Archiv

Agricultural Biotechnology Journal
p-ISSN 2228-6705
e-ISSN 2228-6500
Shahid Bahonar University of Kerman
Iranian Biotechnology Society

Study of Antioxidant Activity of Bacterial Endophyte Extracts of *Ferula gummosa boiss*

Mehri Soltani

MSc student, Department of Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran, Email: soltani.mhr@yahoo.com

Hedayat Bagheri

* Corresponding Author. Assistant Prof., Department of Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran, Tel:+9393804375, Email: bagheri.hedayat@gmail.com

Amir Hossein Keshtkar

Assistant Prof., Department of Plant Breeding, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran, Email: bagheri.hedayat@gmail.com

Abstract

Objective

Endophytes are known as a potential source of active natural compounds for use in medicine, agriculture, and industry. Medicinal plants are valuable sources for the study of endophytes. One of the most important medicinal and industrial plants in Iran is the Barije; *Ferula gummosa.boiss*, whose endophytes have not been studied yet.

Materials and methods

In this study, 20 bacterial isolates were isolated from different organs of the plant. Endophytes were identified using morphological and then molecular characteristics. The antioxidant properties of endophytic extracts were investigated by degradation of free radicals DPPH (DiPhenyl-1-Picryl Hydrazyl free radical).

Results

The R4 bacterium with the IC50 value of 2.5 mg / ml had the highest and the SK6 bacterium with an IC50 value of 8.8 mg / ml had the lowest antioxidant activity. The molecular identification of R4 bacteria revealed 98% similarity to the bacterium *Rahnella aquatilis*. It was also observed by phytochemical analysis that endophytic extracts with phenolic compounds exhibit significant antioxidant activity.

www.SID.ir

Archive of SID

Conclusions

Barije has different bacterial endophytes with different antioxidant properties. One of these bacteria is *Rahnella aquatilis*, which has high antioxidant properties. The presence of phenolic compounds in the extract of this bacterium is probably related to its antioxidant properties.

Keywords: Endophyt, Barije, Degradation of Free Radicals

Citation: Bagheri H, Soltani M, Keshtkar AH (2019). Study of Antioxidant Activity of Bacterial Endophyte Extracts of *Ferula gummosa boiss*. Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 127-142.

Agricultural Biotechnology Journal 11 (2), 127-142.

DOI: 10.22103/jab.2019.12608.1068

Received: February 25, 2019; Accepted: May 9, 2019

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره اندوفیت های باکتریایی گیاه دارویی باریجه

مهری سلطانی

دانشجوی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. ایمیل: **soltani.mhr@yahoo.com**

هدایت باقری

*نویسنده مسئول، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. تلفن: ۰۹۳۹۳۸۰۴۳۷۵، ایمیل: bagheri.hedayat@gmail.com

امیرحسین کشتکار

استادیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. ایمیل: **akesht@gmail.com**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۱۹

چکیده

هدف: اندوفیت‌ها به عنوان یک منبع بالقوه از ترکیبات طبیعی فعال برای استفاده در پزشکی، کشاورزی و صنعت شناخته شده‌اند. گیاهان دارویی منابع با ارزشی برای مطالعه اندوفیت ها می‌باشند. یکی از مهم ترین گیاهان دارویی و صنعتی ایران، گیاه باریجه با نام علمی *Ferula gummosa.boiss* می‌باشد که اندوفیتهای آن تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته اند.

مواد و روش ها: در این پژوهش ۲۰ جدایه باکتری از اندامهای مختلف گیاه باریجه جداسازی شد. شناسایی اندوفیت‌ها با استفاده از خصوصیات مورفولوژی و سپس مولکولی انجام گرفت. بررسی خواص آنتی اکسیدانی عصاره اندوفیت‌ها به روش تخریب رادیکال‌های آزاد DPPH (Di Phenyl-1-Picryl Hydrazyl free radical) مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: باکتری R4 با مقدار IC50 ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر دارای بیشترین و باکتری SK6 با مقدار IC50 ۸/۸ میلی گرم بر میلی لیتر دارای کمترین مقدار خاصیت آنتی اکسیدانی بودند. شناسایی مولکولی باکتری R4، شباهت ۹۸ درصدی این جدایه با باکتری*Rahnella aquatilis* را نشان داد. همچنین با بررسی فیتوشیمیایی مشاهده شد که عصاره اندوفیت‌های دارای ترکیبات فنولی، فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی نشان می دهند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه گیری: گیاه باریجه دارای اندوفیتهای باکتریایی متفاوت، با خواص آنتی اکسیدانی مختلف می باشد. یکی از این باکتریها، *Rahnella aquatilis* می باشد که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی می باشد. وجود ترکیبات فنلی در عصاره این باکتری احتمالا با خاصیت آنتی اکسیدانی آن مربوط می باشد.

