارچی بر درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات درصد مهار رادیکال آزاد DPPH
گونه قارچی	۲۴	۴۰۸۷۲/۱۴ **
خطا	۵۰	۳۷/۸۴۳
ضریب تغییرات		۱/۲۸

مقایسه میانگین در سطح احتمال یک درصد انجام شده است (LSD= ۱/۹۰۲۱)

۵). محتوای فلاونوئید عصاره‌ها نیز با معادله خط استاندارد کوثرستین به صورت $y = 0.1773x + 0.162$, $R^2 = 0.97$ محاسبه شد. نتایج نشان دادند محتوای فلاونوئید اندازه‌گیری شده در عصاره‌های قارچی مختلف در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود ($P < 0.01$) (جدول ۴). *P. sporulosa* و *C. herbarum* به ترتیب با محتوای فلاونوئیدی $9/84 \pm 0/038$ و $8/76 \pm 0/034$ دارای بالاترین غلظت بودند؛ در حالی که *Diaporthe sp* و *P. chrysogenum* به ترتیب با مقادیر $0/08 \pm 0/023$ و $0/03 \pm 0/025$ کمترین غلظت از فلاونوئید را داشتند (جدول ۵).

سنجش میزان فنول کل و فلاونوئید عصاره‌های

قارچی: محتوای فنول کل با روش فولین - سیوکالتیو براساس معادله خط منحنی استاندارد گالیک اسید ($y = 8.992x + 0.0087$, $R^2 = 0.9986$) محاسبه شد. نتایج نشان دادند محتوای فنول کل اندازه‌گیری شده در عصاره‌های قارچی مختلف، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد ($P < 0.01$) (جدول ۴). طیف گسترده‌ای از غلظت‌های فنول کل در عصاره‌های قارچی از ایتیل استات وجود دارد (جدول ۵). بیشترین غلظت ترکیبات فنولی در عصاره *P. sporulosa* و *C. herbarum* مشاهده شد؛ در حالی که *Diaporthe sp* و *P. chrysogenum* حاوی کمترین غلظت بودند (جدول

جدول ۴- تجزیه واریانس میزان فنول کل و فلاونوئید در عصاره‌های قارچ‌های اندوفیت مختلف جدا شده از گیاه فندق

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات میزان فنول	میانگین مربعات میزان فلاونوئید
گونه قارچی	۲۳	۹/۱۵۹ ^{**}	۰/۸۷۰ ^{**}
خطا	۴۸	۰/۰۱۰۳	۰/۰۰۰۰۵۴
ضریب تغییرات		۰/۴۷	۰/۸۲

جدول ۵- میانگین محتوای فنول کل و فلاونوئید عصاره قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه فندق

