



بررسی خواص آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریایی اندوفیت های گیاه گردو

صفورا عشاقی^۱

هیات علمی، موسسه آموزش عالی دانش پژوهان پیشرو

soshaghi@yahoo.com

حامد ترک لادانی^۲

موسسه آموزش عالی دانش پژوهان پیشرو

soshaghi@yahoo.com

سید محمد رضا لقمانیان^۳

هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان

m_loghmanian@yahoo.com

سمیرا عشاقی^۴

متخصص طب فیزیکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

soshaghi@yahoo.com

چکیده:

اندوفیت میکروارگانیسم هایی هستند بخشی یا تمام چرخه زندگی خود را بدون ایجاد علائم بیماری در داخل گیاهان مختلف زندگی می کنند. این میکروارگانیسم ها منبعی غنی از آنزیم ها، ترکیبات ضد میکروبی و متابولیت های فعال زیستی هستند. در سال های اخیر اندوفیت های گیاهی به دلایل مختلف از جمله تاثیر بر رشد گیاه و تولید فراوده های مختلف (از جمله ترکیبات با ارزش دارویی) مورد توجه قرار گرفته اند. گیاه گردو در طب سنتی از جایگاه ویژه ای برخوردار است. برگ گیاه دارای خواص ضد میکروبی و میوه آن سرشار از مواد مختلف غذایی و دارویی است در این پژوهش نمونه برداری در پاییز 94 و بهار 95 از درختان سالم گردو، از پنج بافت مختلف؛ گل، برگ، جوانه، پوست و ساقه صورت گرفت. از بافتهای جمع آوری شده، 90 اندوفیت باکتریایی و 45 قارچ جداسازی شدند. سپس آزمایشات بیوشیمیایی شامل حضور آنزیم های خارج سلولی، ترکیبات آنتی اکسیدانی، متابولیت های ثانویه، تاثیر عصاره قارچ ها بر روی جوانه زنی بذر و فعالیت زیست پالایی اندوفیتها بررسی شد. اندوفیت های قارچی در محیط حاوی ترکیبات نفتی (نفت، بنزین، گازوئیل، روغن ترمز، روغن موتور و روغن سوخته) کشت شدند. قارچ هایی که بهترین فعالیت آنزیمی، رشد و تجزیه ترکیبات نفتی داشتند؛ انتخاب و اثر عصاره اتیل استاتی آنها بر روی پنج باکتری

¹ -صفورا عشاقی



بیماری‌های انسانی (استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، کاندیدا آلبیکنس، سالمونلا شیگلا، سودوموناس آئروژینوزا) و سه باکتری بیماری‌های گیاهی (کلاوی باکتر، رالستونیا، زانتوموناس) مورد بررسی قرار گرفت. سپس متابولیت‌های فیتوشیمیایی اندوفیت‌های قارچی مورد بررسی قرار گرفت. طی این بررسی مشاهده شد که 62 درصد از قارچ‌ها اندوفیت جداسازی شده دارای آنزیم خارج سلولی آمیلاز و سلولاز، 22 درصد پروتئاز و لیپاز، 55 درصد پکتیناز بودند. 64/4 درصد توانایی رشد در نفت و گازوئیل را داشتند که از این بین 31/1 درصد توانایی تجزیه نفت و 20 درصد توانایی تجزیه گازوئیل را داشتند، 71 درصد از اندوفیت‌ها در روغن سوخته رشد کردند اما تنها 24/44 توانایی تجزیه آن را داشتند همچنین 48 درصد از اندوفیت‌ها توانایی رشد در محیط حاوی یک درصد بنزین را داشتند. از بین عصاره‌های قارچی که توانایی ضد میکروبی آنها مورد بررسی قرار گرفت، عصاره قارچ‌های A6، A13، A5، A11 و A18 فعالیت آنتی باکتریایی از خود نشان دادند. بررسی‌ها نشان داد که عصاره اندوفیت‌های مورد بررسی همگی دارای استروئید و فلاونوئید بودند و متابولیت‌های دیگر از جمله، کوینون، کومارین، فلاونون، ترپن، فنول و تانن، دی‌ترپن و آلکالوئید هم در عصاره‌های مختلف وجود داشت.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، گردو، زیست پالایی، متابولیت فیتو شیمیایی، اثر ضد میکروبی



1- مقدمه

احساس گردد. استفاده از مواد و ترکیبات طبیعی با منشا میکروبی و گیاهی، از روش های نوین برای کنترل بیماری های انسانی، حیوانی و گیاهی است.