واژه های کلیدی: اندوفیت، باریجه، تخریب رادیکال‌های آزاد

مقدمه

استفاده روز افزون از گیاهان دارویی سبب شده است که ارزش تجارت جهانی آن ها از ۵۱ میلیارد دلار در سال ۲۰۰۲، طی دو سال به ۱۰۰ میلیارد دلار رسیده و پیش بینی می شود تا سال ۲۰۵۰ به ۵ تریلیون دلار برسد (Joshi et al. 2004). گیاهان دارویی دارای مواد موثره‌ای می‌باشند که برای درمان بیماریها مورد استفاده قرار می گیرند (Soetan and Aiyelaagbe 2009). یکی از مهم ترین گیاهان دارویی، صنعتی و صادراتی ایران، گیاه باریجه با نام علمی *Ferula gummosa.boiss* از خانواده Apiaceae می‌باشد. اندوفیت ها یکی از منابع جدید ترکیبات زیستی هستند. گیاهان، مواد غذایی را برای اندوفیت‌ها فراهم می‌کنند و در مقابل اندوفیت‌ها هم ممکن است سبب مقاومت میزبان در برابر تنش های زیستی و غیرزیستی مانند آفات و بیماریها، خشکی و تحمل عناصر سنگین شوند (Miller 1986; Hata and Futal 1995; Arnold et al. 2003). امروزه کشف متابولیت های ضد میکروبی جدید از اندوفیت‌ها، جایگزین مهمی برای غلبه بر افزایش سطح مقاومت به دارو توسط عوامل بیماریزای انسانی و گیاهی می‌باشد. همچنین بعنوان نگهدارنده های مواد غذایی نیز می‌توانند به کار روند (Pimentel et al. 2011). باکتری اندوفیت *S. marcescens* cenA دارای بیشترین فعالیتIC50 و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی در بین باکتری های جداشده از گیاهان دارویی هند گزارش شده است (Nongkhlaw and Joshi 2015). همچنین Phomopsis sp.GJJM07 منبع مناسبی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی نشان داده شده است (Ganapathi et al, 2011).

از آنجا که اندوفیت ها دارای رشد و تکثیر سریعتری نسبت به گیاهان می باشند، کاربرد تجاری آنها برای استخراج مواد موثره بسیار ارزشمند بوده و می تواند باعث جلوگیری از برداشت بی رویه گیاهان در طبیعت گردد. همچنین تکثیر گیاه اقتصادی باریجه و اهلی نمودن آن در کشور تاکنون از موفقیت بالایی برخوردار نبوده است و شاید بتوان از ظرفیت اندوفیتها برای تولید متابولیتهای ثانویه استفاده نمود. بنابراین پژوهش حاضر با هدف جداسازی، شناسایی مقدماتی، مطالعه و بررسی برخی اثرات زیستی عصاره استخراج شده‌ی اندوفیت‌های باکتریایی گیاه باریجه انجام گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش ها

جمع آوری بذر دو ژنوتیپ متفاوت گیاه دارویی باریجه (*Ferula gumosa boiss*) از دو منطقه کا شان و بروجن با تایید متخصص گیاه شناسی صورت گرفت. نمونه برداری غده و ریشه نیز از منطقه بروجن صورت گرفت و در پاکت‌های کاغذی سربسته به آزمایشگاه منتقل گردید. به منظور جدا سازی اندوفیت‌ها از بافت‌های گیاهی، ضد عفونی سطحی طبق روش کو ساری به شرح زیر صورت گرفت(Kusari et al, 2008). نمونه‌های گیاهی جمع آوری شده برای حذف گرد و غبار شستشو شدند. پوست رویی نمونه‌ها با ا ستفاده از تیغ ا سکالپل حذف شده و کاملا شستشو داده شدند. بافت‌های گیاهی پس از تقسیم به قطعات۱۰-۵ میلی متری با غوطه وری در اتانول ۷۰ در صد به مدت ۲ دقیقه، شستشو با آب مقطر، هیپوکلریت سدیم ۳ در صد به مدت ۳ دقیقه و اتانول ۷۰ در صد به مدت ۳ دقیقه ضد عفونی سطحی شدند. برای جدا سازی اندوفیت‌ها، لایه‌های درونی قطعات ضد عفونی شده روی محیط NA (Nutrient Agar) قرار گرفته و در انکوباتور با دمای ۲±۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲-۲ هفته نگهداری شدند تا امکان رشد برای اندوفیت‌ها فراهم گردد. نمونه‌های بذر جمع آوری شده نیز پس از ضدعفونی، با اضافه کردن بافر فسفات، داخل هاون چینی خرد گردیده و به محیط NA انتقال داده شد و سپس در شرایط تاریکی و در دمای ۲±۲۸ درجه سانتیگراد قرار گرفت (Montazeri et al, 2010). پس از ۱۰ روز، باکتری‌های رشد کرده به تفکیک بذر، ریشه و غده مورد بررسی قرار گرفتند. بمنظور خالص سازی، جدایه‌های باکتری‌های به د ست آمده روی سطح محیط کشت آگار غذایی به صورت خطی کشت شدند. آزمون‌های رنگ آمیزی گرم مطابق روش (Schaad et al, 2001) و با بر سی ویژگی‌های ماکرو سکوپی صورت گرفت. برای تایید هویت مولکولی، استخراج DNA جدایه باکتری های اندوفیت به روش لیز قلیایی صورت گرفت (Charkhabi et al, 2011). برای تعیین کیفیت و کمیت DNA از الکتروفورز ژل آ گارز استفاده گرد ید. از آ غازگر های عمومی 16SrRNA (Partida-Martinez et al. 2005) برای شناسایی مولکولی استفاده گردید (جدول ۱).

