Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Study on the presence of extracellular enzymes in culture of endophytic fungi isolated from the euphorbia esula L. and chenopodium album L.

Mahsa Bakhshiani

M. sc. Graduate, Department of Biotechnology, Fac. of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran, Email: mahsabakhshiani69@gmail.com

Sonbol Nazeri

*Corresponding Author, Assistant Professor, Department of Biotechnology, Fac. of Agricuture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran, Email: snblnazeri@yahoo.com

Dust Morad Zafari

Associate Professor, Department of Plant Protection, Fac. of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran, Email: zafari_d@yahoo.com

Sara Mahdian

Ph.D. student, Department of Plant Protection, Fac. of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran, Email: sara.mahdian89@yahoo.com

Abstract

Background

Enzymes are noble metabolites which extensively utilize in different industries. Currently, the production of enzymes by microorganisms is one of the best and most effective methods for the production of these enzymes. Hydrolytic enzymes are one of the most important enzymes that produced by various microorganisms, including endophytes.

Materials and methods

In order to investigate the presence of endophytic fungi from two plants Euphorbia esula L. and Chenopodium album L, in summer of 1395, six different plants parts including flowers, leaves, seeds, roots, crowns and stems were sampled from healthy plants in Hamadan province. After fungal purification, the presence of extracellular hydrolytic

enzymes such as amylase, catalase, protease, cellulase, pectinase, and xylanase were investigated by adding the corresponding substrate in the endophytic fungal culture medium.

Results

After sterilizing the surface of collected plants and transferring samples to Potato Dextrose Agar culture media, a total of 31 endophytic fungi were isolated. The results showed that 84% of fungal isolates had amylase, 81% catalase, 71% protease, 61% cellulase, 39% pectinase and 26% xylanase activity. Morphological studies of the isolated fungi showed that some them belongs to the Fusarium, Alternaria and Trichoderma spp.

Conclusion

The results obtained in this study showed that endophytic fungi isolated from Euphorbia esula L. and Chenopodium album L, plants are capable of in vitro production of various enzymes. Among them, the presence of important enzymes like cellulase, pectinase and protease in some isolates, emphasis the significance of results. Based on the vast application and magnitudes of these enzymes in different industries, the importance of these fungi and demands for more experiments on enzyme activity are specified.

Keywords: Euphorbia esula L, Chenopodium album L, endophyte, enzyme, secondary metabolites

Citation: Bakhshiani M, Nazeri S, Zafari D, Mahdian S (2020) Study on the Presence of Extracellular Enzymes in Culture of Endophytic Fungi Isolated from the Euphorbia esula L. and Chenopodium album L. Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 139-156.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 139-156.
DOI: 10.22103/jab.2020.15047.1187
Received: August 11, 2020; Accepted: September 22, 2020

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

بررسی حضور آنزیم‌های خارج سلولی در کشت قارچ‌های اندوفیت جدا شده از دو گیاه فرفیون و سلمه تره

مهسا بخشیانی: دانش آموخته کارشناسی ارشد ، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
mahsabakhshiani69@gmail.com

سنبل ناظری *: نویسنده مسئول، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
Snblnazeri@yahoo.com

دوستمراد ظفری: دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
zafari_d@yahoo.com

سارا مهدیان: دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
sara.mahdian89@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۱

چکیده

مقدمه: آنزیم‌ها، متابولیت‌های با ارزش میکروبی هستند که در صنایع مختلف کاربرد وسیعی دارند. در حال حاضر تولید آنزیم‌های خارج سلولی توسط میکروارگانیسم‌ها، یکی از بهترین و موثرترین روش‌ها به منظور تولید صنعتی این آنزیم‌ها است. آنزیم‌های هیدرولازی از مهمترین این آنزیم‌های خارج سلولی هستند. که توسط میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله قارچ‌های اندوفیت‌ها، تولید می گردند.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی اندوفیت‌های دو گیاه فرفیون و سلمه‌تره، در تابستان۱۳۹۵، از شش بافت مختلف گل، برگ، بذر، ریشه، طوقه و ساقه ی گیاهان سالم دو منطقه استان همدان نمونه برداری صورت گرفت. پس از جدا و خالص سازی، قارچ‌های اندوفیت حضور آنزیم‌های هیدرولازی خارج سلولی آمیلاز، کاتالاز، پروتئاز، کازئیناز، سلولاز، پکتیناز و زایلاناز با اضافه کردن سوبسترای مربوطه در محیط کشت قارچ بررسی گردید.

نتایج: پس از استریل سطحی و انتقال نمونه‌ها به محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار، مجموعاً از دو گیاه فرفیون و سلمه تره، 31 جدایه قارچ اندوفیت جداسازی شد. نتایج نشان داد: ۸۴ درصد از جدایه‌های قارچی دارای فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی آمیلاز، ۸۱ درصد کاتالاز، ۷۱ درصد فعالیت پروتئاز، ۶۱ درصد سلولاز، ۳۹ درصد پکتیناز و ۲۶ درصد زایلاناز بودند. بررسی‌های مورفولوژیکی قارچ‌های جدا شده نشان داد که برخی از این قارچ‌ها متعلق به جنس‌های فوزاریوم، آلترناریا و تریکودرما بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد که قارچ‌های اندوفیت جدا شده ازدو گیاه سلمه تره و فرفیون قادر به تولید انواع آنزیم های هیدرولیزی در شرایط آزمایشگاهی را داشتند. در این میان، حضور آنزیم های مهمی مانند سلولاز، پکتیناز و

پروتئاز در تعدادی از جدایه ها، اهمیت نتایج این تحقیق را بیشتر میکند. با توجه به کاربرد وسیع ایـن آنـزیم‌هـا و اهمیتـی کـه در صنایع مختلف دارند ، اهمیت این قارچ‌ها و نیاز به بررسی بیشتر بر روی عملکرد آنزیمی آنها مشخص می گردد.