نام قارچ	فنول کل (میلی گرم گالیک اسید در گرم عصاره)	فلاونوئید (میلی گرم معادل کوئرستین در گرم عصاره)
<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>	۱۴/۸۶±۰/۰۱ a	۹/۸۴±۰/۰۳۸a
<i>Cladosporium herbarum</i>	۱۴/۶۶±۰/۰۳۷b	۸/۷۶±۰/۰۳۴b
<i>Alternaria alternata</i>	۱۲/۸۶±۰/۰۵۴ c	۷/۶۸±۰/۰۲۳c
<i>Nothophoma quercina</i>	۱۲/۲۹±۰/۰۸۴ d	۷/۶۲±۰/۰۲۳c
<i>Fusarium equiseti</i>	۱۰/۸۷±۰/۰۱۹ e	۷/۴۸±۰/۰۳۴d
<i>Pleosporales sp.</i>	۸/۹۱±۰/۰۲۶f	۶/۵۵±۰/۰۲۵ e
<i>Neocucurbitaria unguis</i>	۷/۹۴±۰/۰۶۷g	۵/۹۷±۰/۰۲۳f
<i>Penicillium citrinum</i>	۸/۱۷±۰/۰۲۴h	۵/۷۶±۰/۰۳g
<i>Fusarium sp.</i>	۸/۷۴±۰/۰۶۷i	۵/۶۱±۰/۰۴۹h
<i>Fusarium fujikuroi</i>	۷/۷۰±۰/۰۲۱j	۴/۵۱±۰/۰۵۶h
<i>Epicoccum nigrum</i>	۵/۸۲±۰/۰۱۱k	۵/۰۵±۰/۰۳۴i
<i>Gnomoniopsis idaeicola</i>	۵/۶۶±۰/۰۳۷l	۴/۶۳±۰/۰۲۸j
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	۵/۶۳±۰/۰۶۶ l	۴/۵۱±۰/۰۲۸k
<i>Bjerkandera adusta</i>	۵/۴۲±۰/۰۱۲m	۵/۵۲±۰/۰۳۴k
<i>Angustimassarina sp.</i>	۵/۱۲±۰/۰۲۴m	۲/۸۷±۰/۰۱۳l
<i>Exophiala sp.</i>	۵/۴۲±۰/۰۲۲n	۲/۰۸±۰/۰۲۸m
<i>Talaromyces amestolkiae</i>	۵/۰۷±۰/۰۱۴n	۱/۹۹±۰/۰۳۱n
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	۴/۶۸±۰/۰۱۷o	۰/۸۷±۰/۰۲۹o
<i>Cercospora sp.</i>	۴/۳۰±۰/۰۲p	۰/۶۲±۰/۰۳۸o
<i>Purpureocillium lilacinum</i>	۴/۱۷±۰/۰۱۳q	۰/۶۴±۰/۰۲۳p
<i>Fusarium proliferatum</i>	۳/۸۸±۰/۰۱۴ r	۰/۸۱±۰/۰۳۲p
<i>Pyrenochaetopsis sp.</i>	۱/۹۶±۰/۰۱۳s	۰/۲۴±۰/۰۳۱q
<i>Diaporthe sp.</i>	۱/۷۸±۰/۰۱۷t	۰/۰۸±۰/۰۲۵r
<i>Penicillium chrysogenum</i>	۰/۶۸±۰/۰۱u	۰/۰۳±۰/۰۲۳r

مقایسه میانگین در سطح احتمال یک درصد انجام شده است. عدد LSD برای فنول کل و فلاونوئید به ترتیب از ۰/۳۲۲ و ۰/۱۶۱ است.

غربالگری فیتوشیمیایی عصاره‌های قارچی

جدول ۶- بررسی‌های فیتوشیمیایی عصاره قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه فندق

عصاره قارچی	فلاونوئید	آلکالوئید	تانن	فنول	استروئید	ترپنوئید	کوئینون و فلاونن	دی‌ترپن	کومارین
GOLB4	+	-	-	+	-	+	+	+	+
GOLB6	+	-	-	+	+	+	+	+	+
GOLS20	+	-	-	+	+	-	-	+	+
GOLR5	+	-	-	+	-	-	+	+	+
GOLR6	+	-	-	+	+	+	-	+	+
MZB3	+	-	-	+	+	-	-	+	+
MZB12	+	-	-	+	+	+	+	+	+
MZR1	+	-	-	+	-	+	-	+	+
GIB1	+	-	-	+	-	-	-	+	+
GIS2	+	-	-	+	-	-	-	+	+
GIS3	+	-	-	+	-	-	-	+	+
GIR2	+	-	-	+	+	-	+	+	+
ZNB7	+	-	-	+	+	+	+	+	+
ZNB8	+	-	-	+	+	+	+	+	+
ZNS2	+	-	-	+	-	+	+	+	+
ZNR4	+	-	-	+	-	-	-	+	+
ARB5	+	-	-	+	-	-	-	+	+
ARB6	+	-	-	+	+	+	+	+	+
ARB21	+	-	-	+	-	-	-	+	+
ARS4	+	-	-	+	+	+	+	+	+
ARR2	+	-	-	+	-	-	+	+	+
QZS1	+	-	-	+	-	-	+	+	+
QZR4	+	-	-	+	-	-	+	+	+
QZR10	+	-	-	+	-	-	+	+	+

بررسی آزمون‌های فیتوشیمیایی نشان داد ترکیبات فلاونوئید، دی‌ترپن و کومارین در همه عصاره‌های قارچی حضور داشتند؛ درحالی‌که ترکیبات آلکالوئید، فنول و تانن در هیچ کدام از عصاره‌های قارچی یافت

نشدند. همچنین ترکیبات استروئید، ترپنوئید، کوئینون و فلاونن در برخی از قارچ‌ها نتایج مثبت نشان دادند. ترکیبات فلاونوئید، استروئید، ترپنوئید، کوئینون و فلاونن، دی‌ترپن و کومارین در گونه‌های N.

دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد DPPH و غربالگری ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در آنها بررسی شدند. در مطالعه حاضر از عصاره اتیل‌استات حاصل از قارچ‌های اندوفیت برای ارزیابی‌های بالا استفاده شد. عصاره‌گیری با اتیل‌استات، کارآمدترین روش برای جداسازی متابولیت‌های ثانویه قارچی است. اتیل‌استات، به‌عنوان یک حلال عصاره‌گیری، به‌طور انتخابی ترکیبات فنولی با وزن مولکولی کم و پلی‌فنول‌هایی با وزن مولکولی بالا را استخراج می‌کند (۳۳).

به‌منظور تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های قارچی، از روش سنجش مهار رادیکال آزاد DPPH استفاده شد. این روش بین روش‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی، بسیار اساسی و پرکاربرد و یک مدل آزمایشگاهی مناسب در نظر گرفته شده است. این روش دقیق‌ترین روش غربالگری محسوب می‌شود که به‌طور گسترده برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مدت زمان کوتاه استفاده می‌شود (۳۴). این ترکیب با شکستن زنجیره رادیکال آزاد از طریق اهدای یک اتم هیدروژن فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان می‌دهد (۳۵). DPPH در اثر کاهش ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، ناپدید و به مولکول‌های تشخیصی پایدار تبدیل می‌شود؛ در نتیجه، تغییر رنگ از بنفش به زرد می‌تواند نشان‌دهنده توانایی هیدروژن‌دهی در عصاره‌ها باشد (۳۵).

در این مطالعه، تمام عصاره‌های قارچی توانایی گسترده‌ای در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشتند. در این میان، گونه *P. sporulosa* با فعالیت مهاری ۹۷ درصد در برابر DPPH به‌عنوان گونه برتر انتخاب شد که میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن تقریباً برابر با اسید آسکوربیک نشان داده شده است. این گونه برای نخستین بار در سال ۲۰۱۳ به‌عنوان اندوفیت از ریشه گیاه

Pleosporales sp., *F. equiseti*, *quercina* *Fusarium* sp., *G. idaeicola* و *F. fujikuroi* به‌طور مشترک مشاهده شدند (جدول ۶). این گونه‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای ۷۰ درصد نشان دادند (شکل ۱). گونه‌های *P. tenuissimum*, *C. Diaporthe* sp., *Angustimassarina* sp., *chrysogenum* *Cercospora* sp. و *Pyrenochaetopsis* فاقد ترکیبات استروئید، ترپنوئید، کوئینون و فلاونون بودند. نتایج این بررسی به‌طور کامل در جدول ۶ ارائه شده‌اند.

بحث

قارچ‌های اندوفیت به‌طور گسترده از گیاهان مختلف گزارش شده‌اند که به‌عنوان منابع متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی شناخته می‌شوند (۲۸). اندوفیت‌ها تمایل بیشتری به استفاده از مخزن ترکیبات فعال زیستی طبیعی دارند که توسط میزبان آنها تولید می‌شود (۲۹). تحقیقات انجام شده روی غربالگری فیتوشیمیایی فندق، وجود ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و غیره را نشان داد (۳۰). گونه‌های قارچی اندوفیت اکنون به‌عنوان منابع جدید هیجان‌انگیز برای به دست آوردن ترکیبات فعال زیستی جدید در نظر گرفته شده و از چندین میزبان گزارش شده‌اند (۳۱). وجود ترکیبات فیتوشیمیایی در اندوفیت‌ها منبع بالقوه‌ای برای استفاده دارویی و صنعتی و همچنین منبع بالقوه پیش‌سازها در تولید داروهای مصنوعی است (۳۲)؛ از این رو غربالگری عصاره‌های اندوفیت به‌منظور تعیین پتانسیل آنها برای تجزیه و تحلیل بیشتر و بررسی فعالیت زیستی آنها حائز اهمیت است. در این مطالعه، ۲۴ جدایه اندوفیت از گیاه فندق جداسازی و شناسایی شد. همچنین، میزان توانایی به

آنتی اکسیدانی کمک کنند و نقش مهمی در اصلاح رادیکال‌های آزاد داشته باشند (۴۱).

