The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.34, No.4, Sering.70, winter 2021, p. 180-195
Article type: Research paper

فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۴، شماره ۴، پیاپی ۷۰، زمستان ۱۴۰۰، ص ۱۹۵-۱۸۰
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۸

وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir

22051/JAB.2021.34309.1398

جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت تولید کننده ال- آسپاراژیناز از گیاه مریم گلی باغی (*Salvia nemorosa* L.)

سمانه نریمانی[۱]، مصطفی عبادی*[۲]، محمد پاژنگ[۳]، سعید ملائی[۴]

چکیده

آنزیم ال- آسپاراژیناز، تجزیه آسپاراژین را به آسپارتیک اسید و آمونیاک کاتالیز کرده و یکی از مهمترین آنزیم‌ها در صنایع دارویی و غذایی است. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت تولید کننده آنزیم آسپاراژیناز از گیاه مریم گلی باغی و تعیین فعالیت این آنزیم در این قارچ‌ها است. در این پژوهش، گونه‌های مختلف قارچ‌های اندوفیت از برگ‌های سالم جداسازی گردید. سنجش کیفی آنزیم آسپاراژیناز روی محیط کشت آسپاراژین آگار و سنجش کمی آن در محیط کشت سیزپکس داکس به روش طیف نور سنجی با معرف نسلر انجام شد. بررسی‌های ریختی و مولکولی نشان داد جدایه‌ها به جنس‌های Alternaria، Stemphylium، Talaromyces و Linnemannia تعلق دارند. گونه‌های مختلف با ایجاد هاله صورتی تا قرمز رنگ نشان دادند قادر به تولید آنزیم آسپاراژیناز هستند. گونه Alternaria alternata با تولید ۲/۳۴ U/mg آسپاراژیناز ، بهترین جدایه تولیدکننده آنزیم انتخاب شد و می‌تواند به عنوان یک گزینه مناسب برای تولید آنزیم مطرح باشد.

واژه های کلیدی: ال- آسپاراژیناز، تبارزایشی، قارچ‌های اندوفیت، مریم گلی باغی، نسلریزاسیون

۱. دانشجوی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
۲. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز *نویسنده مسئول m.ebadi@azaruniv.ac.ir
۳. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز
۴. استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز

مقدمه

ال- آسپاراژیناز (ال- آسپارژین آمیدوهیدرولاز E.C.3.5.1.1) آنزیمی است که هیدرولیز ال- آسپاراژین را به آسپارتیک اسید و آمونیاک کاتالیز می‌کند (Dhanam & Kannan, 2013). آسپاراژیناز یکی از آنزیم‌های مهم درمانی در درمان انواع لوسمی‌ها نظیر لوسمی لنفوبلاستیک حاد، لنفوسارکوما، لنفومای هوچکین، لنفومای غیرهوچکین و ملانوسارکوما است (Pieters *et al*., 2011). همچنین این آنزیم در صنایع غذایی جهت تولید مواد غذایی فاقد اکریل‌آمید کاربرد فراوانی دارد (Tareke *et al*., 2002; Xu *et al*., 2016). چندین میکروارگانیسم و برخی از گیاهان و جانوران دارای توانایی تولید آسپاراژیناز هستند؛ با این وجود تنها آنزیم‌های خالص‌شده از باکتری‌های *Escherichia coli* و *Erwinia chrysanthemi* به شکل داروهای شیمی‌درمانی موثر برای درمان لوسمی حاد لنفوئیدی و برخی از نئوپلازی‌های بدخیم انسانی که وابسته به آسپاراژین هستند، در دسترس هستند. وربر و همکاران (Werber *et al*., 1995) نشان دادند که فعالیت آسپاراژیناز حاصل از دو باکتری مذکور، در محلول نمکی با اسمولاریته مشابه خون (۰/۹ درصد) به ترتیب ۴۰ و ۸۰ درصد کاهش می‌یابد. این امر به نوبه خود سبب افزایش دوز دارو و در نتیجه بروز حساسیت‌های شدید در برخی بیماران می‌گردد (Larson *et al*., 1998; Oettgen *et al*., 1970). بنابراین، یک نیاز مبرم برای یافتن آسپاراژینازهای جایگزین وجود دارد.

قارچ‌های اندوفیت به قارچ‌هایی اطلاق می‌شود که بدون ایجاد بیماری، تمام یا حداقل بخشی از زندگی خود را در داخل بافت سالم گیاهان بصورت همزیست زندگی می‌کنند (Hyde & Soytong, 2008). قارچ‌های اندوفیت از تنوع زیستی بالایی برخوردار بوده و در گروه‌های مختلف گیاهی اعم از آوندی و غیر آوندی گزارش شده‌اند (Strobel & Daisy, 2003; Weber, 2009). برخی از این قارچ‌ها، رشد میزبان و جذب مواد مغذی را افزایش داده و توانایی گیاه را در تحمل تنش‌هایی مانند خشکسالی و شوری بهبود می‌بخشند (Gupta *et al*., 2021). همچنین آنها با تولید متابولیت‌های ثانویه و القا تولید فیتوالکسین‌ها باعث افزایش مقاومت گیاهان در برابر پاتوژن‌ها، حشرات و گیاه‌خوران می‌شوند (Gao *et al*., 2010).

قارچ‌های اندوفیت به عنوان منبع بالقوه و جدیدی از ترکیبات فعال زیستی شناخته شده‌اند، بطوری‌که این ترکیبات دارای کاربردهای فراوانی در صنایع دارویی، غذایی و کشاورزی هستند. مطالعات متعددی در مورد خواص آنتی‌بیوتیکی، آنتی-ویروسی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی قارچ‌های اندوفیت انجام شده است (Sandhu *et al*., 2014; Selim *et al*., 2012; Jalgaonwala *et al*., 2011). نتایج حاصل نشان داده که قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاهان دارویی منابع ارزشمندی برای مطالعه اندوفیت‌ها هستند چرا که قارچ‌های جدا شده از گیاهان دارویی از تنوع زیستی و پتانسیل بالایی برای تولید انبوهی از ترکیبات فعال زیستی برخوردار هستند.