کلمات کلیدی: فرفیون، سلمه تره، اندوفیت، آنزیم، متابولیت ثانویه

مقدمه

آنزیم‌ها، کاتالیست‌های زیستی شناخته شده‌ای هستند که واکنش‌های شیمیایی بسیاری را کاتالیز می‌کنند و به طور تجاری در صنایع مختلفی از قبیل صنایع شوینده، غذا، دارو، تشخیص بیماری‌ها و غیره به کار می‌روند. به دلیل استفاده صنعتی از آنزیم‌ها، تولید در مقیاس بالا با بیشترین میزان فعالیت و پایداری و نیز کمترین هزینه از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا استفاده از روش‌های موثر جهت دستیابی به این اهداف همیشه مورد توجه قرار گرفته است. در حال حاضر استفاده از بیوتکنولوژی و تولید توسط میکروارگانیسم‌ها یکی از بهترین و موثرترین روش‌ها به منظور تولید صنعتی این آنزیم‌ها است (Colin et al. 2010).آنزیم‌ها از اجزای ضروری تشکیل دهنده همه اشکال حیات بر روی زمین شامل پروکاریوت‌ها، قارچها، گیاهان و حیوانات می‌باشند. در این میان میکروارگانیسم‌ها به دلیل رشد سریع، نیاز به فضای محدود برای کشت و قابلیت دستکاری ژنتیکی آسان به منظور تولید آنزیم‌های جدید با خواص متفاوت منابع ترجیحی تولید پروتئازها هستند. پروتئازها از مهم‌ترین آنزیم‌های صنعتی جهان هستند که تقریبا ۶۰ درصد فروش آنزیم‌های دنیا به آنها اختصاص دارد (Madureira et al. 2007). پروتئازها، در سنتز پپتید، فرآوری پروتئین‌ها، صنایع غذایی، صنایع چرمسازی، صنایع دارویی، صنایع لبنی و دترژان‌های صنعتی کاربرد فراوانی دارند (Gupta et al. 2005). آنزیم‌های هیدرولیز کننده کربوهیدرات گروه بزرگی از آنزیم‌ها هستند که در نانوایی، صنایع تبدیلی نشاسته و نساجی کاربرد دارند. اگر چه بسیاری از گیاهان، جانوران و میکروارگانیسم‌ها توانایی تولید آنزیم آمیلاز را دارند ولی این آنزیم با منشاء میکروبی دارای مصارف صنعتی بالایی است (Zhang et al. 2014).

پکتینازها از دیگر آنزیم‌های مهم هستند که به طور گسترده در باکتری‌ها، قارچها و گیاهان توزیع شده است (Kaboosi et al. 2014). این آنزیم‌ها کاربردهای فراوانی در استخراج آبمیوه، استخراج روغن، غذای دام، خالص‌سازی ویروس‌های گیاهی، استفاده در صنعت کاغذ سازی، تخمیر چای و قهوه، خیساندن و نرم کردن فیبرهای گیاهی، پاک کردن زیستی فیبرهای پنبه در فرآیندهای نساجی دارند (Semenova et al. 2003; Viikari et al. 2001). سلولازها، آنزیم‌هایی هستند که قادرند پیوندهای گلیکوزیدی در سلولز را بشکنند. هیدرولیز سلولز به دو روش شیمیایی و آنزیمی صورت می‌گیرد. هیدرولیز شیمیایی توسط اسیدها و هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم‌های سلولازی می‌باشد که توسط میکروارگانیسم‌های مختلف تولید می‌گردد. با توجه به مشکلات هیدرولیز اسیدی سلولز، محققان توجه بیشتری به هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم‌های سلولازی معطوف کرده‌اند (Bayer et al. 2007). آنزیم سلولاز دارای کاربردهای متعددی است که از آن جمله می‌توان به استفاده از آن در صنعت نساجی جهت نرم

کردن و رنگ زدن پارچه‌های کتانی، در تولید دترجنت‌ها به منظور حفظ رنگ، پاک سازی بهتر، در صنایع غذایی به منظور خیساندن، و استفاده در کاغذ سازی و نیز کاربرد در زمینه داروسازی اشاره کرد (Moghimi et al. 2010).

در گستره میکروارگانیسم‌ها، اندوفیت‌ها قادر به تولید انواع آنزیم‌های هیدرولازی از جمله پروتئازی یا سلولازی هستندکه در ایجاد مکانیسم‌های سازگاری و دفاعی نقش بازی می‌کنند (Tan & Zou 2001). اندوفیت‌ها، میکروارگانیسم‌های همزیست گیاه، تقریبا از تمام بافت‌های گیاهی جدا شده‌اند، گزارشاتی نیز مبنی بر اختصاصی بودن اندام‌ها و بافت‌ها وجود دارد. در این محیط، گیاهان میزبان محصولات فتوسنتزی و مواد معدنی را برای رشد طبیعی خود تولید می‌کنند، و اندوفیت‌ها به طور مستقیم رشد و حفاظت شیمیایی از گیاه میزبان را با تولید متابولیت‌های ارزشمند و یا انتقال ژن‌های مربوطه به ژنوم میزبان فراهم می کنند (Thongsandee et al. 2013). اندوفیت‌ها می‌توانند، نقش مهمی در سازگاری و مورفوژنز گیاهان میزبان بازی کرده و به عنوان مدافع در برابر شکارچیان، محرک رشد و رقبای عوامل بیماریزای میکروبی و یا پاتوژن‌های نهفته عمل کنند. در سال‌های اخیر مطالعه تنوع زیستی، فعالیت شیمیایی و زیستی متابولیت‌های اندوفیت و رابطه‌ی بین اندوفیت و گیاه میزبان آنها، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Scannerini et al. 2001). مطالعات همچنین نشان داده است که می‌توانند به عنوان منابع بالقوه، برای بهره‌برداری در پزشکی، کشاورزی و صنعت مورد استفاده قرار گیرند. یکی از مواردی که این میکروارگانیسم‌ها را مورد توجه قرار داده است، تولید متابولیت‌هایی مشابه با میزبان است. بسیاری از این ترکیبات به علت کاربردهای پزشکی مورد توجه قرار گرفته اند. از این میان وجود خواص ضد ویروس، ضد سرطان و ضد دیابت در این متابولیت ها ثابت شده است (Asgharian 2010). پژوهش حاضر با هدف جداسازی، مطالعه و بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی توسط قارچ‌های اندوفیت دو گیاه فرفیون و سلمه تره صورت گرفت. فرفیون با نام علمی .Euphorbia esula L گیاهی یکساله و علفی متعلق به خانواده Euphorbiaceae است. دارای گل‌های نر یک پرچمی با میله زانودار، گل‌های ماده با تخمدان سه برچه‌ای، گل آذین سیاتیوم و میوه کپسول سه قاب است. لاتکس شاید برجسته‌ترین محصول فرفیون باشد که درون گیاه به واسطه یکسری لوله‌های مشتق از یک سلول یا لوله‌های شیرابه‌ای بندبندی توزیع می‌شود (Nazemiyeh et al. 2010). ترکیباتی که به عنوان استرترپن شناسایی می‌شوند، در این گیاه متداول بوده و اغلب علت سوزش‌ها و تحریکات شدید در اثر تماس مستقیم با پوست است (Tyler et al. 1988). مطالعات Domsalla و Melzig (2008) نشان داد در لاتکس ۱۸ گونه از جنس فرفیون، آنزیم‌های پروتئولیزی جدا شده است، که ۹ آنزیم از آن‌ها به عنوان سرین‌اندوپپتیداز شناخته شده است. سلمه‌تره با نام علمی Chenopodium album L گیاهی یکساله و علفی متعلق به خانواده Chenopodiaceae و بومی آسیای غربی است. این گیاه به وسیله بذر تکثیر می‌یابد. ساقه آن حالت ایستاده داشته و دارای تعدادی انشعابات فرعی است و ارتفاع آن بر حسب آب و هوا و نوع خاک تغییر می‌کند و گاهی تا یک متر می‌رسد. سطح زیرین برگ‌ها به رنگ سفید می‌باشد. برگ‌ها دارای دمبرگ بلندی بوده و شکل آن‌ها تخم مرغی و دندانه‌دار است، برگ‌های قسمت فوقانی گیاه باریک‌تر و غالباً حاشیه آن‌ها صاف است. کرک‌های سفید رنگی، برگ و ساقه‌های این گیاه را پوشانده