فلاونوئیدها نیز زیرگروه بزرگی از متابولیت‌های ثانویه‌اند، نقش مهمی در مقاومت گیاه دارند و به‌طور گسترده بین گیاهان و پروکاریوت‌ها توزیع می‌شوند (۴۲). فلاونوئیدها از گیاهان در برابر تنش‌های مختلف زیستی و غیرزیستی محافظت می‌کنند و شامل طیف متنوعی از عملکردهای بیولوژیکی‌اند و نقش مهمی در تعامل گیاه و محیط آنها دارند (۴۳). یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های ترکیبات فنولیک فعالیت آنتی اکسیدانی است که ارتباط نزدیکی با ساختار شیمیایی آنها دارد. همچنین، ترکیبات فنولیک با فعالیت‌های ضدسرطان، ضدباکتریایی، ضدویروسی یا ضدالتهابی گزارش شده‌اند (۴۴). اندوفیت‌های قارچی یک منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه جدید از جمله ترکیبات آنتی بیوتیک، آنتی اکسیدان و سرکوب‌کننده سیستم ایمنی‌اند (۴۴).

فنول‌ها و فلاونوئیدها مهم‌ترین ترکیبات فیتوشیمیایی اندوفیت‌ها در این مطالعه بودند و در همه عصاره‌های قارچی نتایج مثبت نشان دادند و مطابق با نظرات فردوس و عالم هستند (۲۵). مطالعات قبلی بیان می‌کنند بین محتوای فنول کل، فلاونوئید و پتانسیل آنتی اکسیدانی هر نمونه، رابطه خطی و مستقیم وجود دارد (۴۵). در مطالعه بالا، عصاره‌هایی که محتوای فنولی و فلاونوئیدی زیادی دارند، فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی را نشان دادند؛ در نتیجه، با افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی، میزان فنول کل و فلاونوئید نیز افزایش می‌یابد.

در این مطالعه، ترکیبات فیتوشیمیایی دیگر نظیر

Festuca sp. جداسازی شد (۳۶)؛ اما تاکنون مطالعاتی درباره فعالیت آنتی اکسیدانی آن انجام نشده است. سایر گونه‌ها نظیر *N. A. alternata*, *C. herbarum*, *N. Pleosporales sp.*, *F. equiseti*, *quercina*, *F. fujikuroi*, *Fusarium sp.*, *P. citrinum*, *anguis*, *C. sphaerospermum*, *G. idaeicola*, *E. nigrum*, *Exophiala sp.*, *Angustimassarina sp.*, *B. adusta*، *T. amestolkiae* به ترتیب فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی را از ۵۰ درصد تا ۹۷ درصد نشان دادند. از میان گونه‌های بالا به استثنای گونه‌های *A. alternata*، *A. alternata*، *P. citrinum*، *Fusarium sp.* و *Exophiala sp.* که در مطالعات دیگر نیز خواص آنتی اکسیدانی آنها بررسی شده است (۳۷، ۳۸، ۳۹ و ۴۰)، سایر گونه‌ها برای نخستین بار در این مطالعه از لحاظ خواص آنتی اکسیدانی ارزیابی شدند.

در این مطالعه بررسی کیفی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره‌های اتیل استات اندوفیت‌های قارچی، وجود فلاونوئید، استروئید، ترپنوئید، فنول، دی‌ترین، فلاونن، کوئینون و کومارین را در بیشتر قارچ‌ها تأیید می‌کند. تحقیقات نشان داده است عصاره‌های اندوفیت، ترکیبات فیتوشیمیایی فعال و خواص آنتی اکسیدانی قوی دارند؛ این فعالیت‌ها ممکن است به دلیل وجود ترکیبات فنولیک مانند فلاونوئیدها، فنول‌ها و ترپنوئیدها باشد (۲۲). فلاونوئیدها، فنول‌ها و ترپن‌ها اصلی‌ترین ترکیبات شیمیایی‌اند که باعث کاهش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شوند؛ از این رو به عنوان آنتی اکسیدان‌های اولیه و ثانویه عمل می‌کنند (۴۱). همچنین به دلیل گروه‌های هیدروکسیل موجود در ترکیبات فنول، آنها می‌توانند به‌طور مستقیم به فعالیت