گیاه مریم گلی باغی با نام علمی *Salvia nemorosa* L. یکی از گیاهان دارویی است که در طب سنتی از دیرباز برای درمان بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود (Takeda, 1997; Ulubelen, 2003; Daskalova, 2004). مطالعات اخیر نشان داده

که این گیاه دارای ترکیبات ارزشمندی نظیر ترپنوئیدها و ترکیبات فنلی است (Fotovvat *et al*., 2018; Tabei & Alizadeh, 2018; Heydari *et al*., 2020). برخی از این ترکیبات، ساختار فنلی دارند که تولید تجاری آن‌ها از طریق سنتز شیمیایی، پر هزینه و در برخی از موارد غیرممکن است و بنابراین شناسایی قارچ‌های اندوفیت این گیاه و بررسی حضور ترکیبات فعال در آن‌ها می تواند بسیار مفید واقع گردد.

با توجه به اهمیت آسپاراژیناز به‌عنوان یک آنزیم مهم در درمان بیماری‌هایی نظیر سرطان و همچنین صنایع غذایی و نیاز روز افزون به این آنزیم، مطالعه برای شناسایی قارچ‌های تولید کننده این آنزیم امری بسیار ضروری است. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی جدایه‌های اندوفیت قارچی از گیاه دارویی *S. nemorosa* و بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید آسپاراژیناز است.

مواد و روش‌ها

جداسازی جدایه‌های قارچی

نمونه‌های گیاهی مورد مطالعه در این بررسی، خرداد سال ۱۳۹۸ از منطقه زنوز واقع در استان آذربایجان شرقی جمع آوری و برای بررسی بیشتر به آزمایشگاه منتقل شد. از هر بوته بصورت تصادفی تعداد ۵ عدد برگ تازه و سالم برداشته شد و به قطعات یک سانتی‌متری تقسیم شده و به مدت ۱۰ دقیقه با آب جاری شست‌وشو داده شدند. سپس با اتانول۷۰ درصد به مدت یک دقیقه استریل شدند و بعد از آن با آب مقطر شست‌وشو داده شدند. در مرحله بعد قطعات با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه استریل شدند و در آخر سه بار با آب مقطر شست‌وشو داده شدند و در زیر هود بیولوژیک بر روی کاغذ صافی خشک گردیدند. قطعات استریل شده در زیر هود بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (س. د. آ) (PDA: Potato Dextrose Agar) قرار داده شدند (در هر پلیت سه قطعه با فاصله مناسب از هم قرار داده شد) و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز نگهداری شدند. بعد از گذشت ۵ روز، جدایه‌های رشد کرده به محیط جدید س. د. آ منتقل شدند و با استفاده از روش کشت نوک ریسه، جدایه‌ها خالص شدند.

شناسایی ریختی و مولکولی جدایه‌ها

به منظور بررسی ویژگی‌های مربوط به پرگنه جدایه‌های قارچی، ابتدا تمامی جدایه‌ها به مدت هفت روز روی محیط کشت س. د. آ در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس رشد داده شدند. پس از طی مدت زمان معین، شکل ظاهری پرگنه و رنگ آن، ویژگی‌های رشدی، ویژگی‌های مربوط به اسپورها، کنیدیوفر و غیره به منظور بهره‌گیری در شناسایی جدایه‌ها ارزیابی شدند. اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از محلول‌های لاکتوفنل و لاکتوفنل-کاتن بلو تهیه شده و با میکروسکوپ نوری الیمپوس

(Olympus, Japan) مدل BH2 بررسی شدند. شناسایی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Perez & Schenck, 1990; Barnett & Hunter, 1998; Carris *et al*., 2012) صورت گرفت.

به منظور شناسایی مولکولی، ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز براث (س. د. ب) (PDB: Potato Dextrose Broth) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز نگهداری شدند. سپس زیست توده قارچی با استفاده از کاغذ صافی استریل از محیط کشت جدا شد و استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد (Ebadi *et al*., 2014). واکنش PCR برای توالی ناحیه فاصله‌انداز رونویسی‌شونده داخلی (ITS) با پرایمرهای ITS1 و ITS4 انجام گرفت. واکنش PCR با حجم نهایی ۴۵ میکرولیتر شامل ۲۵ میکرولیتر Master mix، ۱۵ میکرولیتر آب، ۳ میکرولیتر DNA الگو و یک میکرولیتر از هر پرایمر در دستگاه ترموسایکلر با شرایط دمایی 94°C-5 ، 35×(94°C-1, 55°C-1, 72°C-1) و 72°C-10″ انجام شد. محصول PCR جهت تعیین ترادف به شرکت پیشگام ارسال شد و نتایج تعیین ترادف از طریق همردیفی توالی در بانک ژنی مورد ارزیابی قرار گرفت. درخت تبارزایشی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 بر پایه روش Neighbor-Joining با ۱۰۰۰ تکرار Bootstarp ترسیم شد.

سنجش کیفی تولید آسپاراژیناز

به منظور بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید آسپاراژیناز از محیط کشت حداقل آسپاراژین آگار که شامل ۱ درصد آسپاراژین، ۰/۰۵ درصد کلرید پتاسیم، ۰/۰۵ درصد سولفات منیزیم، ۰/۰۲ درصد کلرید سدیم، ۰/۰۱۲ درصد فنل رد و ۱/۵ درصد آگار استفاده شد. در همین راستا، یک قطعه به قطر ۶ میلی‌متر از حاشیه فعال هر جدایه قارچی (کشت هفت روزه)، در مرکز محیط کشت حاوی محیط مذکور قرار داده شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ روز نگهداری گردید.