جدول۱. توالی آغازگرهای 16SrRNA برای شناسایی مولکولی باکتری با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز (Partida-Martinez et al. 2005)

Table 1. Sequence of 16SrRNA primers for molecular detection of bacteria using polymerase chain reaction (Partida-Martinez et al. 2005)

آغازگر primer	توالی Sequence
16S F	5/-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3/
16S R	5/-CCCGGGATCCAAGCTTACGGCTACCTTGTTACGACTT -3/

www.SID.ir

Archive of SID

برنامه پی سی آر پس از واسرشت سازی اولیه با ۳۳ سیکل شامل یک دقیقه در دمای ۹۶ درجه، یک دقیقه در دمای ۵۲ درجه و دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و سپس گسترش نهایی انجام گردید. پس از الکتروفورز محصول پی سی آر، باند حاصل برای توالی یابی به شرکت توپاز ژن کاوش ارسال گردید. با بلاست توالی دریافتی، جنس باکتری شناسایی شد.

برای عصاره گیری باکتری‌های اندوفیت از محیط کشت NB (Nutrient Broth) استفاده شد. با سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون، باکتری‌ها از محیط کشت جدا شده و محیط حاوی عصاره باکتری‌ها بدست آمد. محیط حاصل به نسبت مساوی با کلروفرم ترکیب شده و در داخل شیکر انکوباتور قرار داده شد. عصاره‌ها پس از تغلیظ با غلظت ۰/۱ گرم بر میلی لیتر در حلال متانول ۸۵٪ برای آزمایشات آنتی اکسیدان مورد استفاده قرار گرفتند. محاسبه فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس روش اندازه گیری کاهش ظرفیت رادیکالی به کمک DPPH (۲و۲–دی فنیل–۱– پیکریدیل هیدرازیل) طبق روش (Stojichevich et al. 2008) انجام شد. برای تهیه عصاره‌ها، ۰/۰۵گرم از هر عصاره با ۵ میلی لیتر متانول ۸۵ درصد به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر قرار گرفتند. سپس به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شدند. از عصاره‌های باکتری در ۲ غلظت (۱و۰/۵) میلی گرم بر میلی لیتر با سه تکرار به عنوان بلانک‌های آزمایش استفاده شد. از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از اسید اسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در نهایت اثر آنتی اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد[1](RSC٪) با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\%RSC=100\times(A_{blank}-A_{sample}/A_{blank}) \qquad \text{رابطه ۱}$$

در این رابطه A_{blank} و A_{sample} به ترتیب میزان جذب بلانک و نمونه می‌باشند. برای مقایسه اثر آنتی اکسیدانی عصاره‌ها، نتایج به دست آمده با مقدار IC_{50}[2] آنتی اکسیدان از بوتیل هیدروکسی تولوئن (BTH) استفاده شد و به عنوان کنترل مثبت مقایسه گردید. برای بررسی متابولیت‌های موجود در عصاره باکتری ها به روش (Chethana et al. 2013) تست های مختلفی انجام گردید. برای تست آلکالوئیدها، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره باکتری با چند قطره لوگول ترکیب گردید. رنگ قرمز مایل به قهوه‌ای نشان دهنده وجود آلکالوئیدها می‌باشد (Mishra Chandra et al. 2011).

برای تست دی ترپن، یک میلی لیتر از عصاره باکتری با ۴–۳ قطره از محلول کوپر استات مس ترکیب گردید. رنگ سبز زمردی نشان دهنده وجود دی ترپن‌ها می‌باشد(Tiwari et al. 2011). برای تست استروئید، دو میلی لیتر از عصاره باکتری با دو میلی لیتر کلروفرم خالص ترکیب شد. سپس دو میلی لیتر از محلول اسید سولفوریک و اسید استیک اضافه گردید. رنگ سبز نشان دهنده وجود استروئیدها می‌باشد (Yadav et al. 2011). برای تست ترپنوئید، ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره باکتری با یک میلی لیتر کلروفرم و یک میلی لیتر اسید سولفوریک ترکیب گردید. رنگ خاکستری نشان دهنده حضور ترپنوئیدها می‌باشد (Yadav et al. 2011). برای تست فلاونوئید، دو میلی لیتر از عصاره باکتری با دو میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۲٪ ترکیب گردید. تغییر

[1] Radical scavenging capacity
[2] Express of the extract concentration causes 50% inhibition

www.SID.ir

Archive of SID

رنگ از زرد پررنگ به بی رنگ با اضافه کردن اسید رقیق نشان دهنده حضور فلاونوئیدها می‌باشد (Yadav et al. 2011). برای تست فنول و تانن، یک میلی لیتراز عصاره باکتری با دو میلی لیتر محلول کلرید آهن ۲٪ ترکیب گردید. رنگ سبز آبی یا سیاه نشان دهنده میزان فنول و تانن می‌باشد (Yadav et al. 2011). برای تست کوئینون و فلاونن، یک میلی لیتر از عصاره باکتری با یک میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ ترکیب شد. رنگ نارنجی و قرمز تیره نشان دهنده وجود کوئینون و فلاونن می‌باشد (Firdouse Seema et al. 2011). برای تست کومارین، یک میلی لیتر از عصاره باکتری به یک میلی لیتر محلول سدیم هیدروکسید ۲٪ اضافه گردید. رنگ زرد نشان دهنده میزان کومارین می‌باشد (Firdouse Seema et al. 2011).