است. ریشه‌های این علف هرز به دلیل داشتن انشعابات فراوان گسترش زیادی دارد. گل‌ها در انتهای ساقه اصلی یا انشعابات آن قرار داشته و گل‌آذین آن هرمی شکل است. دارای بذرهای سیاه براق و به اندازه ۰/۷ تا ۱/۵ میلی‌متر است (Guha et al. 1999). این گیاه عموماً به عنوان علف‌هرز در مزارع گندم و دیگر محصولات زراعی رشد می‌کند. گزارشات نشان داده است که این گیاه در درمان بی اشتهایی، سرفه، اسهال، اسهال خونی و بواسیر مفید است (Rashed Mohassel et al. 2001).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: نمونه‌های گیاهی در دو نوبت مرداد و شهریور ۱۳۹۵، از منطقه حیدره و شهرستان رزن در استان همدان جمع آوری شدند. نمونه‌ها از قسمت‌های سالم گیاه شامل: برگ، ساقه، ریشه، طوقه، بذر و گل انتخاب شدند و درون پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان انتقال یافتند.

جداسازی اندوفیت: جهت از بین بردن قارچ‌های سطحی، استریل‌سازی با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت چهار دقیقه و اتانول ۹۶ درصد یک دقیقه صورت گرفت (Kumar et al. 2015). نمونه‌ها با آب مقطر استریل شستشو و سپس به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتیمتر تقسیم شدند. قطعات فوق بر روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار[1] قرار داده شدند تا امکان رشد اندوفیت‌ها فراهم گردد. محیط‌های کشت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. قارچ‌های رشد یافته بر سطح نمونه گیاهی، به روش نوک هیف خالص سازی شدند (Miao et al. 2009). نمونه‌های میکروارگانیسم برای نگهداری میان مدت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت تحریک اسپورزایی قارچ‌های اندوفیت و شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی، هر یک از جدایه‌ها بر روی محیط‌های کشت برگ میخک آگار[2]، هویج سیب زمینی آگار[3] و سنتتیک نوترینت آگار[4] (شامل: پتاسیم فسفات ۱ گرم، پتاسیم نیترات ۱ گرم، منیزیم سولفات ۰/۵ گرم، پتاسیم کلراید ۰/۵ گرم، گلوکز ۰/۲ گرم، ساکارز ۰/۲ گرم و آگار ۲۰ گرم) کشت داده شدند. تهیه اسلاید و رنگ آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو[5] صورت گرفت. بر اساس کلید های شناسایی Gams and Bissett (1998) و Leslie (2006) مشخصات میکروسکوپی جدایه‌ها شامل نوع میسلیوم، فیالیدها، اسپورها، کنیدی، ماکروکنیدی و کنیدیوفورها با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی ۱۰۰x بررسی گردید.

تولید آنزیم‌ها: بررسی آنزیم خارج سلولی تولید شده توسط قارچ‌های اندوفیت با استفاده از تکنیک‌های کیفی محققان را قادر می‌سازد تا تعداد زیادی قارچ اندوفیتی را به عنوان منبع بیوتکنولوژی تولید آنزیم درکوتاه ترین زمان معرفی نمایند. در این

[1] Potato Dextrose Agar
[2] Clove Leaf Agar
[3] Potatoes Carrot Agar
[4] Synthetic Nutrient Agar
[5] Lactophenol Cotton Blue

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

پژوهش تولید و فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی آمیلاز، پروتئاز، کازئیناز، سلولاز و کاتالاز توسط قارچ‌های اندوفیت جداشده مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا پرگنه‌های موردنظر بر روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار کشت و پس از ۶ تا ۷ روز قطعه‌ی پنج میلی متری از انتهای پرگنه به محیط کشت پپتون آگار[6] (شامل: پپتون ۱۰ گرم، کلرید کلسیم ۵ گرم، سدیم کلراید ۰/۱ گرم، آگار ۱۵ گرم) حاوی سوبستراهای آنزیمی، انتقال داده شدند. pH محیط کشت، در محدوده ۶/۸ تا ۷ تنظیم شد. کلنی‌ها پس از کشت در دمای ۲۶-۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت سه تا پنج روز انکوبه شدند.

آمیلاز: فعالیت آنزیم آمیلاز کلنی‌های قارچ، در محیط پپتون آگار همراه با یک درصد نشاسته ذرت مورد بررسی قرار گرفت. بعد از انکوباسیون محیط در معرف ید غوطه‌ور شد. بعد از چند دقیقه هاله‌ی شفاف مبنی بر وجود آنزیم آمیلاز ظاهر شد (Patil et al. 2015).

پروتئاز: محیط کشت پپتون آگار به همراه یک درصد ژلاتین برای تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز مورد استفاده قرار گرفت. پس از انکوباسیون، تخریب ژلاتین به وسیله معرف کلرید جیوه[7] با ایجاد هاله‌ی شفاف اطراف کلنی‌های قارچ مشاهده شد (Hankin et al. 1975).

کازئیناز: برای ارزیابی کیفی فعالیت آنزیم کازئیناز مخلوط محیط کشت پپتون آگار و یک درصد اسکیم میلک[8] تهیه و اتوکلاو شد. پس از کشت کلنی قارچ و سپری شدن زمان برای رشد مناسب، پلیت‌ها در معرف کلرید جیوه غوطه‌ور گردید. بعد از گذشت چند دقیقه هاله‌ی شفاف اطراف کلنی‌های قارچ و باکتری ظاهر شد (Hankin et al. 1975).

سلولاز: کلنی قارچ‌ها در محیط کشت یست اکسترکت پپتون[9] همراه با یک درصد کربوکسی متیل سلولز[10] کشت و تا رشد مناسب انکوبه شدند. هاله‌ی شفاف اطراف کلنی با استفاده از معرف کنگورد[11] و سپس آب‌شویی با محلول سدیم کلرید[12] یک مولار، ظاهر شد (Molina et al. 2012).

کاتالاز: کلنی قارچ‌ها در محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار کشت و به مدت چهار روز انکوبه شدند. برای انجام تست کاتالاز در لوله‌های آزمایش مقدار دو میلی لیتر آب کسیژنه[13] ریخته شد. پس از رشد مناسب از هر قارچ یک قطعه ۱×۱ میلی متر

[6] Peptone Agar
[7] $HgCl_2$
[8] Skim Milk
[9] Yeast extract peptone
[10] Carboxy methyl cellulose
[11] Congo red
[12] NaCl

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

مربع جدا شده و درون لوله آزمایش حاوی آب اکسیژنه منتقل شد. تشکیل حباب در سطح قارچ بیانگر فعالیت آنزیم کاتالاز بود (Devi et al. 2012).