سنجش کمی تولید آسپاراژیناز

فعالیت آنزیم آسپاراژیناز در محیط کشت سیزپکس داکس به روش طیف نورسنجی با معرف نسلر انجام شدکه این روش توسط Imada و همکاران (۱۹۷۳) پیشنهاد شده است. در این روش، میزان فعالیت آنزیم آسپاراژیناز بر اساس میزان هیدرولیز آسپاراژین در محیط سنجیده می‌شود و میزان هیدرولیز آسپاراژین نیز از طریق اندازه‌گیری میزان آمونیاک آزاد شده در واکنش مشخص می‌گردد. بدین منظور، دو قطعه به قطر ۶ میلی‌متر از حاشیه فعال هر جدایه قارچی (کشت هفت روزه)، به ۱۰۰میلی‌لیتر محیط‌کشت س. ز. د تلقیح شد و به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. جهت تعیین فعالیت آنزیم، ابتدا ۲ میلی لیتر از عصاره خام حاوی آنزیم به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی حاوی آنزیم از باقی مانده‌های سلولی (رسوب) جدا شده و جهت تعیین فعالیت مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، ۵۰۰ میکرولیتر محلول آسپاراژین ۰/۰۴ مولار، ۸۰۰ میکرولیتر بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار (pH۸) به ۲۰۰ میلی‌لیتر

محلول رویی اضافه و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس واکنش آنزیمی با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱/۵ مولار متوقف و با سانتریفیوژ به مدت ده دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، پروتئین‌های رسوبی حذف و از محلول‌رویی آن برای انجام واکنش نسلریزاسیون استفاده شد. به ۱۲۵ میکرولیتر محلول‌رویی، یک میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۲۵ میکرولیتر معرف نسلر اضافه شد و پس از دو دقیقه گرماگذاری در دمای اتاق، جذب آن در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از نمودار استاندارد تهیه شده با غلظت‌های مختلف آمونیوم سولفات، میزان جذب به غلظت آمونیاک آزاد شده تبدیل شد. همچنین قابل ذکر است، یک واحد فعالیت آسپارارژینازی معادل مقداری از آنزیم است که بتواند یک میکرومول آمونیاک در یک دقیقه ایجاد نماید. سنجش محلول پروتئینی جهت یافتن غلظت پروتئین موجود در محلول به روش برادفورد و با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA) صورت گرفت (Pour Nouroozi, 2015).

قابل ذکر است جهت بررسی احتمال اثر مواد متابولیکی بر روی دآمیده شدن آسپاراژین، در یک تست دیگر از سوبسترای گلوتامین که مشابه آسپاراژین است استفاده شد و با واکنش نسلر میزان تولید آمونیاک در آن نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که مواد متابولیکی (و آنزیمی) موجود در محیط کشت سلولی در شرایط مورد بررسی، گلوتامین را دآمیده نکرده‌اند. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که فعالیت مشاهده شده در مورد آسپاراژین بر اثر فعالیت آنزیم آسپاراژیناز است.

اندازه‌گیری Km و Vmax آنزیم آسپاراژیناز

به منظور اندازه‌گیری پارامترهای سنتتیکی آنزیم، ثابت میکائیلیس- منتن (Km) و سرعت بیشینه آنزیم (Vmax) برای گونه‌ای که دارای بیشترین فعالیت آنزیمی بود محاسبه شد. بدین منظور، غلظت‌های مختلف آمینواسید آسپارژین در بافر Tris-HCl با pH معادل هفت تهیه شد و فعالیت آنزیم در آن غلظت‌ها اندازه‌گیری شد. سپس با رسم نمودارهای میکائیلیس- منتن و لینویور-برک، پارامترهای مدنظر اندازه گیری شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد و جهت تجزیه و تحلیل آماری اعداد و مقایسه میانگین‌ها از نرم‌افزار SPSS (ver. 17) و روش تحلیل واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) استفاده شد.

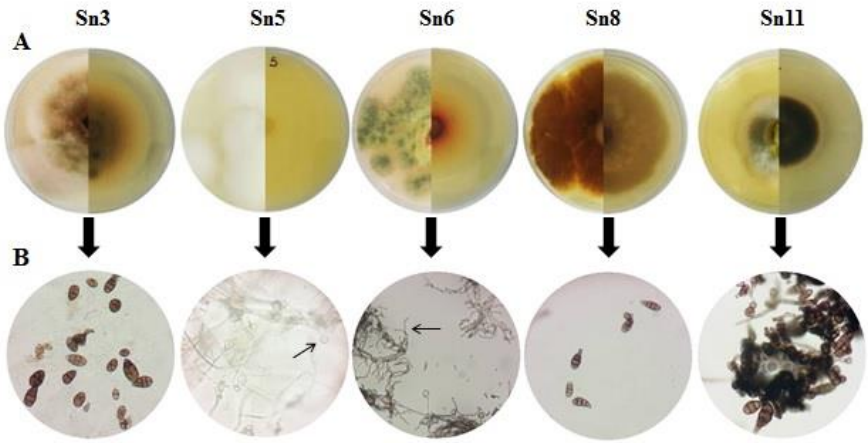
نتایج

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مریم گلی باغی با برخی از قارچ‌های اندوفیت دارای رابطه همزیستی است. بطور کلی ۲۷ جدایه از برگ‌های گیاه مورد مطالعه جداسازی شد که به لحاظ شکل و ظاهر پرگنه با یکدیگر شباهت‌ها و تفاوت‌هایی داشتند و با توجه به شباهت‌های ریختی، جدایه‌ها گروه‌بندی شدند و از هر گروه یک یا چند جدایه برای مطالعات بعدی انتخاب شدند.