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استفاده شوند. عصاره قارچ‌های اندوفیت به دلیل وجود ترکیبات طبیعی فعال زیستی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی را به نمایش گذاشته‌اند. همچنین، عصاره‌های خام برای شناسایی ترکیبات فعال، در معرض فرایند خالص‌سازی قرار می‌گیرند که ممکن است منبع بهتری برای توسعه داروهای جدید باشند. این ترکیبات طبیعی فعال، کاربردی بالقوه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها در بسیاری از محصولات دارویی دارند. این نخستین گزارش درباره فعالیت آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه فندق است. در ایران مطالعات چندانی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت و خواص فیتوشیمیایی آنها انجام نشده است؛ بنابراین، مطالعه حاضر مقدمه‌ای برای تحقیقات جامع‌تر درباره ترکیبات فعال زیستی تولید شده توسط این اندوفیت‌ها ارائه می‌دهد.

سپاسگزاری

سپاس از زحمات آقای مهندس سید اصغر حسینی از دانشگاه کشاورزی گنبد کاووس که ما را در انجام پژوهش حاضر یاری کردند.

References

- (1) Gülçin I. Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-Dopa. *Amino acids*. 2007; 32 (3): 431-8.
- (2) Aruoma OI. Free radical, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1998; 75 (2): 199-212.
- (3) Ramassamy C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. *European Journal Pharmacology*. 2006; 545(1): 51-64.

دی‌ترین‌ها و کومارین‌ها نیز نتایج مثبتی را در همه عصاره‌های قارچی نشان دادند. این ترکیبات نقش مهمی در گیاه دارند و از مهم‌ترین متابولیت‌های گیاهی به شمار می‌روند. دی‌ترین‌ها از ژرانیل ژرانیل پیروفسفات^{۱۷} (GGPP) مشتق شده‌اند (۴۶). گیاهان و قارچ‌ها این ترکیب را از طریق مسیر بیوستتزدوکتاز HMG-CoA سنتز می‌کنند (۴۷). دی‌ترین‌ها پایه‌ای برای ترکیبات مهم بیولوژیکی مانند رتینول، رتینال و فیتول‌اند که به‌عنوان عوامل ضد میکروبی و ضد التهابی و همچنین ترکیبات جدید آنتی‌بیوتیکی شناخته شده‌اند (۴۷). کومارین‌ها تقریباً در هر خانواده گیاهی یافت می‌شوند. آنها در بیوشیمی و فیزیولوژی گیاه و همچنین به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌ها، مهارکننده‌های آنزیمی و پیش‌سازهای ماده سمی نقش مهمی دارند. کومارین‌ها به‌عنوان ترکیبات دفاعی نیز نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در برابر آفات و بیماری‌ها دارند (۴۸). از این رو اکنون پذیرفته شده است اندوفیت‌ها یک مخزن مهم از ساختارهای شیمیایی منحصر به فرد را نشان می‌دهند که از طریق تکامل اصلاح شده‌اند و اعتقاد بر این است که در حفاظت و ارتباط گیاهان میزبان دخیل‌اند (۴۹).

نتیجه‌گیری

پیشنهاد شده است افزایش تولید آنتی‌اکسیدان توسط اندوفیت‌های جدا شده از گیاهان ممکن است نتیجه تولید انواع اکسیژن فعال توسط گیاهان یا اندوفیت‌ها باشد (۵۰). یافته‌های ما مطابق با نتایجی است که نقش اندوفیت‌ها را در تقویت فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه برجسته می‌کند. مطالعه حاضر نشان داد قارچ‌های اندوفیت ممکن است به‌عنوان منبع بالقوه

- Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*. 2005; 90 (1-2): 157-67.
- (6) Mehlenbacher SA. Geographic distribution of incompatibility alleles in cultivars and selections of European hazelnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2014; 139 (2): 191-212 .
- (7) Gallego A, Malik S, Yousefzadi M, Makhzoum A, Tremouillaux-Guiller J, Bonfill M. Taxol from *Corylus avellana*: paving the way for a new source of this anti-cancer drug. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2017; 129: 1-16.
- (8) Shahidi F, Alasalvar C, Liyana-Pathirana CM. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55 (4): 1212-20.
- (9) Alasalvar C, Karamać M, Amarowicz R, Shahidi F. Antioxidant and antiradical activities in extracts of hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut green leafy cover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006; 54 (13): 4826-32.
- (10) Alurappa R, Chowdappa S. Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Endophytic Fungal Extracts Isolated from Ethno Pharmaceutical Plant *Rauwolfia tetraphylla* L. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018; 12 (1): 317-32.
- (11) Petrini O. Fungal endophytes of tree leave. In: Andrews JH, Hirano SS, editors. *Microbial ecology of leaves*. 1991; p. 179-197.
- (12) Baltruschat H, Fodor J, Harrach BD, Niemczyk E, Barna B, Gullner G, et al. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *The New Phytologist*. 2008; 180: 501-10
- (13) Guo B. Cytonic acids A & B: novel
- (4) Halliwell B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposium*. 1995; 61: 73-101.
- (5) Silva BA, Ferreres F, Malva JO, Dias AC. tridepside inhibitors of hCMV protease from the endophytic fungus *Cytospora species*. *Journal of Natural Product*. 2000; 63 (5): 602-4.
- (14) Tan XM, Chen XM, Wang CL, Jin XH, Cui JL, Chen J, et al. Isolation and identification of endophytic fungi in roots of nine *Holcoglossum* plants (Orchidaceae) collected from Yunnan, Guangxi, and Hainan provinces of China. *Current microbiology*. 2012; 64 (2): 140-7 .
- (15) Singleton LL, Mirial JD, Rush CM. *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press. 1990.
- (16) Zhang J, Zhang L, Wang X, Qiu D, Sun D, Gu J, et al. Microbial transformation of 10-deacetyl-7-epitaxol and 1b-hydroxybaccatin I by fungi from the inner bark of *Taxus yunnanensis*. *Journal of Natural Products*. 1998; 61 (4): 497-500
- (17) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego. *Academic Press*. 1990; 18 (1): 315-22.
- (18) Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate Antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie-Food Science and Technology*. 1995; 28: 25-30.
- (19) Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. 2nd ed. London: Clarendon Press; 1989.
- (20) Yadav M, Yadav A, Yadav JP. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Asian Pacific journal of tropical medicine*. 2014; 7: S256-61.
- (21) Govindappa M, Channabasava R, Kumar

- KS, Pushpalatha KC. Antioxidant Activity and Phytochemical Screening of Crude Endophytes Extracts of *Tabebuia argentea* Bur. & K. Sch. *American Journal of Plant Sciences*. 2013; 2013.
- (22) Yadav YC, Srivastava DN, Saini V, Singhal S, Seth AK, Kumar S. In-vitro antioxidant activity of methanolic extraction of *Ficus Benghalensis* L. latex. *Pharmacologyonline*. 2011; 1: 140-8.
- (23) Misra CS, Pratyush K, Sagadevan LDM, James J, Veettil AKT, Thankamani V. A comparative study on phytochemical screening and antibacterial activity of roots of *Alstonia scholaris* with the roots, leaves and stem bark. *International Journal of Research in Phytochemistry and pharmacology*. 2011; 1 (2): 77-82.
- (24) Firdouse S, Alam P. Phytochemical investigation of extract of *Amorphophallus campanulatus* tubers. *International Journal of Phytomedicine*. 2011; 3 (1): 32.
- (25) Devi NN, Prabakaran JJ, Wahab F. Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from *Centella asiatica*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2012; 2 (3): S1280-4.
- (26) Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 2011; 1(1): 98-106.
- (27) Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*. 2002; 106: 996-1004.
- (28) Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. 2001; 18: 448-59.
- (29) Riethmüller E, Alberti Á, Tóth G, Béni S, Ortolano F, Kéry Á. Characterisation of diarylheptanoid-and flavonoid-type phenolics in *Corylus avellana* L. leaves and bark by HPLC/DAD-ESI/MS. *Phytochemical Analysis*. 2013; 24 (5): 493-503.
- (30) Verma VC, Gond SK, Kumar A, Mishra A, Kharwar RN, Gange AC. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microbial ecology*. 2009; 57 (4): 749-56.
- (31) Sadananda TS, Nirupama R, Chaithra K, Govindappa M, Chandrappa CP, Vinay Raghavendra B. Antimicrobial and antioxidant activities of endophytes from *Tabebuia argentea* and identification of anticancer agent (lapachol). *The Journal of Medicinal Plants Research*. 2011; 5 (16): 3643-52.
- (32) Garcia A, Rhoden SA, Bernardi-Wenzel J, Orlandelli RC, Azevedo JL, Pamphile JA. Antimicrobial Activity of Crude Extracts of Endophytic Fungi Isolated from Medicinal Plant *Sapindus saponaria* L. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2012; 2 (10): 35.
- (33) Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*. 1995; 28 (1): 25-30
- (34) Ravindran C, Naveenan T, Varatharajan GR, Rajasabapathy R, Meena RM. Antioxidants in mangrove plants and endophytic fungal associations. *Botanica Marina*. 2012; 55 (3): 269-79.
- (35) Baroncelli R, Da Lio D, Vannacci G, Sarrocco S. Genome Resources for the endophytic fungus *Paraphaeosphaeria sporulosa*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2020; 33 (9): 1098-9.
- (36) Guleria S, Tiku AK, Gupta S, Singh G, Koul A, Razdan VK. Chemical composition, antioxidant activity and inhibitory effects of essential oil of *Eucalyptus teretecornis* grown in north-western Himalaya against *Alternaria alternata*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 2012; 21 (1): 44-50.
- (37) Ruma K, Sunil K, Prakash HS. Antioxidant, anti-inflammatory,