پکتیناز: فعالیت آنزیم پکتیناز با رشد کلنی قارچ برروی محیط کشت پیتون آگار به همراه یک درصد پکتین[14] مورد بررسی قرار گرفت. بعد از انکوباسیون و رشد مناسب کلنی قارچ، محیط در معرف کنگورد غوطه‌ور شد. هاله‌ی شفاف به رنگ زرد نشان دهنده وجود فعالیت آنزیم پکتیناز در نظر گرفته شد (Yadav et al. 2015).

زایلاز: برای ارزیابی فعالیت آنزیم زایلاز کلنی قارچ بر روی محیط‌کشت یست مالت آگار[15] به همراه یک درصد پودر چوب ذرت به عنوان منبع زایلن[16]، کشت شد. پس از زمان مناسب انکوباسیون، معرف کنگورد به پلیت‌ها اضافه شد. پس از چند دقیقه، برای نمایان شدن هاله‌های زرد روشن اطراف کلنی، پلیت‌ها با استفاده از محلول نمکی شستشو داده شد. ظهور هاله پس از چند دقیقه تا یک روز (بسته به مورد آزمایش) بررسی شد (Yadav et al. 2015).

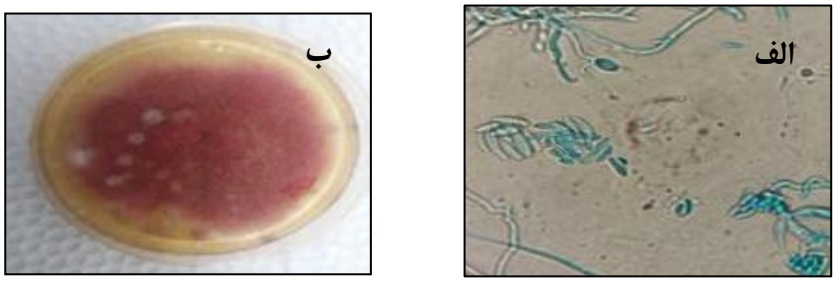
بررسی آماری: نتایج آنزیمی، نمونه ها که شناسایی آنها کامل تر صورت گرفته بود، جهت بررسی آماری انتخاب شدند. نتایج میانگین قطر هاله های اطراف پرگنه قارچ به صورت نمودار مقایسه میانگین توسط اکسل رسم گردید.

نتایج و بحث

در تحقیق حاضر، ۲۵ جدایه قارچ از بافت‌های مختلف گیاه فرفیون (Euphorbia esula L.) و همچنین شش جدایه قارچ از گیاه سلمه‌تره (Chenopodium album L.) جداسازی و خالص‌سازی شدند. از لاتکس گیاه فرفیون اندوفیتی جداسازی نشد. شناسایی اولیه جدایه‌ها بر اساس شکل ظاهری کلنی قارچ و مشخصات میکروسکوپی و بر طبق کلیدهای شناسایی انجام شد. نتایج نشان داد بیشترین قارچ جدا شده متعلق به جنس‌های Fusarium، Trichoderma و Alternaria بودند. Gunawardana (2015) با مطالعه بر روی ۳۸ گونه گیاهی از جنس Euphorbiaceae بیان کردند، با وجود سمیت لاتکس فرفیون، تنوع فیلوژنتیکی میکروبی در نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده کردند. جنس Fusarium متعلق به شاخه‌ی Ascomycota و راسته‌ی Hypocreales و خانواده‌ی Nectriaceae می‌باشد. پرگنه این قارچ دارای رنگ‌های متفاوتی نظیر سفید، صورتی، آجری و غیره می‌باشد. ریسه‌های این جنس منشب، بند بند، دارای دیواره صاف، نخی‌شکل تا استوانه‌ای است که کنیدیوفورهای Micronematous از آن‌ها ایجاد می‌شوند. نحوه‌ی کنیدی‌زایی این قارچ به شکل فیالیدیک است که این فیالیدها ممکن است به صورت مونوفیالید یا پلی‌فیالید باشند و کنیدیوم‌ها را به صورت منفرد و زنجیری ایجاد می‌کنند. این جنس قارچی

[13] H_2O_2
[14] Pectin
[15] Yeast Malt Agar
[16] xylene

دارای میکروکنیدیوم ، ماکروکنیدیوم و سمی ماکروکنیدیوم است که در روی فیالید یا اندام غیر جنسی به نام اسپورودوشیوم ایجاد می‌شوند. از جمله ویژگی‌های مهم برای شناسایی گونه‌های این جنس می‌توان به وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، شکل، نحوه‌ی شکل‌گیری و ابعاد آن، وجود ماکروکنیدیوم،تعداد دیواره، شکل سلول پایه و انتهایی و ابعاد آن، تولید یا عدم تولید کلامیدوسپور، شکل و انتهایی یا میانی بودن آن، اندازه رشد پرگنه بعد از چند روز و شکل، رنگ و بوی پرگنه رشد یافته در محیط کشت PDA قرار داده شده در شرایط استاندارد ۲۵ درجه سانتی گراد در روز و ۲۰ درجه سانتی‌گراد در شب و ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی اشاره کرد (شکل ۱).

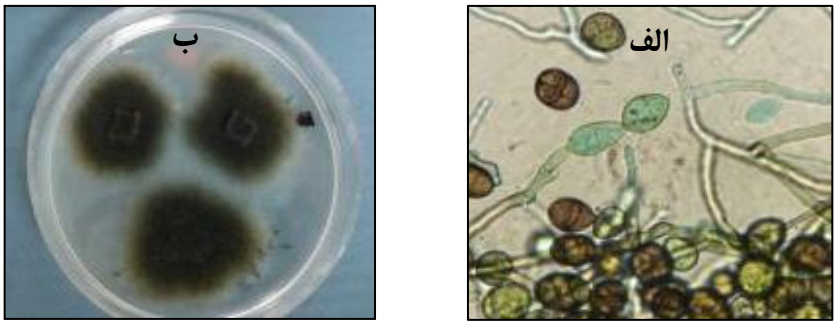


شکل۱. کلنی قارچ اندوفیت جنس Fusarium جدا شده از گیاه فرفیون روی محیط کشت Potato Dextrose Agar: الف) تصویر میکروسکوپی، ب) تصویر ماکروسکوپی

Figure 1. Endophytic fungus colony of the Fusarium genus isolated from Euphorbia esula on Potato Dextrose Agar. A) Microscopic image, B) Macroscopic image