بررسی خصوصیات ریختی نشان داد سرعت رشد و شکل پرگنه، رنگ سطح زیرین و فوقانی آن، نوع میسلیوم هوایی و همچنین نوع اسپور در جدایه‌های مورد مطالعه متفاوت است (جدول ۱، شکل۱). با استفاده از کلیدهای شناسایی مشخص شد که جدایه‌ها به جنس‌های *Alternaria* و آرایه‌های شبیه به آن نظیر *Stemphylium*، *Penicillium* و *Linnemannia* تعلق دارند. ویژگی بارز جنس *Alternaria* داشتن زنجیره‌های کنیدیومی و کنیدیوم‌های چند سلولی با دیواره‌های طولی و عرضی است که در جدایه‌های Sn2، Sn3، Sn8 و Sn9 این ویژگی‌ها قابل تشخیص هستند (شکل۱). جنس *Stemphylium* شباهت بسیار زیادی به جنس *Alternaria* داشته و تکثیر متوالی کنیدیوفور، اساسی‌ترین ویژگی ریخت‌شناسی در تفکیک این جنس از *Alternaria* است (جدایه Sn11) .جنس *Linnemannia* دارای ریسه سنوسیتیک بوده و در مقایسه با جنس *Mucor*، این جنس دارای اسپورانژیوسپورهای کوچکتر، تعداد کمتر و فاقد کلوملا شناخته می‌شود (جدایه Sn5). جدایه Sn6 نیز با توجه به ویژگی‌های ریختی پرگنه و همچنین دارا بودن کنیدیوم‌های تک سلولی شباهت بالایی به جنس *Penicillium* داشت.

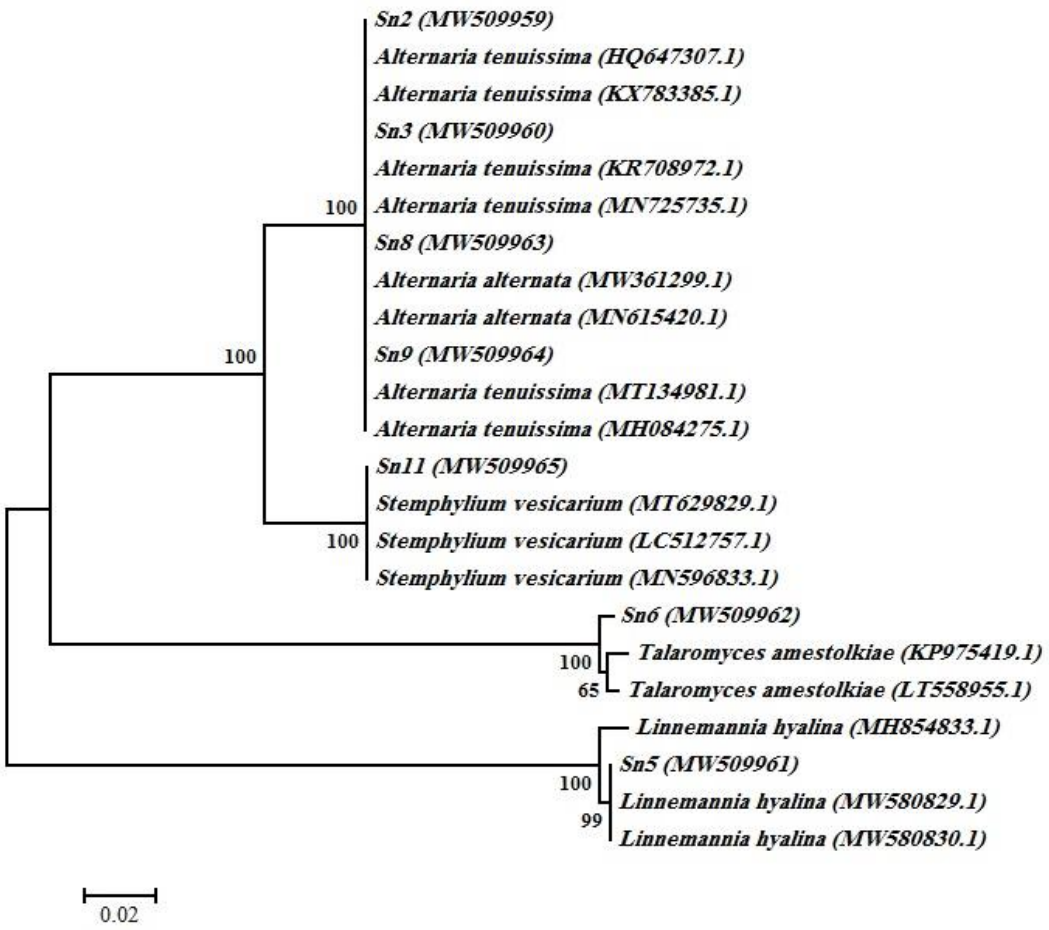
جدول ۱: خصوصیات ریختی جدایه‌های قارچی مورد مطالعه روی محیط کشت س. د. آ پس از گذشت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس

	خصوصیات ریخت شناسی					
	قطر پرگنه (میلی متر)	شکل پرگنه	رنگ سطح زیرین	رنگ سطح فوقانی	نوع میسلیوم هوایی	نوع اسپور
Sn2	۳۸	دایره‌ای	خاکستری	خاکستری	کرک‌دار	کنیدیوم چند سلولی
Sn3	۳۷	دایره‌ای	خاکستری	سفید خاکستری	کرک‌دار	کنیدیوم چند سلولی
Sn5	۷۰	دایره‌ای	نخودی	سفید	پنبه ای	اسپورانژیوسپور
Sn6	۴۳	نامنظم	هلویی	سبز	متراکم	کنیدیوم تک سلولی
Sn8	۴۸	نامنظم	قهوه‌ای	قهوه‌ای	متراکم	کنیدیوم چند سلولی
Sn9	۴۰	دایره‌ای	خاکستری	خاکستری	کرک‌دار	کنیدیوم چند سلولی
Sn11	۲۹	دایره‌ای	سبز تیره	سفید	کرک‌دار	کنیدیوم چند سلولی



شکل۱: A: سطح پشتی و رویی پرگنه جدایه‌های قارچی روی محیط س. د. آ (کشت ۷ روزه، دمای ۲۵ درجه سلسیوس). B: اسپورهای تولید شده توسط هر جدایه بر روی محیط س. د. آ