نتایج و بحث

تحقیقات بسیاری در رابطه با جداسازی و شناسایی اندوفیت‌ها از گیاهان مختلف صورت گرفته است اما جداسازی و شناسایی اندوفیت های گیاه دارویی باریجه (*Ferula gummosa boiss*) در ایران برای اولین بار گزارش می گردد. ۲۰ جدایه باکتری از گیاه باریجه جداسازی شد. بر اساس آزمون گرم ۱۰ جدایه گرم مثبت و ۱۰ جدایه گرم منفی بودند. همچنین ۹ جدایه (۴۵ درصد) از جنس Coccuce و ۱۱ جدایه (۵۵ درصد) از جنس Bacillus بودند (جدول ۲).

جدایه باکتری R4 با بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی نسبت به سایر باکتری ها به عنوان باکتری برتر انتخاب گردید. بلا ست توالی مربوط به جدایه (R4) بر پایه شناخت همردیفی 16S rRNA، با شماره د ستیابی (KF465846.1) نشان دهنده شباهت ۹۸ درصدی این جدایه با باکتری *Rahnella aquatilis* بود. این باکتری از خانواده Enterobacteriaceae بوده و توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفر را داشته و می تواند فسفات های معدنی را نیز حل نماید (Kim et al. 1998). از سال ۲۰۰۰، حداقل ۷۰ سویه از این باکتری شناسایی شده است (Chemother et al. 2000).

این گونه تاکنون به عنوان اندوفیت از بذر *Brassica napus* (Granér et al. 2003)، بذر صنوبر نروژی (Cankar et al. 2005) و گونه های مهار کننده بیماری های گیاهی جدا شده از خاک (El-Hendawy et al. 2003) گزارش شده است. همچنین بعنوان یک اینتروباکتری تثبیت کننده نیتروژن از ریزوسفر، فیلوسفر از برگ های *Rosa rugose* گزارش شده است (Hashidoko et al. 2002). باکتری*Rahnella aquatilis* اغلب در ریزوسفر یافت می شود و به شدت با ریشه ها و غده گیاهان ارتباط دارد (Berge et al. 1991; Heulin et al. 1994; Jafra et al. 2009; Rozhon et al. 2010).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. ویژگی باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاه باریجه

Table 2. Characteristics of endophytic bacteria isolated from *Ferula gummosa.boiss*

Type of bacteria نوع باکتری	Geram گرم	Source of extraction منبع استخراج	Assigned code کد اختصاص یافته
Staphylococcus sp.	G^-	غده	GR_1
Bacillus sp.	G^+	غده	GR_2
Coccobacillus	G^-	غده	GR_3
Staphylococcus sp.	G^-	غده	GR4
Streptococcus sp.	G^+	غده	GR_5
Streptococcus sp.	G^+	غده	GR6
Staphylococcus sp.	G^-	غده	GR_7
Bacillus sp.	G^+	غده	GR_8
Bacillus sp.	G^+	غده	GR_9
Staphylococcus sp.	G^-	غده	ER
Bacillus sp.	G^-	پوست ریشه	R_1
Bacillus sp.	G^+	ریشه	R_2
Bacillus sp.	G^+	ریشه	R_3
Bacillus sp.	G^-	ریشه	R_4
Staphylococcus sp.	G^+	بذر	SB_2
Bacillus sp.	G^+	بذر	SB_3
Bacillus sp.	G^-	بذر	SB_4
Bacillus sp.	G^+	بذر	SK_3
Bacillus sp.	G^-	بذر	SK_4
Staphylococcus sp.	G^-	بذر	SK_6

GR: غده ER: پوست ریشه R: ریشه SB: بذر بروجن SK: بذر کاشان

در این پژوهش نیز باکتری*Rahnella aquatilis* از ریشه جدا شد. بررسی باکتری‌های اندوفیت گیاه *Ferula songorica* جنس اندوفیت غالب را متعلق به Brevundimonas، Sphingomonas و Bacillus نشان داد (Yong-Hong et al. 2016). جنس Brevundimonas بر اساس گزارشات بسیاری از خاک نیز گزارش شده است (Yoon et al. 2006;

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir

Archive of SID

(Kang et al. 2009; Wang et al. 2012). جنس Sphingomonas جدا شده از بافت‌های گیاهی بعنوان تنظیم کننده‌های بالقوه رشد محصولات زراعی معرفی شده است (Chen et al. 2014; Khan et al. 2014; Yang et al. 2014; Halo et al. 2015). جنس Bacillus spp جدا شده از بافت گیاهی دارای توانایی بالایی بعنوان عوامل کنترل بیولوژیک و محرک رشد گیاهی گزارش شده است (Kumar et al. 2012).