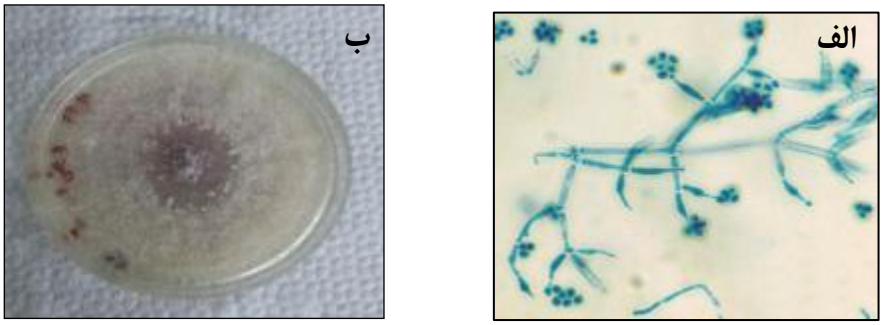
ویژگی اصلی جنس **Alternaria** شامل تولید زنجیری از اسپورهای تیره رنگ، با دیواره‌های عرضی و طولی و داشتن نوک تیز در اسپورها است. در بسیاری از آن‌ها اسپور فاقد نوک تیز بودند و اسپورها به صورت زنجیر تشکیل نمی‌شوند. رنگ پرگنه روی محیط کشت PCA به رنگ قهوه‌ایی مایل به زیتونی و دارای دوایر متحدالمرکز است. ریسه‌ها زرد تا طلایی رنگ و درون محیط کشت رشد می‌کنند. کنیدیوفور کوتاه به رنگ طلایی تا قهوه‌ای و سمپودیال است . کنیدیوم‌ها به صورت دسته‌ای یا انفرادی و غیر زنجیری روی کنیدیوفورها تشکیل شده است. کنیدیوم‌ها قهوه‌ای رنگ و به اشکال بیضوی تا تخم مرغی و به ابعاد ۱۰–۸ ×۱۸–۲۰ میکرومتر است. تعداد دیواره‌های طولی و عرضی از ۲–۱ متغیر است. سطح کنیدیوم‌ها منقوط و زگیل دار است (شکل ۲).گونه‌های جنس Trichoderma دارای کنیدیوفورهای ظریف و قابل انعطاف با انشعابات کم تراکم هستند. انشعابات غالباً به صورت دوتایی و به ندرت پیرامونی، با بیش از ۳ شاخه میباشند. فیالیدها نیز کم تراکم و معمولاً در دسته ۲ یا ۳ تایی و حداکثر ۵ تایی و پیرامونی تولید می‌شوند. فیالیدها تنگی شکل (lageniform) تا نوک دار (subulate) و کنیدیوم‌ها معمولاً سبز رنگ و سطح آنها صاف یا ناصاف است.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل۲. کلنی قارچ اندوفیت جنس Alternaria جدا شده از گیاه فرفیون روی محیط کشت Potato Dextrose Agar: الف) تصویر میکروسکوپی ب) تصویر ماکروسکوپی

Figure 2. Endophytic fungus colony of the Alternaria genus isolated from Euphorbia esula on Potato Dextrose Agar. A) Microscopic image, B) Macroscopic image



شکل۳. کلنی قارچ اندوفیت جنس Trichoderma جدا شده از گیاه فرفیون روی محیط کشت Potato Dextrose Agar: الف) تصویر میکروسکوپی ب) تصویر ماکروسکوپی

Figure 3. Endophytic fungus colony of the Trichoderma genus isolated from Chenopodium album on Potato Dextrose Agar. A) Microscopic image, B) Macroscopic image

توانایی میکروارگانیسم‌های جدا شده از دو گیاه سلمه تره و فرفیون در تجزیه منابع کربوهیدراتی مختلف در محیط مورد بررسی قرار گرفت. از مجموع ۳۱ قارچ جدا شده از دوگیاه فرفیون و سلمه تره، حضور آنزیم خارج سلولی آمیلاز در ۲۶ قارچ به اثبات رسید. در تحقیق حاضر، هاله‌ی شفاف نشان دهنده‌ی وجود آنزیم سلولاز، در اطراف ۱۹ جدایه قارچ مشاهده شد. در اطراف ۲۶ درصد از پرگنه قارچ اندوفیت، هاله‌های شفاف، مبنی بر فعالیت آنزیم زایلاناز، درمحیط کشت حاوی پودر چوب ذرت به عنوان سوبسترای آنزیم مشاهده گردید. از میان مجموع قارچ‌های اندوفیت جدا شده، ۱۲ جدایه توانایی تولید آنزیم پکتیناز در محیط حاوی پکتین را داشتند (جدول ۱ ، ۲و شکل ۵). بررسی فعالیت خارج سلولی اندوفیت‌ها بر روی سوبستراهای پروتئینی نشان داد که؛ ۷۱ درصد جدایه‌ها توانایی هیدرولیز ژلاتین و ۱۶ درصد از جدایه‌ها توانایی هیدرولیز کازئین را به عنوان سوبسترای پروتئینی داشتند. همچنین بررسی‌ها نشان داد که ۸۱ درصد از جدایه‌ها دارای فعالیت کاتالاز می باشند.

جدول ۱. تولید آنزیم های خارج سلولی توسط قارچ‌ها اندوفیت جدا شده از گیاه فرفیون

Table 1. Extracellular Enzymes Production by Endophytic Fungi isolated from Euphorbia esula

کاتالاز Catalase	کازئیناز Caseinase	پروتئاز Proteinase	زایلاناز Xylanase	پکتیناز Pectinase	سلولاز cellulase	آمیلاز Amylase	کد اختصاصی Assigned code	ردیف Row
+	−	+++	−	+	+++	+	E1	1
+	−	++	−	++	+	−	E2	2
+	+	+++	−	−	+	+	E3	3
+	++	+++	−	+	+	+	E4	4
++	−	++	−	+	++	+	E5	5
+	+++	++	−	−	+	+	E6	6
+	−	+	−	+	+	+	E7	7
−	−	+	−	−	+	+	E8	8
−	−	+	−	−	+	+	E9	9
++	−	+	−	++	−	+	E10	10
+++	−	+	−	−	+	+	E11	11
+	−	+	−	−	+	+	E12	12
−	+	+	−	−	+	+	E13	13
+	−	+	+	+++	+	+	E14	14
++	+	+	−	−	+	+	E15	15
+++	−	−	+	−	−	+	E16	16
++	−	+	−	−	−	+	E17	17
+++	−	+	+	−	+	+	E18	18
+++	−	+	+	++	−	+	E19	19
+	−	+	−	−	+	+	E20	20
−	−	−	+	−	+	+	E21	21
+	−	−	−	−	−	−	E22	22
−	−	−	−	−	−	−	E23	23
+++	−	−	+	+	−	+	E24	24
+	−	+	−	−	−	−	E25	25

+: حضور فعالیت آنزیم (+++: قطرهاله بالای هفت میلی متر؛ ++: قطرهاله بالای پنج میلی‌متر، +: قطرهاله بالای سه میلی‌متر)

