



Shahid Bahonar
University of Kerman

Agricultural Biotechnology Journal

p-ISSN 2228-6705

e-ISSN 2228-6500



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](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.

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

بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره اندوفیت های باکتریایی گیاه دارویی باریجه

مهتری 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 اندوفیت‌ها می‌باشند. یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و صنعتی ایران، گیاه باریجه با نام علمی *Ferula gummosa.boiss* می‌باشد که اندوفیت‌های آن تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته‌اند.

مواد و روش‌ها: 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 می‌دهند.

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

واژه های کلیدی: اندوفیت، باریجه، تخریب رادیکال‌های آزاد

مقدمه

استفاده روز افزون از گیاهان دارویی سبب شده است که ارزش تجارت جهانی آن‌ها از ۵۱ میلیارد دلار در سال ۲۰۰۲، طی دو سال به ۱۰۰ میلیارد دلار رسیده و پیش بینی می‌شود 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 می‌گیرند (Soetan and Aiyelaagbe 2009). یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی، صنعتی و صادراتی ایران، گیاه باریجه با نام علمی *Ferula gummosa.boiss* از خانواده Apiaceae می‌باشد. اندوفیت‌ها 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 تنش‌های 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 متابولیت‌های ضد میکروبی جدید از اندوفیت‌ها، جایگزین مهمی برای غلبه بر افزایش سطح مقاومت به دارو توسط عوامل بیماری‌زای انسانی و گیاهی می‌باشد. همچنین بعنوان نگهدارنده‌های مواد غذایی نیز می‌توانند به کار روند (Pimentel et al. 2011). باکتری اندوفیت *S. marcescens cenA* دارای بیشترین فعالیت IC50 و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در بین باکتری‌های جدا شده از گیاهان دارویی هند گزارش شده است (Nongkhilaw and Joshi 2015). همچنین *Phomopsis sp.GJJM07* مناسبی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نشان داده شده است (Ganapathi et al, 2011).

از آنجا که اندوفیت‌ها دارای رشد و تکثیر سریعتری نسبت به گیاهان می‌باشند، کاربرد تجاری آنها برای استخراج مواد موثره بسیار ارزشمند بوده و می‌تواند باعث جلوگیری از برداشت بی‌رویه 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.

مواد و روش ها

جمع آوری بذر دو ژنوتیپ متفاوت گیاه دارویی باریجه (*Ferula gumosa boiss*) از دو منطقه کاشان 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 جداسازی اندوفیت‌ها از بافت‌های گیاهی، ضد عفونی سطحی طبق روش کوساری 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 استفاده از تیغ اسکالپل حذف شده و کاملاً شستشو داده شدند. بافت‌های گیاهی پس از تقسیم به قطعات ۵-۱۰ 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 جداسازی اندوفیت‌ها، لایه‌های درونی قطعات ضد عفونی شده روی محیط NA (Nutrient Agar) قرار گرفته و در انکوباتور با دمای 28 ± 2 درجه سانتیگراد به مدت ۱۲-۲ هفته نگهداری شدند تا امکان رشد برای اندوفیت‌ها فراهم گردد. نمونه‌های بذر جمع آوری شده نیز پس از ضد عفونی، 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 28 ± 2 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 دست آمده روی سطح محیط کشت آگار غذایی به صورت خطی کشت شدند. آزمون‌های رنگ آمیزی گرم مطابق روش (Schaad et al, 2001) و با بررسی ویژگی‌های ماکرو سکویی صورت گرفت. برای تایید هویت مولکولی، استخراج DNA جدایه باکتری‌های اندوفیت به روش لیز قلیایی صورت گرفت (Charkhabi et al, 2011). برای تعیین کیفیت و کمیت DNA از الکتروفورز ژل آگارز استفاده گردید. از آغازگرهای عمومی 16SrRNA (Partida-Martinez et al. 2005) برای شناسایی مولکولی استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱. توالی آغازگرهای 16SrRNA برای شناسایی مولکولی باکتری با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز

(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'

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 (۲۰۲-دی فنیل-۱-پیکریدیدیل هیدرازیل) طبق روش (Stojichevich et al. 2008) انجام شد. برای تهیه عصاره‌ها، ۰/۵ گرم 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 (۰/۵ و ۱) 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 (RSC%)^۱ با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

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

در این رابطه A_{sample} و A_{blank} به ترتیب میزان جذب بلانک و نمونه می‌باشند. برای مقایسه اثر آنتی اکسیدانی عصاره‌ها، نتایج به دست آمده با مقدار IC_{50} آنتی اکسیدان از بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) استفاده شد و به عنوان کنترل مثبت مقایسه گردید. برای برر سی متابولیت‌های موجود در عصاره باکتری‌ها به روش (Chethana et al. 2013) تست‌های 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 ۳-۴ 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

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 لیتر از 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 می‌گردد. 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. بلاست توالی مربوط به جدایه (R4) بر پایه شناخت همردیفی 16S rRNA، با شماره دستیابی (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 می‌تواند 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 می‌شود 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).