ارزیابی فعالیت زدودن رادیکال آزاد توسط عصاره باکتری‌های اندوفیت جداشده از گیاه باریجه با استفاده از رادیکال آزاد DPPH انجام شد. بر اساس مقدار IC_{50} آنتی اکسیدان کمتر از ۱۰، کمتر از۱۰۰ و بیش از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب نمونه قوی، متوسط و غیر فعال گروه بندی شد (Minami et al. 1994) (شکل های ۱ و ۲). تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرعصاره و غلظت و اثر متقابل آن‌ها بر مقادیر درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در سطح ۱ درصد معنی دار بود (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر آنتی اکسیدانی عصاره باکتری‌های جداشده از گیاه باریجه

Table 3. Analysis of variance of antioxidant effect of bacterial extract isolated from *Ferula gummosa boiss*

منبع تغییرات Source of Variation	درجه آزادی df	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F
عصاره Extract	19	3.61	0.19	2830.85**
غلظت Concentration	1	0.35	0.135	5243.21**
عصاره×غلظت Extract × Concentration	19	0.26	0.01	207.79**
خطا Error	78	0.0052	0.000067	
کل Total	119	4.24		

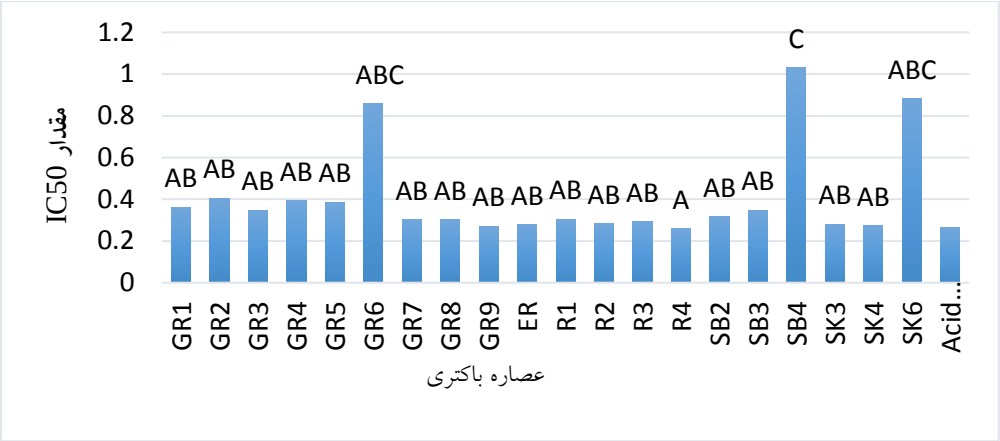
***و** به ترتیب معنی داری در سطح احتمال یک و پنج درصد**

Ns:Non significant

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که عصاره باکتری‌های R_4 و GR_9 و SK_4 و ER و SK_3 و R_2 و R_3 و GR_7 و R_1 و GR_8 و SB_2 و SB_3 و GR_3 و GR_1 و GR_5 و GR_4 و GR_3 دارای بیشترین اثر آنتی اکسیدانی بوده و باکتری‌های GR_6 و SK_6 دارای کمترین اثر بودند. باکتری SB_4 فاقد اثر آنتی اکسیدانی بوده و در گروه سوم قرار گرفت.



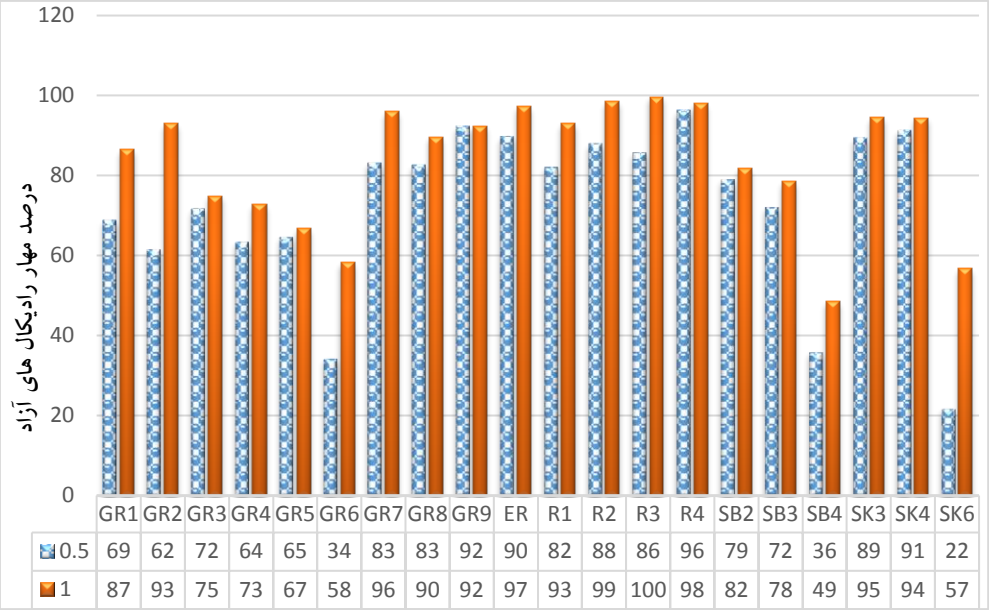
شکل ۱- نمودار مقایسه میانگین مقادیر IC50 عصاره باکتری‌های جداشده از گیاه باریجه در برابر اسید اسکوربیک