-: فاقد فعالیت آنزیم

در این پژوهش نتایج نشان دهنده حضور آنزیم‌های خارج سلولی آمیلاز، پروتئاز، کازئیناز، زایلاناز، سلولاز، پکتیناز و کاتالاز در اندوفیت‌های قارچی جدا شده از دوگیاه فرفیون و سلمه تره بود. برای پنج جدایه قارچی گیاه فرفیون که شناسایی آنها بصورت کامل انجام شده بود، برای سه آنزیم پروتئاز و پکتیناز و سلولاز بررسی آماری صورت گرفت (شکل ۶). این سه آنزیم از مهمترین آنزیم‌ها هستند که در صنعت کاربرد فراوان دارد (Viikari et al. 2001). همانطور که در شکل مشاهده می گردد، بیشترین فعالیت آنزیم سلولاز در جدایه E1 مشاهده گردید. جدایه E14 بیشترین فعالیت پکتینازی و جدایه E3 کم‌ترین فعالیت را داشت. جدایه های E4 و E3 فعالیت پروتئازی بیشتری نسبت به سایر جدایه‌ها نشان دادند.

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۲. تولید آنزیم‌های خارج سلولی توسط قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه سلمه‌تره

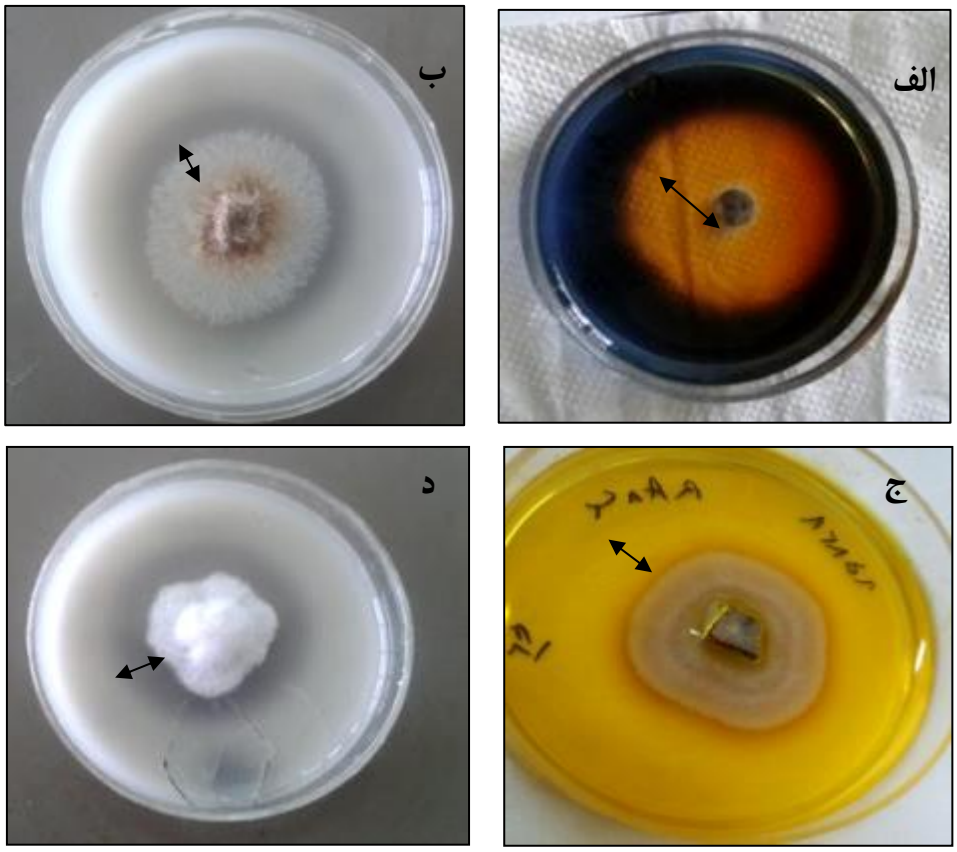
Table 2. Production of extracellular enzymes by endophytic fungi isolated from Chenopodium album L.

ردیف Row	کد اختصاصی Assigned code	آمیلاز Amylase	سلولاز cellulase	پکتیناز Pectinase	زایلاناز Xylanase	پروتئاز Proteinase	کازئیناز Caseinase	کاتالاز Catalase
1	C26	+	+	−	−	+	−	−
2	C27	+	+	−	−	−	−	+
3	C28	+	−	+	+	−	−	+
4	C29	+	−	+++	+	−	−	+++
5	C30	−	−	−	−	−	−	++
6	C31	+	−	+	−	+	−	+

+: حضور فعالیت آنزیم (+++: قطرهاله بالای هفت میلی متر؛ ++: قطرهاله بالای هفت میلی‌متر، +: قطرهاله بالای سه میلی‌متر)، -: فاقد فعالیت آنزیم

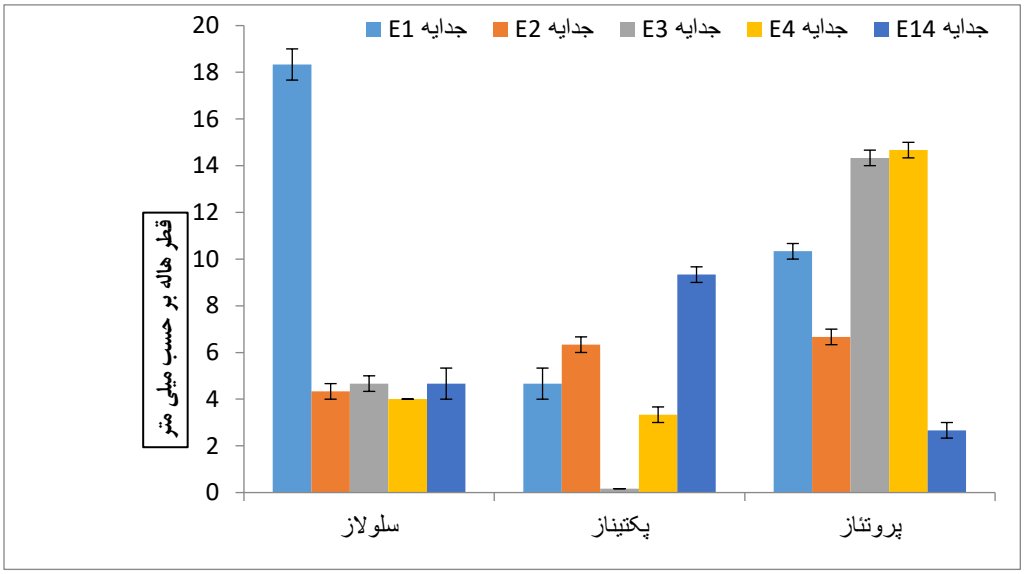
در تحقیق حاضر براساس خصوصیات مورفولوژیکی و میکروسکوپی، جدایه‌های E1، E2، E3 و E4 به عنوان Fusarium sp شناخته شدند. بررسی‌های آنزیمی نشان داد این سه جدایه فعالیت آنزیم‌های پروتئاز و سلولاز را داشتند. پروتئازها توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها از جمله پروتوزوآ، باکتری‌ها، مخمر و قارچ برای تجزیه مواد غذایی ترشح می‌شوند (Sawant & Nagendran 2014). جدایه‌های E3، E4 جدا شده از گیاه فرفیون با میانگین قطر ۱۴ میلی‌متر بیشترین فعالیت پروتئازی و جدایه E1 با قطر ۱۸ میلی‌متر بیشترین فعالیت سلولازی را در محیط کربوکسی‌متیل‌سلولز نشان دادند. در بررسی Bakri و Jawhar (2014) قارچ‌های اندوفیت Fusarium جداسازی شده از گندم توانایی بالایی در تولید آنزیم‌های پروتئاز، زایلاناز و سلولاز را داشتند. در میان میکروارگانیسم‌ها قارچ‌ها عامل اساسی تجزیه‌ی زیستی مواد سلولزی خاک هستند. فعالیت تجزیه کنندگی سلولز در جنس Fusarium همانند جنس‌های دیگر مانند Aspergillus، Trichoderma، Neurospora Thermomonospora نشان داده شده است (Schuster & Schmoll 2010).