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	گرم Geram	منبع استخراج	Source of extraction	کد اختصاص یافته	Assigned code
Staphylococcus sp.	G ⁻		غده		GR ₁	
Bacillus sp.	G ⁺		غده		GR ₂	
Cocobacillus	G ⁻		غده		GR ₃	
Staphylococcus sp.	G ⁻		غده		GR ₄	
Streptococcus sp.	G ⁺		غده		GR ₅	
Streptococcus sp.	G ⁺		غده		GR ₆	
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* و *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)

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 جدا شده از گیاه باریجه با استفاده از رادیکال آزاد DPPH انجام شد. بر اساس مقدار IC_{50} آنتی اکسیدان کمتر از ۱۰، کمتر از ۱۰۰ 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 اثر عصاره 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 جدا شده از گیاه باریجه

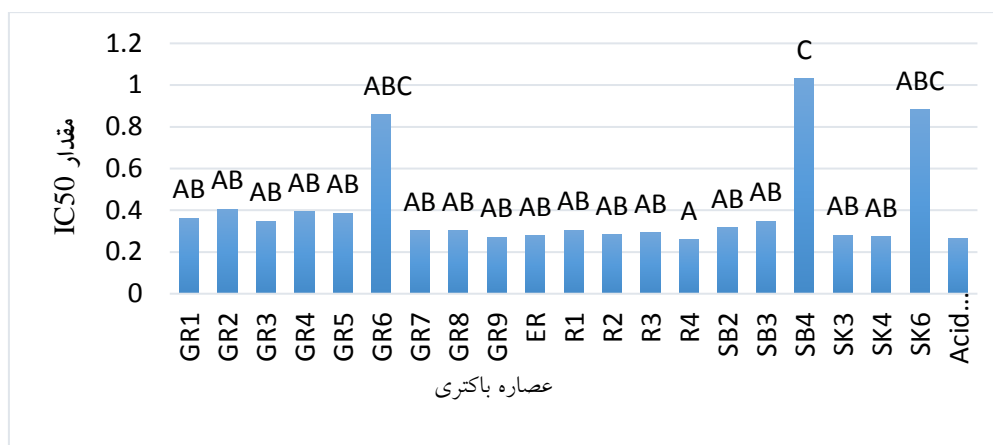
Table 3. Analysis of variance of antioxidant effect of bacterial extract isolated from *Ferula gummosa boiss*

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

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

Ns: Non significant

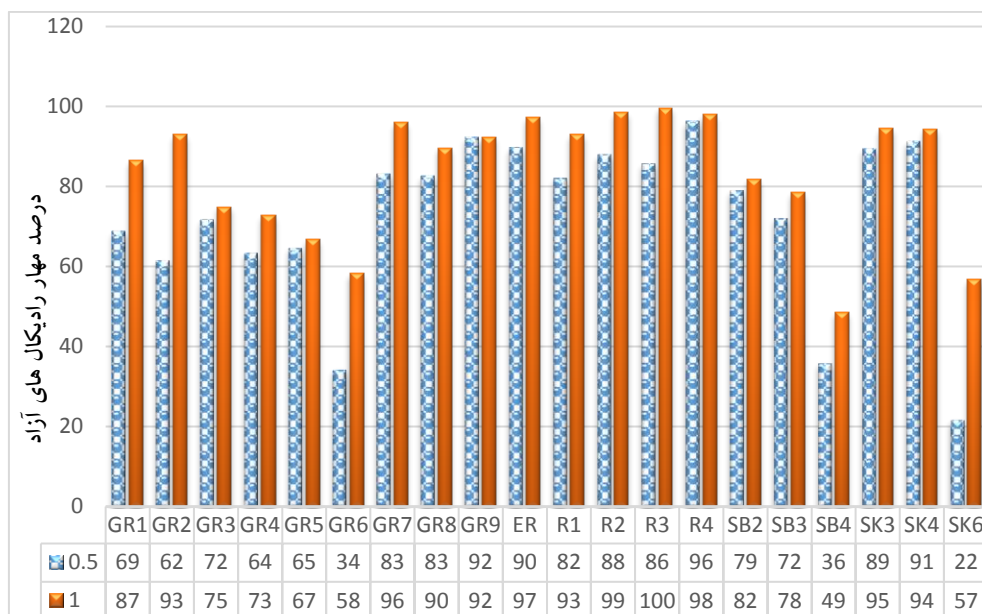
نتایج مقایسه میانگین به روش دانکن نشان داد که عصاره باکتری‌های R₄ و GR₉ و SK₄ و ER و SK₃ و R₂ و R₃ و GR₇ و R₁ و GR₈ و SB₂ و SB₃ و GR₃ و GR₁ و GR₅ و GR₄ و GR₃ دارای بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی بوده و باکتری‌های GR₆ و SK₆ دارای کمترین اثر بودند. باکتری SB₄ فاقد اثر آنتی‌اکسیدانی بوده و در گروه سوم قرار گرفت.