- antimicrobial and cytotoxic properties of fungal endophytes from *Garcinia* species. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013; 5 (3): 889-97.
- (38) Hulikere MM, Joshi CG, Nivvya T, Ananda D, Raju NG. Antiangiogenic and antioxidant activity of endophytic fungus isolated from seaweed (*Sargassum wightii*). *Asian Journal of Biochemistry*. 2016; 11 (4): 168-76.
- (39) Diao YH, Li T, Zhao ZW. Zinc accumulation characteristics of two *Exophiala* strains and their antioxidant response to Zn²⁺ stress. *Journal of environmental protection*. 2013; 4: 12-9.
- (40) Elmastas M, Isildak O, Turkekul I, Temur N. De- termination of Antioxidant Activity and Antioxidant Com- pounds in Wild Edible Mushrooms, *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007; 20 (3): 337- 45.
- (41) Sultana B, Anwar F, Przybylski R. Antioxidant activity of phenolic components present in barks of *Azadirachta indica*, *Terminalia arjuna*, *Acacia nilotica*, and *Eugenia jambolana* Lam. trees. *Food chemistry*. 2007 Jan 1; 104 (3):1106-14.
- (42) Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in plant science*. 2007; 12 (1): 29-36.
- (43) Strobel G, Ford E, Worapong J, Harper JK, Arif AM, Grant DM, et al. Isopestacin, a unique isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora* possessing antifungal and antioxidant properties. *Phytochemistry*. 2002; 60 (2): 179-83.
- (44) Fang Z, Zhang Y, Lü Y, Ma G, Chen J, Liu D, et al. Phenolic compounds and antioxidant capacities of bayberry juices. *Food Chemistry*. 2009; 113 (4): 884-8.
- (45) Pasdaran A, Hamed A. Natural products as source of new antimicrobial compounds for skin infections. In *The Microbiology of Skin, Soft Tissue, Bone and Joint Infections*. Academic Press. 2017; 223-53.
- (46) Eberhard Breitmaier. "Diterpenes". *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*. 2006; 1: 1-3.
- (47) Kostova I. Synthetic and Natural Coumarins as Cytotoxic Agents. *Current Medicinal Chemistry Journal*. 2005; 5: 29-46.
- (48) Gunatilaka AL. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of natural products*. 2006; 69 (3): 509-26.
- (49) White JRJF, Torres MS. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. *Physiologia Plantarum*. 2010; 138 (4): 440-6.

¹- Reactive Oxygen Species

²- *Corylus avellana* L.

³- Betulaceae

⁴- *Corylus*

⁵- Tan et al

⁶- Merck

⁷- Zhang et al

⁸- Polymerase chain reaction

⁹- Microsynth AG genome center (Balgach, Swiss)

¹⁰- National centre biotechnology information

¹¹- Diphenyl-1-picrylhydrazyl

¹²- Brand-Williams

¹³- Radical scavenging activity

¹⁴- Folin-Ciocalteu

¹⁵- Ascomycota

¹⁶- Basidiomycota

¹⁷- Geranylgeranyl pyrophosphate