Agricultural Biotechnology Journal; Printing ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500



شکل۵. فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی اندوفیت‌های دو گیاه سلمه تره و فرفیون. هاله‌ی شفاف اطراف پرگنه‌ها نشان دهنده هیدرولیز سوبسترا در محیط کشت است. الف) فعالیت آنزیم خارج سلولی آمیلاز جدایه E14، ب) فعالیت آنزیم خارج سلولی پروتئاز جدایه E2، ج) فعالیت آنزیم خارج سلولی سلولاز جدایه E1، د) فعالیت آنزیم خارج سلولی سلولاز جدایهE4

Figure 5. Extracellular enzyme activity of endophytes of Chenopodium album L and Euphorbia esula. Clear zone around the colonies indicated substrate hydrolysis in the culcure media. A) Amylase extracellular enzyme activity of E14 isolate, B) protease extracellular enzyme activity of E2 isolate, C) cellulase extracellular enzyme activity of E1 isolate, D) caseinate extracellular enzyme activity of E4 isolate



شکل ٦. نمودار میانگین فعالیت سه آنزیم خارج سلولی اندوفیت‌های قارچی جداشده از گیاه فرفیون

Figure 6. Diagram of mean three extracellular enzyme activities of fungal endophytes isolated from Euphorbia esula.

جدایه E14 توانایی بالایی در تولید آنزیم‌های پکتیناز، سلولاز و زایلاناز نشان داد و براساس خصوصیات ظاهری، به عنوان جنس Alternaria شناسایی شد. در تحقیقات Zaferanloo (2013) قارچ اندوفیت Alternaria جداسازی شده از گیاه Eremophila Longifolia، بیشترین فعالیت پروتئازی، سلولاز و آمیلازی را نشان داد. در بررسی‌های آنزیمی، در میان قارچ‌های شناسایی شده بیشترین تعداد قارچ‌های تولید کننده آنزیم زایلاناز و پکتیناز مربوط به جنس Fusarium، Alternaria و Penicillium بودند، که با نتایج Fouda (2015) مطابقت دارد. در فعالیت این گروه، قارچ‌های اندوفیت Penicillium و Alternaria،که از گیاه استبرق با نام علمی Asclepias sinaica جداسازی شدند، به عنوان قارچ‌هایی با بیشترین میزان زایلاناز و پکتیناز معرفی شدند. اندوفیت قارچی تولیدکننده‌ی آنزیم زایلاناز توسط قارچ Alternaria alternate جدا شده از گیاه کروتون[۱۷] توسط Wipusaree (2011) گزارش شده است. استفاده از بیوتکنولوژی و تولید آنزیم‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها، یکی از بهترین و موثرترین روش‌ها به منظور تولید صنعتی این آنزیم‌ها است (Colin et al. 2010). اهمیت آنزیم‌های میکروبی به دلیل استفاده‌ی آنها در صنایع غذایی اعم از تهیه شربت‌های فروکتوز، گلوکز و آب میوه‌ها، تولید مواد شوینده، تولیدات پارچه، کاغذسازی، محصولات دارویی، درمان، پزشکی و زیست شناسی مولکولی است (Rao et al. 1998). تقاضا و تحقیق برای منابع جدید و قوی‌تر آنزیم‌های صنعتی به ویژه از منابع میکروارگانیسمی رو به افزایش است. در این میان اندوفیت‌های قارچی با رویکرد تولید آنزیم، مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله این آنزیم‌های مهم می توان به آمیلازها، پروتئازها، پکتینازها و سلولازها اشاره کرد،

[17] Croton

حضور این آنزیم‌ها در قارچ‌های اندوفیت این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند (Moy et al. 2002). گزارشات در خصوص تولید متابولیت‌های اندوفیتی در میزبان‌های مختلف در سراسر جهان در حال افزایش است. در این میان قارچ‌های اندوفیت رشته‌ای مانند Penicillium sp، Aspergillus sp و Fusarium sp توجه بسیاری را به عنوان منابع بالقوه از مواد فعال زیستی به خود جلب کرده‌اند (Gupta et al 2002).

نتیجه گیری: براین اساس، حضور آنزیم‌های خارج سلولی در کشت ۳۱ جدایه قارچ‌های اندوفیت جدا شده از دو گیاه فرفیون و سلمه تره مشاهده گردید. بررسی‌ها نشان داد که تعداد زیادی از جدایه‌ها در شرایط مورد بررسی توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولازی آنزیم آمیلاز، پروتئاز و کاتالاز را داشتند. تعدادی از جدایه‌ها همچنین فعالیت پکتینازی و زایلانازی را در محیط کشت نشان دادند. فعالیت سلولازی در کشت بیشتر جدایه‌ها مشاهده گردید. با توجه به اهمیت و کاربرد آنزیم‌های میکروارگانیسمی، بویژه سلولاز، پکتیناز و پروتئاز، در صنایع مختلف (از جمله غذایی، دارویی، کاغذ سازی وچرم سازی)، اندوفیت‌های جدا شده در این تحقیق میتوانند منبعی مهم برای بررسی‌های بیشتر با این هدف باشند.

منابع

اصغریان شیرین (۱۳۸۹) بررسی خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی اندوفیت‌های موجود در ساقه و برگ ۴ گیاه دارویی بومی استان چهارمحال و بختیاری. پایانامه دکتری حرفه ای. دانشکده دامپزشکی. دانشگاه شهرکرد.

راشد محصل محمد حسن، نجفی حسین، اکبر زاده مهری دخت (۱۳۸۰) بیولوژی کنترل علف‌های هرز. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

مقیمی بهاره، حمیدی مهرداد، سروری رحیم، جوانی سیامک (۱۳۸۹) جداسازی قارچ‌های تجزیه کننده سلولز و بررسی فعالیت سلولولیتیک آن‌ها در بخشی از میکروفلور خاک استان زنجان. فصلنامه علوم زیستی. ۲، ۲۶-۱۷.