Figure 1. Mean comparison of IC50 of bacterial extract, isolated from *Ferula gummosa boiss* against ascorbic acid

در این میان، میزان خاصیت آنتی اکسیدانی باکتری R_4 تقریبا برابر با اسیداسکوربیک نشان داده شد. همانطور که گفته شد، اندوفیت های این گیاه تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است اما براساس گزارشات موجود، اسانس دانه باریجه خاصیت ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی نشان داده است (Eftekhari 2004). همچنین در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره هیدروالکلی گل، ساقه و برگ باریجه برداشت شده از ارتفاعات استان مازندران، بیشترین مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در برگ و کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی، فنل کل و فلاونوئید کل در ساقه باریجه مشاهده شده است. در بررسی عصاره گل باریجه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر اندام‌ها گزارش شده است (Zeinali et al. 2014). باکتری های اندوفیتی که از گیاهان دارویی شمال شرقی هند جداسازی شده اند، خواص آنتی اکسیدانی بالایی نشان داده‌اند (Nongkhlaw et al. 2015). همچنین طی آزمایش زنگ و همکاران نشان داده شد که ۱۰ باکتری اندوفیت جدا شده از گیاه *Myricaria laxiflora* دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی بودند (Wen et al. 2015).

www.SID.ir

Archive of SID



	GR1	GR2	GR3	GR4	GR5	GR6	GR7	GR8	GR9	ER	R1	R2	R3	R4	SB2	SB3	SB4	SK3	SK4	SK6
0.5	69	62	72	64	65	34	83	83	92	90	82	88	86	96	79	72	36	89	91	22
1	87	93	75	73	67	58	96	90	92	97	93	99	100	98	82	78	49	95	94	57

شکل ۲- نمودار درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره باکتری ها جداشده از گیاه باریجه. محور عمودی نمودار، درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره باکتری ها و محور افقی، عصاره باکتری ها در دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر می‌باشد.

Figure 2. The percentage chart of inhibition of DPPH free radicals by bacterial extract isolated from *Ferula gummosa boiss*

باکتری اندوفیت Lactobacillus sp. جدا شده از برگ های گیاه گزانگبین به علت ترکیبات فنلی بالا دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی خوبی تشخیص داده شد (Swarnalatha et al. 2015). بنابراین علاوه بر اینکه طبق گزارشات مختلف قبلی، اندامهای مختلف این گیاه دارای خواص آنتی اکسیدانی می باشند، نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که باکترهای اندوفیت این گیاه نیز همانند بعضی از گیاهان بررسی شده دیگر، دارای خواص آنتی اکسیدانی بوده و شاید بتوان از آنها برای تکثیر مواد موثره مورد نظر استفاده نمود. با توجه به نتایج فیتوشیمیایی باکتری‌ها، ترکیبات آلکالوئید در عصاره باکتری‌های GR_1، GR_3، R_1، R_2، R_3، R_4 و SK_4 ترکیبات دی ترپن در عصاره باکتری‌های GR_1، GR_2، GR_3، GR_5، GR_6، GR_7، GR_8، R_1، R_2، R_3، R_4، SB_3، SB_4، SK_3 و ترکیبات استروئید در عصاره باکتری‌های GR_5، R_1، R_2، R_3، R_4، SB_3، SB_4 و ترکیبات ترپنوئید در عصاره باکتری‌هایGR_1، GR_5، GR_7، R_3، R_4، SB_3، SB_4، SK_4، SK_6 و ترکیبات فلاونوئید در عصاره باکتری‌های GR_2،GR_5، ER، R_2، R_3، SB_3،SK_3، SK_4، SK_6 و ترکیبات فنول و تانن در عصاره باکتری‌های GR_9، R_2، R_3، R_4، SK_3، SK_4، SK_6 و ترکیبات کوئینون در عصاره باکتری‌های GR_1، GR_7، ER، R_2، R_3، R_4، SB_4 و ترکیبات فلاونن در عصاره باکتری‌های GR_1،

www.SID.ir

Archive of SID

GR_7، ER، SB_3،R_1 و ترکیبات کومارین در عصاره باکتری‌های GR_4، GR_5، ER، R_2، R_3،SB2 ، SB_3، SK_4، SK_6 مشاهده گردید (جدول ۴).