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 آنتی‌اکسیدانی باکتری R₄ تقریباً برابر با اسیداسکوربیک نشان داده شد. همانطور که گفته شد، اندوفیت‌های این گیاه تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است اما براساس گزارشات موجود، اسانس دانه باریجه خاصیت ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی نشان داده است (Eftekhari 2004). همچنین در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هیدروالکلی گل، ساقه و برگ باریجه برداشت شده از ارتفاعات استان مازندران، بیشترین مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در برگ و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فنل کل و فلاونوئید کل در ساقه باریجه مشاهده شده است. در بررسی عصاره گل باریجه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر اندام‌ها گزارش شده است (Zeinali et al. 2014). باکتری‌های اندوفیتی که از گیاهان دارویی شمال شرقی هند جداسازی شده اند، خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی نشان داده‌اند (Nongkhaw et al. 2015). همچنین طی آزمایش زنگ و همکاران نشان داده شد که ۱۰ باکتری اندوفیت جدا شده از گیاه *Myricaria laxiflora* دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی بودند (Wen et al. 2015).



شکل ۲- نمودار درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره باکتری‌ها جداشده از گیاه باریجه. محور عمودی نمودار، درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره باکتری‌ها و محور افقی، عصاره باکتری‌ها 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 برگ‌های گیاه گزانگبین به علت ترکیبات فنلی بالا دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خوبی تشخیص داده شد (Swarnalatha et al. 2015). بنابراین علاوه بر اینکه طبق گزارشات مختلف قبلی، اندامهای مختلف این گیاه دارای خواص آنتی‌اکسیدانی می‌باشند، نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که باکترهای اندوفیت این گیاه نیز همانند بعضی از گیاهان بررسی شده دیگر، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی 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 GR₁، GR₃، R₁، R₂، R₃، R₄، SK₄ و ترکیبات دی‌ترپن در عصاره باکتری‌های GR₁، GR₂، GR₃، GR₅، GR₆، GR₇، GR₈، R₁، R₂، R₃، R₄، SB₃، SB₄، SK₃ و ترکیبات استروئید در عصاره باکتری‌های GR₅، R₁، R₂، R₃، R₄، SB₃، SB₄ و ترکیبات ترپنوئید در عصاره باکتری‌های GR₁، GR₅، GR₇، R₃، R₄، SB₃، SB₄، SK₄، SK₆ و ترکیبات فلاونوئید در عصاره باکتری‌های ER، GR₂، GR₅، GR₉ و ترکیبات فنول و تانن در عصاره باکتری‌های R₂، R₃، R₄، SK₃، SK₄، SK₆ و ترکیبات کوئینون در عصاره باکتری‌های GR₁، GR₇، ER، R₂، R₃، R₄، SB₄ و ترکیبات فلاونون در عصاره باکتری‌های GR₁.

گرید (جدول ۴).
 ترکیبات کومارین در عصاره باکتری‌های GR₁, ER, SB₃ و ترکیبات کومارین در عصاره باکتری‌های GR₄, GR₅, ER, R₂, R₃, SB₂, SB₃, SK₄, SK₆ مشاهده گردید (جدول ۴).

جدول ۴- ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاه باریجه

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

Bacterial extract	Phenol								
	Coumarin	flavone	Quinon	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

Kalyoncu et al. 2008), ترکیبات فنولیک (Pelczar et al. 1988; Lai et al. 2010), استروئیدها (Kannabiran et al.

al. 2009), گلیکوزیدها (Rohaya et al. 2005), و تانن ها (Kaur and Arura 2009; Zhang and Lin 2008) به

عنوان مواد دارای فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی قوی شناخته شده اند. فنل‌ها و آلکالوئیدها ترکیبات عمده فیتوشیمیایی اندوفیت‌ها 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، اندوفیت‌های گیاهان دارویی، دارای ترکیبات زیستی موثری می‌باشند. 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 R4 که با بررسی مولکولی به عنوان *Rahnella aquatilis* شناسایی گردید، دارای بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی در بین باکتری‌های جدا شده بود. حضور ترکیبات فنولی نیز در این جدایه، نشان داده شد. خاصیت آنتی اکسیدانی این باکتری و حضور ترکیبات فنولی را می‌توان به رابطه خطی بین پتانسیل آنتی اکسیدانی و محتوای فنول نسبت داد. بیشترین گزارشات از این سویه باکتری نشان می‌دهد که اغلب در ریزوسفر یافت می‌شود و به شدت با ریشه‌ها 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 می‌باشد.

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 hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* boiss roots. *Eur Rev Med Pharmacol 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.

- 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 I, 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.

- 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 Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd. 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 rugosa* 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, ASghari 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.