References

Asgharian SH (2010) Antimicrobial and Antifungal Activities of Isolated Endophytes from 4 medicinal plant stems and leaves from Chaharmahal and Bakhtiari Province. PhD thesis, Shahrekord university. pp 10-14 (in Persian)

Bakri Y, Jawhar M, Arabi MI (2014) Enzymatic activity of the endophytic Fusarium species strains isolated from wheat. Adv Horticul Sci 28, 129-132.

Bayer EA, Lamed R, Himmel ME (2007) The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. Curr opin Biotechnol 18, 237-245.

Colin VL, Baigori MD, Pera LM (2010) Effect of environmental conditions on extracellular lipases production and fungal morphology from Aspergillus niger MYA 135. J Basic microbiol 50, 52-58.

Devi NN, Prabakaran JJ, Wahab F (2012) Phytochemical analysis and enzyme analysis of endophytic fungi from Centella asiatica. Asian Pac J Trop Biomed 2, 1280-1284.

Domsalla A, Melzig MF (2008) Occurrence and properties of proteases in plant latices. Planta med Lett 74, 699-711.

Fareed S, Jadoon UN, Ullah I et al. (2017) Isolation and biological evaluation of endophytic fungus from Ziziphus nummularia. J Entomol Zool Stud 5, 32-38.

Fouda AH, Hassan SE, Eid AM, Ewais EE (2015) Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant Asclepias sinaica (Bioss.). Ann of Agric Sci 60, 95-104.

Gams, W, Bissett J (1998) Morphology and identification of Trichoderma. Trichoderma Gliocladium 1, 3-34.

Guha Bakshi DN, Sensarma P, Pal DC (1999) lexicon of medicinal plants in India. Naya Prokash.

Gunawardana M, Hyde ER, Lahmeyer S et al. (2015) Euphorbia plant latex is inhabited by diverse microbial communities. Am J Bot 102, 1966-1977.

Gupta A, Roy I, Patel RK et al. (2005) One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic Bacillus sp. J Chrom 1075, 103-108.

Gupta R, Beg Q, Lorenz P (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. App Microbiol Biotechnol 59, 15-32.

Hankin L, Anagnostakis SL (1975) The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia 67, 597-607.

Kaboosi H, Tabari N, Samadlouie HR (2014) Optimization of a-amylase production by Bacillus amyloliquefaciens using response surfaces methodology. Biology J Micro 3, 85-97

Kumar A, Jha KP, Kumar R (2015) Antibacterial activity, phytochemical and enzyme analysis of a crude extract of endophytic fungus, Alternaria sp. isolated from an ethnobotanical medicinal plant Tridax procumbens. Int J Pharma Phytochem Res 7, 1111-1115.

Leslie, J. (2006) the Fusarium laboratory manual. Ames IA Blackwell Pub. Fusarium

Madureira AR, Pereira CI, Gomes AM, et al. (2007) Bovine whey proteins–Overview on their main biological properties. Food Res Int 40, 1197-1211.

Miao Z, Wang Y, Yu X et al. (2009) A new endophytic taxane production fungus from Taxus chinensis. Appl Biochem Microbiol 45, 92-96.

Moghimi B, Hamid M, Sarvari R, Jvani S (2010) Separating fungi degradation of cellulose and study cellulolytic activity in part of microflora Zanjan soil. J anim physiol dev 2, 19-26 (in Persian)

Molina G, Pimentel MR, Bertucci TC, Pastore GM (2012) Application of fungal endophytes in biotechnological processes. Chem Eng Trans 27, 289-294.

Moy M, Li HM, Sullivan R et al. (2002) Endophytic fungal β-1, 6-glucanase expression in the infected host grass. Plant Physiol 130, 1298-1308.

Nazemiyeh H, Kazemi EM, Zare K et al. (2010) Free radical scavengers from the aerial parts of Euphorbia petiolata. J Nat Med 64, 187-190.

Patil MG, Pagare J, Patil SN, Sidhu AK (2015) Extracellular enzymatic activities of endophytic fungi isolated from various medicinal plants. Int J Curr Microbiol App Sci 4, 1035-1042.

Promputtha I, Hyde KD, McKenzie EH et al. (2010) Can leaf degrading enzymes provide evidence that endophytic fungi becoming saprobes. Fungal Divers 41, 89-99.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev 62, 597-635.

Rashed Mohassel MH, Najafi H, Akbarzadeh M.D (2001) weed Biology control, Ferdowsi University of Mashhad Press. (in Persian)

Sawant R, Nagendran S (2014) Protease: an enzyme with multiple industrial applications. World J Pharm Pharmaceut Sci 3, 568-579.

Scannerini S, Fusconi A, Mucciarelli M (2001) The effect of endophytic fungi on host plant morphogenesis. Springer, Dordrecht. InSymbiosis 425-447.

Schuster A, Schmoll M (2010) Biology and biotechnology of Trichoderma. Appl microbiol Biotechnol 87, 787-799.

Semenova MV, Grishutin SG, Gusakov AV (2003) Isolation and properties of pectinases from the fungus Aspergillus japonicus. Biochem (Mosc) 68, 559-569.

Strakowska J, Błaszczyk L, Chełkowski J (2014) The significance of cellulolytic enzymes produced by Trichoderma in the opportunistic lifestyle of this fungus. J Basic Microbiol 54, 2-13.

Tan RX, Zou WX (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. Nat Prod Rep 18, 448-459.

Thongsandee W, Matsuda Y, Shimizu M et al. (2013) Isolation of endophytic streptomycetes from above and belowground organs of Quercus serrata. J Forest Res 18, 179-189.

Tyler YE, Brady LR, Robbers JE (1988) Pharmacognosy. 9th edition, Philadelphia, Lea and Febiger pp 197.

Viikari L, Tenkanen M, Suurnäkki A (2001) Biotechnology in the pulp and paper industry. Biotechnol 10, 523-546.

Wipusaree N, Sihanonth P, Piapukiew J et al. (2011) Purification and characterization of a xylanase from the endophytic fungus Alternaria alternata isolated from the Thai medicinal plant, Croton oblongifolius Roxb. Afr J Microbiol Res 5, 5697-5712.

Yadav R, Singh AV, Joshi S, Kumar M (2015) Antifungal and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Ocimum sanctum and Aloe vera. Afr J Microbiol Res 9, 1783-1788.

Zaferanloo B, Virkar A, Mahon PJ, Palombo EA (2013) Endophytes from an Australian native plant is a promising source of industrially useful enzymes. World J Microbiol Biotechnol, 29, 335-345.

Zhang HW, Ying C, Bai XL et al. (2014) Advancement in endophytic microbes from medicinal plants. Int J Pharm Sci Res May 1, 1589-600.