جدول ٤- ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره باکتری های اندوفیت جدا شده از گیاه باریجه

Table 4. Phytochemical compounds of endophytic bacterial extract isolated from *Ferula gummosa boiss*

Bacterial extract	Coumarin	flavone	Quinon	Phenol and tannin	Flavonoid	Terpenoid	Steroid	Diterpene	Alkaloid
GR_1	-	+	+	-	-	+	-	+	+
GR_2	-	-	-	-	+	-	-	+	-
GR_3	-	-	-	-	-	-	-	+	+
GR_4	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GR_5	+	-	-	-	+	+	+	+	-
GR_6	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GR_7	-	+	+	-	-	+	-	+	-
GR_8	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GR_9	-	-	-	+	-	-	-	-	-
ER	+	+	+	-	+	-	-	-	-
R_1	-	+	-	-	-	-	+	+	+
R_2	+	-	+	+	+	-	+	+	+
R_3	+	-	+	+	+	+	+	+	+
R_4	-	-	+	+	-	+	+	+	+
SB_2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SB_3	+	+	-	-	+	+	+	+	-
SB_4	-	-	+	-	-	+	+	+	-
SK_3	-	-	-	+	+	-	-	+	-
SK_4	+	-	-	+	+	+	-	+	+
SK_6	+	-	-	+	+	+	-	-	-

برطبق اطلاعات موجود، اندوفیت‌ها به علت داشتن مواد شیمیایی گیاهی مختلفی مانند ساپونین ها (Kanna and Kannabiran et al. 2008)، ترکیبات فنولیک (Pelczar et al. 1988; Lai et al. 2010)، استروئیدها (Kalyoncu et al. 2009)، گلیکوزیدها (Rohaya et al. 2005)، و تانن ها (Kaur and Arura 2009; Zhang and Lin 2008) به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان مواد دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی قوی شناخته شده اند. فنل‌ها و آلکالوئیدها ترکیبات عمده فیتوشیمیایی اندوفیت ها هستند. یک رابطه خطی بین محتوای فنلی کل و پتانسیل آنتی اکسیدانی هر نمونه وجود دارد (Sultana et al. 2007). توانایی فنول در مهار رادیکال آزاد را می‌توان به فعالیت گروه‌های هیدروکسیل نسبت داد.

نتیجه گیری

طبق گزارشات موجود، اندوفیت های گیاهان دارویی، دارای ترکیبات زیستی موثری می باشند. برای بررسی خواص زیستی باکترهای اندوفیت گیاه باریجه، در این پژوهش ۲۰ جدایه باکتری از غده و بذر دو اکوتیپ این گیاه از بروجن و کاشان جداسازی گردید. اندوفیت‌های جداسازی شده دارای خواص آنتی اکسیدانی متفاوتی بودند و باکتری R_4 که با بررسی مولکولی به عنوان *Rahnella aquatilis* شناسایی گردید، دارای بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی در بین باکتری های جدا شده بود. حضور ترکیبات فنولی نیز در این جدایه، نشان داده شد. خاصیت آنتی اکسیدانی این باکتری و حضور ترکیبات فنولی را می توان به رابطه خطی بین پتانسیل آنتی اکسیدانی و محتوای فنول نسبت داد. بیشترین گزارشات از این سویه باکتری نشان می دهد که اغلب در ریزوسفر یافت می شود و به شدت با ریشه ها و غده گیاهان ارتباط دارد. گزارشات متعددی مبنی بر تثبیت ازت و حل کردن فسفات معدنی توسط این باکتری وجود دارد. انجام تحقیقات بیشتر برای استفاده از این باکتری به عنوان محرک رشد و تثبیت ازت خاک لازم می باشد.

References

Arnold AE, and Herre EA (2003) Canopy cover and leaf age effect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in Theobroma cacao(Malvaceae). Mycol 95, 388-398.

Bhagobaty RK, Joshi SR (2012) Antimicrobial and antioxidant activity of endophyticfungi isolated from ethnomedicinal plants of the "Sacred forests" of Meghalaya. India Mikologia Lekarska 19, 5-11.

Castillo UF, Browne L, Strobel G et al. (2007) Biologically active endophytic Streptomycetes from Nothofagus spp. and other plants in Patagonia. Microb Ecol 53,12-19.

Chen B, Zhang Y, Rafiq MT et al. (2014) Improvement of cadmium uptake and accumulation in Sedum alfredii by endophytic bacteria Sphingomonas SaMR12: effects on plant growth and root exudates. Chemosphere 117, 367–373.

Ebrahimzadeh MA, Nabavi SM (2011) Antioxidant activity of hydroalcholic extract of Ferula gummosa boiss roots. Eur Rev Med Pharmocal Sci 15, 658-64.

El-Hendawy HH, Osman ME, Sorour NM (2003) Characterization of two antagonistic strains of Rahnella aquatilis isolated from soil in Egypt. Folia Microbiol (Praha) 48, 799–804.

www.SID.ir

Archive of SID

Nongkhlaw FM, W, Joshi SR (2015) L-Asparaginase and antioxidant activity of endophyte associated with ethnomedicinal plants. Indian Journal of Biotechnology 14, 59-64.