برای ناحیه ژنومی rDNA-ITS یک توالی به طول حدود ۶۵۰ جفت باز تکثیر شد. تعیین توالی ناحیه ITS و مقایسه با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی با استفاده از روش NJ، نشان داد که جدایه‌های مورد مطالعه در چهار کلاد اصلی قرار گرفتند (شکل ۲). در این تبارنما، جدایه‌های Sn2, Sn3, Sn8 و Sn9 با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰درصد متعلق به دو گونه *Alternaria tenuissima* و *A. alternata* بودند. جدایه Sn5 با درجه اعتبار سنجی ۹۹ درصد همراه با جدایه‌های تیپ گونه *Linnemannia hyalina* در یک کلاد دیگر قرار گرفت. همچنین، تبارزایی جدایه‌های Sn6 و Sn11 نشان داد این گونه‌ها با درجه اعتبار سنجی ۱۰۰درصد به ترتیب متعلق به *Talaromyces amestolikae* و *Stemphylium vesicarium* بودند. توالی‌های مورد مطالعه با شماره دسترسی MW509959-65 در بانک ژنی NCBI ثبت گردید.

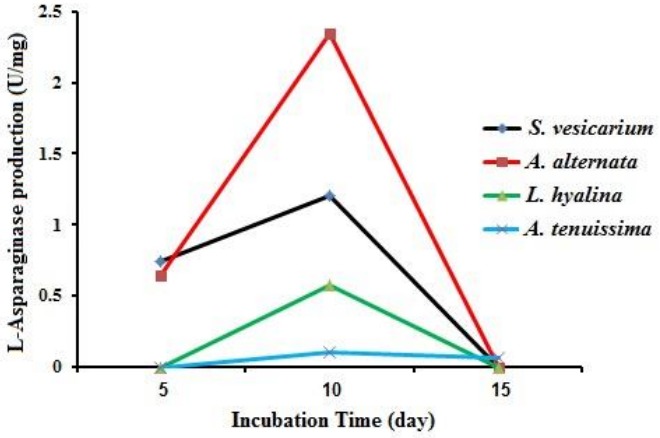


شکل ۲: درخت تبارزایشی مربوط به نواحی ITS جدایه‌های اندوفیتی مورد مطالعه با روش Neighbor-Joining و با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap

نتایج غربالگری توانایی جدایه‌ها برای تولید آنزیم آسپاراژیناز نشان داد که تمامی گونه‌ها بجز گونه *T. amestolkiae* هاله قرمز مایل به صورتی بر روی محیط حاوی فنل رد ایجاد کردند (شکل ۳). با تولید آسپاراژیناز خارج سلولی توسط این گونه‌ها، آسپاراژین موجود در محیط به آسپارتیک اسید و آمونیاک تجزیه و محیط قلیایی می‌گردد. بدلیل وجود فنل قرمز، محیط کشت در شرایط قلیایی به صورتی تا قرمز تغییر رنگ می‌دهد و هاله قرمز نشانه تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط گونه‌ها است (شکل ۳).

شکل ۳: سنجش کیفی تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط قارچ‌های اندوفیت حاصل از گیاه *S. nemorosa*

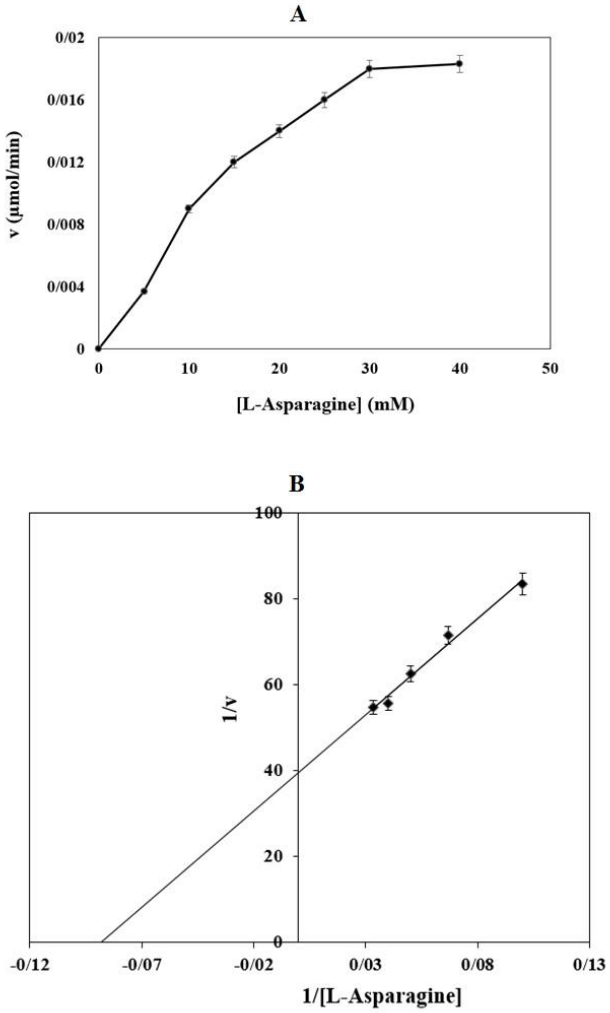
بر اساس نتایج مرحله قبل، توان تولید آنزیم آسپاراژیناز توسط چهار گونه *A. alternata* ، *L. hyalina*، *A. tenuissima* و *S. vesicarium* در طی روزهای مختلف در محیط سیزپکس داکس حاوی آسپاراژین به عنوان تنها منبع نیتروژن مورد بررسی قرار گرفتند. شکل ۴ نشان دهنده‌ی فعالیت آنزیمی اندازه‌گیری شده برای این چهار گونه بعد از مدت پنج، ده و پانزده روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس است. بر اساس نتایج حاصل بعد از طی ۵ روز گونه‌های *A. alternata* و *S. vesicarium* با تولید U/mg ۲/۳۴ و U/mg ۱/۲۵به ترتیب دارای بیشترین میزان تولید آنزیم بودند. حداکثر تولید آنزیم توسط گونه‌های مختلف در روز دهم مشاهده شد و گونه *A. alternata* با تولید U/mg ۲/۳۴ آنزیم به عنوان گونه منتخب برای ادامه مطالعات انتخاب گردید.