2- مواد و روش ها

گردو یکی از قدیمی ترین گونه های گیاهی می باشد که در روی کره زمین وجود داشته است. طبق بررسی های دیرین شناسی و گرده شناسی، گونه های مختلف گردو از دوران سوم زمین شناسی یعنی دوره ترشیاری در روی کره زمین وجود داشته است. بررسی های فسیل شناسی نشان می دهد که فرم های اولیه گردو در مناطقی از آسیا، اروپا و آمریکای شمالی رشد می نموده است. تغییرات آب و هوایی خصوصا در آخرین دوره یخبندان باعث تغییر پراکندگی مناطق رشد این جنس به شکل امروزی گردیده است. جنس گردو دارای بیست و یک گونه است که اکثر آن ها در آسیای مرکزی، شرقی، خاورمیانه، دامنه کوه های "کارپات" در جنوب شرقی اروپا، دامنه کوه های هیمالیا، شمال آفریقا، یونان و برخی ایالت های آمریکا پراکنده اند. اماحالت وحشی گردوی ایرانی در منطقه کوه های کارپاتیان در شرق اروپا، سراسر ترکیه، عراق، ایران، جنوب روسیه، افغانستان تا مناطق شمال غربی هیمالیا یافت شده اند.

برخی گردو را بومی آناتولی دانسته، که دارای تاریخچه ای طولانی از کشت و کار در این منطقه می باشد، برخی دیگر این گونه را بومی چین نیز معرفی نموده اند. هم چنین محققین زیادی نیز معتقدند که منشا گردو ایران بوده و از اینجا به سمت شرق، ابتدا به هند و بعد از آن حدود 150 سال قبل از میلاد به چین انتقال یافته است و سپاه اسکندر در بازگشت خود آن را به اروپا برده است. در ایران درختان

قارچ های اندوفیت به عنوان یکی از باور نکردنی ترین کارخانه های شیمیایی شناخته شده هستند و ذخیره جدیدی از مواد فعال زیستی طبیعی می باشند و امروزه به عنوان منابعی جهت تولید محصولات طبیعی دارای پتانسیل کاربرد در پزشکی، کشاورزی و صنعت مطرح شده اند. در پژوهشی قارچ های اندوفیت جدا شده از گیاهان دارویی برای تولید آنزیم ضد سرطان L-آسپاراژیناز، مورد بررسی قرار گرفتند و از چهار گیاه دارویی (دو گونه خودرو و دو گونه اهلی) آلکالوئید های ضد سرطان جدا سازی شد. آسپاراژیناز یک آنزیم هیدرولاز می باشد که آسپاراژین را به آمونیم و آسپارتیت تبدیل می کند.

بیماری های عفونی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان، به ویژه در کشورهای توسعه نیافته و در حال توسعه می باشند. استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک ها و افزایش مقاومت به دارو ها در میکروارگانیسم ها، که به علت توانایی ژنتیکی باکتری ها برای به دست آوردن مقاومت به ترکیبات دارویی و انتقال آن ایجاد شده است، به یک نگرانی جدی جهانی تبدیل شده است. امروزه کشف متابولیت های ضد میکروبی جدید از اندوفیت ها، جایگزین مهمی برای غلبه بر افزایش سطح مقاومت به داروها توسط عوامل بیماری زای گیاهی و انسانی می باشد. ترکیبات ضد میکروبی نه تنها به عنوان داروهایی برای کاربرد بشر که به عنوان نگهدارنده مواد غذایی برای کنترل فساد مواد غذایی و بیماری های منتقل شونده با غذا نیز می توانند به کار روند. این مساله سبب شده است که نیاز به جست و جو برای منابع طبیعی جدید، ارزان، موثر و غیر سمی با خاصیت ضد باکتریایی، که امکان ایجاد مقاومت به آنها کمتر باشد،



(مانند: *Aspergillus niger*, *Aspergillus*)
Trichoderma reesei, *oryzea*) تولید شده اند.

3- نتایج و بحث

نتایج تحقیقات متعدد نشان داده که استخراج DNA از قارچ ها مشکل است که دلیل آن فراوانی مهارکننده هایی نظیر پلی ساکارید ها و ترکیبات فنلی می باشد که حذف آنها نیز مشکل بوده و وجود این ترکیبات فعالیتهای آنزیم ها را مختل می نماید.

آلودگی DNA استخراج شده به فنل ها و پلی ساکاریدها موجب مهار عمل آنزیم های محدود کننده و ایجاد اختلال در واکنش زنجیره ای پلیمرز می گردند . پلی ساکارید ها 80 تا 90 درصد محتویات دیواره ی سلولی قارچ ها را تشکیل می دهد و برخی قارچ ها مقادیر زیادی از آن را در محیط کشت خود تولید و ترشح می کنند.