Ganapathi J, Subban K, Kannan K, Johnpaul M (2011) Antimicrobial and antioxidant activity of the endophytic fungus Phomopsis sp. GJJM07 isolated from Mesua ferrea. INT J CURR SCI 1, 85-90.

Granér G, Persson P, Meijer J, Alström S (2003) A study on microbial diversity in different cultivars of Brassica napus in relation to its wilt pathogen, Verticillium longisporum. FEMS Microbiol Lett 224, 269–276.

Halo BA, Khan AL, Waqas M et al. (2015) Endophytic bacteria (Sphingomonas sp. LK11) and gibberellin can improve Solanum lycopersicum growth and oxidative stress under salinity. J Plant Interact 10, 117–125.

Kang SJ, Choi NS, Choi JH et al. (2009) Brevundimonas naejangsanensis sp. nov., a proteolytic bacterium isolated from soil, and reclassification of Mycoplana bullata into the genus Brevundimonas as Brevundimonas bullata comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 59, 3155–3160.

Katarina C, Hojka K, Maja R, Maja R (2005) Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (Picea abies L. Karst). FEMS Microbiology Letters 244(2), 341–345.

Kaur GJ, Arora, DS (2009) Antibacterial and Phytochemical Screening of Anethum graveolens, Foeniculum vulgare and Trachyspermum ammi. BMC Complementary and Alternative Medicine 9 Article 30.https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-30

Khan AL, Waqas M, Kang SM et al. (2014) Bacterial endophyte Sphingomonas sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. J Microbiol 52, 689–695.

Kim, KilY, Diann J, Hari BK (1997) Rahnella aquatilis, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. FEMS Microbiology Letters 153, 273-277.

Lin T, Zhao l, Yang Y et al. (2013) Potential of endophytic bacteria isolated from Sophora alopecuroides nodule in biological control against Verticillium wilt disease. AJCS 7, 139-146.

Mejía LC, Rojas Z, Maynard S et al. (2008) Endophytic fungi as biocontrol agents of Theobroma cacao pathogens. Biol Control 46, 4-14.

Miller JD (1986) Toxic metabolites epiphytic and endophytic fungi of conifer needles. Microbiol. Phyllosphere. Cambridge University Press, Cambridge. 223-231.

Partida Martinez LP, Hertweck C (2005) Pathogenic fungus harbours endosymbiotic bacteria for toxin production. Nature 6, 884-888.

www.SID.ir

Pimentel MR, Molina G, Dion isio AP et al. (2011) The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. Biotechnol Res Int 11. Biotechnology Research International Volume 2011, Article ID 576286, 11 pages

Rohaya A, Abdul Manaf A, Daud AI et al. (2005) Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some Hedyotis species. Life Sci 76, 1953-1964.

Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory Guidefor Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3nd. Ed.APS Press, St. Paul, MN, USA. Plant Pathology 50, 812±814

Sultana B, Anwar F, Przybylski R (2007) Antioxidant activity of phenolic components present in barks of Azadirachta indica. Terminalia arjuna, and Eugenia jambolana Lam. trees. Food Chemistry 104, 1106-1114.

Swarnalatha Y, Saha B, Choudary L, Bioactive Y (2015) compound analysis and antioxidant activity of endophytic bacterial extract from Adhathoda beddomei. Asian J Pharm Clin Res 8, 70-72.

Wang Y, Xu L, Ren W et al. (2012) Bioactive metabolites from Chaetomium globosum L18, an endophytic fungus in the medicinal plant Curcuma wenyujin. Phytomedicine 19, 364 368.

Wen Z, Ting W, Wei J et al. (2015) Endophytic Bacteria from Myricaria laxiflora Before- and After- Flooding Stress and the Antioxidant Activity. Am J Microbiol Biotechnol 2, 1-5.

Yang S, Zhang X, Cao Z et al. (2014) Growth-promoting Sphingomonas paucimobilis ZJSH1 associated with Dendrobium officinale through phytohormone production and nitrogen fixation. Microb Biotechnol 7, 611–620.

Yasuyuki H, Eriko I, Kentaro Y et al. (2002) Characterization of five Phyllosphere Bacteria Isolated from Rosa rugose Leaves, and Their Phenotypic and Metabolic Properties. Biotechnol Biochem 66, 2474-2478.

Yong-Hong L, Jian-WG, Nimaichand S et al. (2016) Culturable endophytic bacteria associated with medicinal plant Ferula songorica: molecular phylogeny, distribution and screening for industrially important traits. Biotechnol 6, 209 DOI 10.1007/s13205-016-0522-7.

Zeynali Z, Hemati KH, Mazandarani M, ASsghari ZH (2014) August Ecology, Ethnofarmacology, Phytochemical and Antioxidant Effects of Extract of Different Organs of Ferula Gummosa Boiss in Two Different Locations of Khorasan Razavi Province. J Ecophytochem Med Plant 1, 11-22.

Zhou, X, Zhu, H, Liu, L et al. (2010) recent advances and future prospects of taxol –producing endophytic fungi. Microbiol Biotechnol 86, 1707-1717.

www.SID.ir

Archive of SID

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500
www.SID.ir