شکل ۴: میزان فعالیت آنزیمی جدایه‌های منتخب تولیدکننده آسپاراژیناز طی روزهای مختلف.

ویژگی‌های سنتتیکی آنزیم مربوط به گونه *A. alternata*، در غلظت‌های مختلف از سوبسترا بررسی شد و نتایج آن بصورت نمودارهای میکائیلیس- منتن و لینویور- برک در شکل شماره ۵ نشان داده شده‌است. پارامترهای Km و Vmax نیز با

استفاده از نمودارهای مذکور اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد مقدار Km حاصل برای آنزیم برابر با ۲۴/۲۷ میلی‌مولار و مقدار Vmax حاصل برابر با ۰/۰۲۵ میکرومول بر دقیقه بود.



شکل ۵- نمودارهای میکائیلیس- منتن (A) و لینویور- برک (B) مربوط به آنزیم تولید شده توسط جدایه Sn3 (*A. alternata*) در غلظت‌های مختلف ال- آسپاراژین

بحث

شناسایی قارچ‌ها بدلیل تنوع بالای آن‌ها و همچنین شباهت مورفولوژیکی بین گونه‌های مختلف امری دشوار است. بنابراین علاوه بر شناسایی مورفولوژیک قارچ‌ها، استفاده از تبارزایی مولکولی برای شناسایی دقیق گونه‌های قارچی بسیار حائز اهمیت است. سیستم‌های بارکدگذاری DNA از یک منطقه استاندارد کوتاه (بین ۴۰۰ تا ۸۰۰ جفت پایه) برای شناسایی گونه‌ها استفاده می‌کنند. ناحیه ITS یکی از مارکرهای مولکولی مهم با بالاترین احتمال شناسایی صحیح است که بطور قابل ملاحظه‌ای برای گروه وسیعی از قارچ‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Lacap *et al*., 2003). در این پژوهش، با توجه به نتایج آنالیز تبارزایشی، جدایه‌های Sn5، Sn6 و Sn11 در کلادهای مجزا قرار گرفتند و جایگاه دقیق تاکسونومیکی آنها بر اساس ناحیه ITS میسر شد.

در حالی‌که، جدایه‌های Sn2، Sn3، Sn8 و Sn9 که متعلق به دو گونه *A. alternata* و *A. tenuissima* بودند در یک کلاد قرار گرفتند و بنابراین، ناحیه ITS اگرچه توانست جایگاه تاکسونومیکی این جدایه‌ها را نشان دهد، ولی قادر به تفکیک دو گونه مذکور از هم نبود. مشابه به این یافته، Zhao و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای که بر روی گونه‌های مختلف *Alternaria* انجام دادند تمایز میان *A. alternata* و *A. tenuissima* بر اساس ناحیه ITS امکان‌پذیر نیست و صفات مورفولوژیکی برای تشخیص این دو گونه از هم می‌تواند بسیار مفید باشد. آنها نشان دادند رنگ سطح پشتی پرگنه گونه‌های *A. alternata* و *A. tenuissima* در محیط س. د. آ به ترتیب سبز زیتونی و خاکستری تا قهوه‌ای تیره است. همچنین زنجیره کنیدیومی گونه *A. alternata* دارای دو تا سه شاخه جانبی بوده درحالی‌که زنجیره کنیدیومی گونه *A. tenuissima* با یک یا دو شاخه جانبی همراه است. بنابراین، با توجه به ویژگی‌های موفولوژیکی، در این مطالعه جدایه Sn8 متعلق به گونه *A. tenuissima* و جدایه‌های Sn2، Sn3 و Sn9 متعلق به گونه *A. alternata* تشخیص داده شد. به غیر از گونه *L. hyalina* (متعلق به شاخه Mucoromycota) سایر گونه‌های بدست آمده در این مطالعه متعلق به شاخه Ascomycota بودند، بطوری‌که در مطالعات قبلی نیز چیرگی گونه‌های شاخه Ascomycota به عنوان اندوفیت گیاهان نشان داده شده‌است.

در مطالعات پیشین گونه *L. hyalina* به عنوان اندوفیت از گیاهان مختلفی نظیر *Elaeocarpus sphaericus* و *Arabidopsis thaliana* جداسازی شده‌است. در این مطالعات نشان داده شد که *L. hyalina* هم در سنتز فیتوهورمون‌هایی نظیر اندول استیک اسید (IAA) موثر بوده و باعث افزایش رشد گیاه میزبان می‌شود و هم باعث مهار بیماری ایجاد شده توسط پاتوژن می‌گردد (Shukla *et al*., 2012; Johnson *et al*., 2019; Ozimek & Hanaka, 2021).

در مطالعه‌ای که بر روی ترکیب جوامع اندوفیتی گیاه *Aristolochia chilensis* در اکوسیستم خشک صورت گرفت گونه‌های *S. vesicarium* و *T. amestolkiae* به عنوان اندوفیت جداسازی و شناسایی شدند (Guevara-Araya *et al*., 2020). در مطالعات مختلف حضور ترکیبات فعال نظیر مروترپنوئید و خواص ضدباکتریایی و ضد التهابی گونه *T. amestolkiae* نشان داده شده‌است (Chen *et al*., 2016; Chen *et al*., 2018; Fu *et al*., 2020). مطالعات گسترده‌ای در مورد جداسازی و شناسایی گونه‌های *A. alternata* و *A. tenuissima* از گیاهان مختلف صورت گرفته و خواص بیولوژیکی متعددی نظیر آنتی‌اکسیدان، ضدباکتریایی، سمیت سلولی، آفت‌کش و فعالیت پروتئازی برای آنها نشان داده شده است (Fang *et al*., 2012; Wu *et al*., 2014; Bhagat *et al*., 2016; Fernandes *et al*., 2009; Sudharshana *et al*., 2019). نتایج نشان داد بجز گونه *T. amestolikae*، سایر گونه‌ها دارای توانایی تولید آسپاراژیناز بودند. در مطالعات قبلی نیز توانایی تولید آسپاراژیناز توسط برخی از اندوفیت‌های گیاهان دارویی *A. alternata* و *S. vesicarium* نشان داده شده بود (Moharram *et al*., 2016; Hatamzadeh *et al*., 2020).