از روش CTAB با کمی تغییرات استخراج DNA انجام گرفت . استخراج DNA از کشت 7 روزه قارچ ها انجام گرفت.

پس از استخراج DNA خلوص و کیفیت آن توسط اسپکتوروفوتومتر مشخص گردید. میزان جذب در طول موج 260 / 280 نشان دهنده خلوص DNA از پروتئین و میزان جذب در طول موج 260 / 230 نشان دهنده میزان آلودگی DNA به پلی فنول ها و پلی ساکارید ها و EDTA است. میزان جذب اکثر نمونه ها در محدوده مناسب بوده که نشان دهنده مقادیر ناچیز آلودگی و کیفیت بالای DNA بود.

کهنسال گردو را در بسیاری از مناطق کشور می توان یافت که سن آنها از چند صد سال نیز تجاوز می نماید. این گونه به صورت خودرو در جنگل های شمال کشور نیز دیده می شود.

گیاه گردو با نام علمی *Juglans regia* دارای میوه های گرد، دو پوسته، یکی نرم و سبز رنگ که به تدریج خشک شده و از بین می رود و دیگری سخت و چوبی است. گردو درختی است.

به علت اهمیت قارچ ها، این موجودات به بازیگران کلیدی در بهره برداری از سیستم های زیستی توسط انسان تبدیل شده اند. در بهره برداری ناخودآگاه مردم باستان از تخمیر در تهیه ی الکل، سرکه، نان، پنیر و کشف و کشت آگاهانه قارچ های خوراکی، استفاده از میکروبیولوژی در تهیه آنتی بیوتیک ها (پنی سیلین) و مهندسی ژنتیک پروتئین های نو ترکیب، قارچ ها نقش کلیدی در توسعه بیوتکنولوژی داشته اند. همچنین قارچ ها موجوداتی یوکاریوتی بوده و به علت شباهت مکانیسم های بیان ژن در آن ها با سایر یوکاریوت ها، تولید متابولیت های یوکاریوتی در آن ها با متابولیت تولید شده در ارگانیسم اصلی شباهت بیشتری دارد. توانایی قارچ های رشته ای در رشد بر روی محیط های ساده و نیز توانایی آنها در تولید طیف گسترده ای از متابولیت های مهم تجاری، آنها را به میکروارگانیسم های تولید کننده طیف گسترده ای از محصولات در بیوتکنولوژی تبدیل کرده است. ترکیبات مختلف از جمله اسید های آلی تا متابولیت های ثانویه پیچیده برای مقاصد مختلف تجاری در قارچ ها تولید می شوند. در نتیجه توانایی بالای آنها برای بیان و ترشح پروتئین ها، قارچ های ریشه ای برای تولید آنزیم های با منشا قارچی و غیر قارچی نیز از اهمیت بالایی برخوردار است. اخیراً آنزیم های تغییر نیافته توسط قارچ ها



4- نتیجه گیری

مطالعات حاضر نشان داد که عصاره های اندوفیت ها حاوی ترکیباتی مانند استروئیدها، کینون ها، فلاونون ها، کومارین ها، ترپن ها، فنول ها، تانن ها، دی ترپن ها، فلاونوئید ها و آلکالوئید ها هستند. نتایج نشان می دهد که استروئید و فلاونوئید در تمام عصاره ها وجود دارد. دی ترپن ها فقط در عصاره G2MB مشاهده شد. بیشترین تعداد ترکیبات فیتو شیمیایی در عصاره قارچ های 44، 20 و G2MB شناسایی شده و کمترین تعداد در عصاره قارچ 13.

5- منابع

- 1-Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Mahaffee, W. F. and Kloepper, J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. J. Microbiol. 43: 895-914
- 2-Hung PQ, Annapurna K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in Soybean (Glycine sp.) and Omonrice. 2004; 12(4): 92-101.
- 3-Chen, S. -J., C. -Y. Cheng and T. -L. Chen (1998). Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. Journal of fermentation and bioengineering, 86(3): 308-312.
- 4-Chakraborty S., Khopade A., Biao R., Jian W., Liu X.Y., Mahadik K., Chopade B., Zhang L., Kokare C. (2011) Characterization and stability studies on surfactant, detergent and oxidant stable α -amylase from marine haloalkaliphilic *Saccharopolyspora* sp. A9. J. Mol. Catal. B- Enzym. 68(1): 52-58.