نتایج مطالعات قبلی نشان داده‌است که تولید حداکثری آنزیم، به عوامل مختلفی مانند منبع کربن و میزان pH محیط کشت و نیز دما و زمان انکوباسیون وابسته است. در کنار بررسی این عوامل، خالص سازی کامل آنزیم جهت مقایسه دقیق عوامل

و همچنین مطالعه پایداری و نیمه عمر آنزیم ضروری به نظر می رسد. در این پژوهش پس از غربال سازی جدایه‌ها، با توجه به کوتاه بودن زمان تولید و بیش‌ترین میزان تولید آنزیم، گونه *A. alternata* به عنوان یک گزینه مناسب برای تولید آسپارازیناز معرفی می‌شود و با توجه به اهمیت و کاربرد آنزیم آسپاراژیناز در صنایع دارویی و غذایی، امکان استفاده از نتایج پژوهش حاضر برای مطالعات بعدی وجود دارد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از دانشگاه شهید مدنی آذربایجان بدلیل حمایت مالی تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

منابع

Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1998). The Illustrated Genera of Imperfect Fungi, fourth edition. Aps Press, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota 218 p.

Bhagat, J., Kaur, A., Kaur, R., Yadav, A.K., Sharma, V., Chadha, B.S. (2016). Cholinesterase inhibitor (Altenuene) from an endophytic fungus *Alternaria alternata*: optimization, purification and characterization. Journal of applied microbiology, 121(4): 1015-25.

Carris, L.M., Little, C.R., Stiles, C.M. (2012). Introduction to Fungi. The Plant Health Instructor.

Chen, S., Ding, M., Liu, W., Huang, X., Liu, Z., Lu, Y., Liu, H., She, Z. (2018). Anti-inflammatory meroterpenoids from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* YX1. Phytochemistry, 146: 8-15.

Chen, S., Liu, Y., Liu, Z., Cai, R., Lu, Y., Huang, X., She, Z. (2016). Isocoumarins and benzofurans from the mangrove endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* possess α-glucosidase inhibitory and antibacterial activities. RSC advances,6(31): 26412-20.

Daskalova, T. (2004). On some specificities of seed formation in *Salvia nemorosa* (Lamiaceae). Phytologia Balcanica, 10: 79-84.

Dhanam, J.G., Kannan, S. (2013). L-asparaginase- Types, perspectives and applications. Advanced Biotech, 13(5): 1-5.

Ebadi, M., Riahi, H., Zare, R. (2014). Genetic diversity of *Fusarium semitectum* isolates from rice, using RAPD and REP-PCR markers. Mycologia Iranica, 1(1): 19-26.

Fang, Z.F., Yu, S.S., Zhou, W.Q., Chen, X.G., Ma, S.G., Li, Y., Qu, J. (2012). A new isocoumarin from metabolites of the endophytic fungus *Alternaria tenuissima* (Nees & T. Nees: Fr.) Wiltshire. Chinese Chemical Letters, 23(3): 317-20.

Fernandes, M.D., Pfenning, L.H., Costa-Neto, C.M., Heinrich, T.A., Alencar, S.M., Lima, M.A., Ikegaki, M. (2009). Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 45(4): 677-85.

Fotovvat, M., Radjabian, T., Saboora, A. (2018). HPLC fingerprint of important phenolic compounds in some *Salvia* L. species from Iran. Records of Natural Products, 13(1).

Fu, Y., Li, C., Zhu, J., Zhang, L., Wang, Y., Chen, Q., Xu, L., Zhang, S., Fang, Y., Liu, T. (2020). A new meroterpenoid from endophytic fungus *Talaromyces amestolkiae* CS-O-1. Biochemical Systematics and Ecology, 93: 104186.

Gao, F.K., Dai, C.C., Liu, X.Z. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. African Journal of. Microbiology Research, 4 (13): 1346-1351.

Guevara-Araya, M.J., Vilo, C., Urzúa, A., González-Teuber, M. (2020). Differences in community composition of endophytic fungi between above-and below-ground tissues of *Aristolochia chilensis* in an arid ecosystem. Revista Chilena de Historia Natural, 93:1-9.

Gupta, S., Schillaci, M., Walker, R., Smith, P.M., Watt, M. and Roessner, U. (2021). Alleviation of salinity stress in plants by endophytic plant-fungal symbiosis: current knowledge, perspectives and future directions. Plant and Soil, 461(1): 219-244.

Hatamzadeh, S., Rahnama, K., Nasrollahnejad, S., Fotouhifar, K.B., Hemmati, K., White, J.F., Taliei, F. (2020). Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from the Asteraceae family plant species of Iran. Peer-reviewed Journal, 8: e8309.

Heydari, H.R., Chamani, E., Esmaielpour, B. (2020). Cell line selection through gamma irradiation combined with multi-walled carbon nanotubes elicitation enhanced phenolic compounds accumulation in *Salvia nemorosa* cell culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 142(2): 353-367.

Hyde, K.D., Soytong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. Fungal Diversity, 33: 163-173.

Jalgaonwala, R.B., Mohite, B.V., Mahajan, R.T. (2011). Natural products from plant associated endophytic fungi: a review. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 1: 21-32.

Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K., Isono, M. (1973). Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. Journal of General Microbiology, 76: 85-99.

Johnson, J.M., Ludwig, A., Furch, A.C., Mithöfer, A., Scholz, S., Reichelt, M., Oelmüller, R. (2019). The beneficial root-colonizing fungus *Mortierella hyalina* promotes the aerial growth of Arabidopsis and activates calcium-dependent responses that restrict *Alternaria brassicae*–Induced disease development in roots. Molecular Plant-Microbe Interactions, 32(3):351-63.

Lacap, D.C., Hyde, K.D., Liew, E.C.Y. (2003). An evaluation of the fungal 'morphotype' concept based on ribosomal DNA sequences. Fungal Divers, 12: 53-66.

Larson, R.A., Fretzin, M.H., Dodge, R.K., Schiffer, C.A. (1998). Hypersensitivity reactions to L-asparaginase do not impact on the remission duration of adults with acute lymphoblastic leukemia. Leukemia, 12: 660-665.

Moharram, A., Zohri, A.N., Seddek, N. (2016). L-Asparaginase production by endophytic fungi isolated from *Withania Somnifera* in Egypt. SS International Journal of Multidisciplinary Research, 2: 30-40.

Oettgen, H.F., Stephenson, P.A., Schwartz, M.K., Leeper, R.D., Tallal, L., Tan, C.C., et al. (1970). Toxicity of E. coli L-asparaginase in man. Cancer, 25: 253-278.

Ozimek, E., Hanaka, A. (2021). Mortierella Species as the Plant Growth-Promoting Fungi Present in the Agricultural Soils. Agriculture, 11(1): 7.

Pieters, R., Hunger, S.P., Boos, J., Rizzari, C., Silverman, L., Baruchel, A., et al. (2011). L-Asparaginase treatment in acute lymphoblastic leukemia. Cancer, 117(2): 238-249.

Perez, Y., Schenck, N. (1990). A unique code for each species of VA mycorrhizal fungi. Mycologia, 82: 256-260.

Pour Nouroozi, R. (2015). Determination of protein concentration using bradford microplate protein quantification assay. International Electronic Journal of Medicine, 4: 11-17.

Sandhu, S.S., Kumar, S., Aharwal, R.P. (2014). Isolation and identification of endophytic fungi from *Ricinus communis* linn and their antibacterial activity. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry, 4 (3): 611-618.

Selim, K.A., El-Beih, A.A., AbdEl-Rahman, T.M., El-Diwany, A.I. (2012). Biology of endophytic fungi. Current Research in Environmental & Applied Mycology, 31-82.

Shukla, A.K., Yongam, Y., Tripathi, P. (2012). Distribution of endophytic fungi in different parts of rudraksh (*Elaeocarpus sphaericus*) plants. Microbes: diversity and biotechnology. New Delhi: Daya Publishing House, 37-42.

Strobel, G., Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67 (4): 491–502.

Sudharshana, T.N., Venkatesh, H.N., Nayana, B., Manjunath, K., Mohana, D.C. (2019). Anti-microbial and anti-mycotoxigenic activities of endophytic *Alternaria alternata* isolated from Catharanthus roseus (L.) G. Don.: molecular characterisation and bioactive compound isolation. Mycology,10(1): 40-8.

Tabei, S. M., Alizadeh, A. (2018). Phytochemical constituents and antimicrobial activity of *Salvia*. Bangladesh Journal of Botany, 47(4): 847-854.

Takeda, Y., Zhang, H., Matsumoto, T., Otsuka, H., Oosio, Y., Honda, G., Tabata, M., Fujita, T., Sun, H., Sezik, E. and Yesilada, E. (1997). Megastigmane glycosides from *Salvia nemorosa*. Phytochemistry, 44(1): 117-120.

Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated food stuffs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(17): 4998-5006.

Ulubelen, A. (2003). Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. Phytochemistry, 64(2): 395-399.

Weber, D. (2009). Endophytic fungi, occurrence and metabolites. In: Anke, T., Weber, D. (eds). The Mycota. Vol. XV, Physiology and Genetics selected basis and applied aspects springer- Verlag, Berlin, Germany, pp. 153-195.

Werber, G., Ahlke, E., Nowak-Göttl, U., Jürgens, H., Verspohl, E,J., Boos, J. (1995). Asparaginase activities in vitro are highly sensitive to different buffer conditions. In: Büchner T., Schellong G., Ritter J., et al., editors. Acute Leukemias VI. Berlin, Heidelberg: Springer, Berlin, Heidelberg, 512-516.

Wu, W.B., Yue, G.C., Huang, Q.L., Sun, L.L., Zhang, W. (2014). A new compound from an endophytic fungus *Alternaria tenuissima*. Journal of Asian Natural Products Research,16(7): 777-82.

Xu, F., Oruna-Concha, M.J., Elmore, J.S. (2016). The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. Food Chemistry, 210: 163-171.

Zhao, J., S. W. Bao, G. P. Ma, and X. H. Wu. (2016). Characterization of *Alternaria* species associated with watermelon leaf blight in Beijing municipality of China. Journal of Plant Pathology, 135-138.

Isolation and identification of L-asparaginase-producing endophytic fungi from *Salvia nemorosa* L.

S. Narimani[1], M. Ebadi[2], M. Pazhang[3], S. Mollaei[4]

Received: 2021.6.7

Accepted: 2021.7.19

Abstract

L-asparaginase is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of asparagine into aspartic acid and ammonia and is one of the most important enzyme in the pharmaceutical and food industries. The goal of this study was the isolation and identification of asparaginase producing endophytic fungi from *Salvia nemorosa* and the determination of their enzyme activities. In this study, different species of endophytic fungi were isolated from healthy leaves. A qualitative assay of asparaginase enzyme was performed on asparagine agar medium and its quantitative assay was performed on Czapexdox's medium by spectroscopic method with Nessler reagent. Morphological and molecular investigations indicated that the isolates belonged to genera of *Alternaria*, *Stemphylium*, *Talaromyces*, and *Linnemannia*. Different species were shown to be able to produce the asparaginase by creating a pink to a red color zone. *Alternaria alternata* was selected as the best enzyme-producing, isolated by producing 2.34 U/mg asparaginase, and could be considered as a potential source for enzyme production.

Keywords: Endophytic fungi, L-asparaginase, Nesslerization, Phylogenetic, , S. nemorosa.

1. MSC, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz
2. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz (*Corresponding author: m.ebadi@azaruniv.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz
4. Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz