فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره۳، پیاپی ۷۳، پاییز ۱۴۰۱، ص ۹۸-۸۹
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.3, Sering.72, Fall 2022, p. 89 - 98
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۳۱
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.34309.1398

شناسایی و سنجش محتوای اسیدهای فنلی در قارچ‌های اندوفیت جدا شده از *avellana Corylus* L.

نرجس محمدی بلکوتی[۱] فائزه قناتی*[۲] سعیده وزیری فر[۳]

چکیده

مقدمه: *سینامیک اسید، کوماریک اسید ، فرولیک اسید ، کافئیک اسید از جمله مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید هستند. این ترکیبات فنلی دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی هستند. گزارشات اندکی در مورد محتوا و نوع آنها در قارچ‌های اندوفیت ثبت شده است. تحقیق حاضر به شناسایی و معرفی قارچ‌های اندوفیت از گیاه فندق (Corylus avellana) و نوع و محتوای اسیدهای فنلی آنها پرداخته است.*

مواد و روش‌ها: *شناسایی مولکولی قارچ‌ها براساس آغازگرهای ITS، حضور و مقدار تولید مشتقات سینامیک اسید به روش HPLC انجام شد.*

نتایج و بحث: *۱۲ قارچ اندوفیت سنتز کننده اسیدهای فنلی شناسایی و مقدار تولید هر کدام از ترکیبات ذکر شده در محیط درون سلولی و برون سلولی اندازه‌گیری شد. قارچ Alternaria sp. بیشترین مقدار سینامیک اسید و کافئیک اسید (به ترتیب ۳۰۳ µg/g Fw و ۱۷ µg/g Fw) را تولید کرد. هم‌چنین درصد رهاسازی اسیدهای فنلی به محیط در دو قارچ Fusarium sp. و Stemphylium sp. صد در صد بود که حاکی از آسانی و راندمان بالا در فرایند استخراج در مقیاس تجاری است.*

واژه های کلیدی: فرولیک اسید، قارچ‌های اندوفیت، کافئیک اسید، کوماریک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید

---

۱. دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۲ . استاد، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران(*نویسنده مسئول : ghangia@modares.ac.ir)
۳. دانش‌آموخته دکتری فیزیولوژی گیاهی، گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

مقدمه

اسیدهای فنلی که جزء حیاتی رژیم غذایی انسان محسوب می‌شوند دارای طیف وسیعی از خواص آنتی اکسیدانی، بیولوژیکی و دارویی مانند ضد التهابی، ضد سرطانی، ضد حساسیتی، ضد ویروسی، محافظ کبدی، افزودنی غذایی می‌باشند (Wahle *et al*., 2010) اصطلاح "اسیدهای فنلی" به طور کلی به ترکیبات فنلی دارای یک گروه کربوکسیلیک اسید اشاره دارد و به طور عمده به دو زیر گروه هیدروکسی بنزوئیک اسید و هیدروکسی سینامیک اسید تقسیم می‌شوند (Pereira *et al*., 2009). اخیرا خواص آنتی اکسیدانی هیدروکسی سینامیک اسیدها علاوه بر فراوانی در طبیعت و پتانسیل بالای آنها در مهار رادیکال‌های آزاد مورد توجه قرار گرفته است، ترکیباتی مانند اسیدهای فرولیک، کافئیک، کوماریک و سیناپیک در گروه هیدروکسی سینامیک اسید قرار دارند (Khoddami *et al*., 2013). فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدهای فنلی طبیعی به تعداد و موقعیت نسبی گروه های هیدروکسیل بر روی حلقه وابسته است. برای مثال کافئیک اسید به علت دی هیدروکسیله بودن نسبت به مونوفنلی هایی مانند کوماریک اسید قدرت آنتی اکسیدانی بیشتری دارد (Rice-Evans *et al*., 1996). از دو دهه گذشته استفاده از منابع طبیعی برای توسعه، کشف دارو(ها) و تولید در مقیاس تجاری بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در این بین قارچ‌های اندوفیت که بدون ایجاد علامت بیماری‌زا درون بافت زنده گیاه کلونی تشکیل می‌دهند، مورد توجه بسیاری از محققان بوده است. قارچ‌ها قادر به تولید بسیاری از متابولیت‌های ثانویه با فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع هستند (Shen, 2015). با توجه به رشد سریعتر قارچ‌ها نسبت به گیاهان، استخراج آسان و کم‌هزینه‌تر متابولیت‌های تولید شده توسط آنها، این میکروارگانیسم‌های بالقوه می توانند منابع مناسب-تری برای تولید متابولیت‌ها در مقیاس تجاری باشند (Kusari & Spiteller 2011) . با این وجود، تنها ۱/۵-۰/۷۵ درصد از گونه‌های گیاهی شناخته‌شده برای شناسایی اندوفیت‌های آنها مورد بررسی قرار گرفته اند (Christenhusz & Byng 2016). **فندق با نام علمی *Corylus avellana* از *خانواده*** Betulaceae **درختچه‌ای است به ارتفاع تقریبی دو متر که در شرایط مساعد تا ارتفاع شش متر نیز رشد می‌کند. براساس آخرین تحقیقات سیتوژنتیکی مشخص شده‌است که فندق دارای سه مرکز تنوع جدا از هم در ایران، مدیترانه و ترکیه است که در ایران این رویشگاه های طبیعی شامل مناطق شمال و شمال غربی کشور است (Ghaderi *et al*., 2009)**. از آنجایی که مطالعه جامعی بر روی قارچ‌های اندوفیت تولید کننده اسیدهای فنلی گیاه فندق صورت نگرفته است لذا در این تحقیق سعی بر آن است تا با شناسایی و معرفی قارچ‌های اندوفیت جدید جداشده از فندق بتوان از آنها به عنوان منابع جدید با پتانسیل عظیم صنعتی برای تولید اسیدهای فنلی (کافئیک اسید، فرولیک اسید، سالیسیلیک اسید، سینامیک اسید و کوماریک اسید) استفاده کرد. از این رو در این مطالعه حضور اسیدهای فنلی در جنس‌های مختلف از قارچ‌های اندوفیت جدا شده از فندق به روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

نمونه‌برداری در شش نقطه از ایران (اشکورات گیلان، فندقلوی اردبیل، طارم زنجان، الموت قزوین، وشنوه قم) و از بخش‌های سالم و بدون نشانه بیماری شامل برگ، ساقه و پوست گیاه فندق انجام شد. نمونه ها از درختان بالغ انتخاب و در کیسه‌های پلاستیکی برروی یخ قرار داده شده به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان جداسازی اندوفیت‌های آنها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

جداسازی قارچ‌های اندوفیت

جداسازی قارچ های اندوفیت از نمونه‌های گیاهی به روش گونزالس و تلو (González &Tello 2011) با اندکی تغییرات انجام شد. به طور خلاصه، ابتدا نمونه‌های گیاهی جهت ضدعفونی کردن سطحی با هدف زدودن قارچ‌های اپی‌فیت، پس از شستشو با مواد شوینده، با آب جاری **به مدت ۱۵ دقیقه آب‌کشی شد.** سایر مراحل به صورت متوالی در زیر هود لامینار انجام شد. قطعات برید شده به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد، سپس در هیپوکلریت سدیم حاوی ۵ درصد کلرین فعال به مدت ۵ دقیقه و در نهایت پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل بر روی کاغذ صافی استریل شده قرار داده شد تا آب اضافی آن‌ها گرفته شود. نمونه‌های استریل شده به قطعات کوچک (۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر) بریده شد و پوست رویی نمونه‌ها توسط اسکالپل جدا و بخش داخلی بافت روی محیط کشت جامد PDA (Potato Dextrose Agar) قرار داده شد. پلیت‌ها در تاریکی و در دمای ۲±۲۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. خالص‌سازی اندوفیت‌ها با استفاده از نوک هیف‌های قارچ‌های رشد یافته بر روی محیط کشت جامد انجام شد. سپس از قارچ های خالص برش‌هایی به ابعاد ۱×۱سانتیمتر مربع تهیه و به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth) انتقال داده شد. نمونه‌ها به مدت ۲۱ روزه بر روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm قرار گرفت. هم‌چنین به منظور **ذخیره‌سازی ایزوله‌های قارچی، از روش کاغذ صافی استریل استفاده شد** (Strobel *et al*., 1996). جداسازی قارچ‌های رشد-یافته از محیط کشت مایع با کمک پمپ خلا انجام و تا زمان انجام آنالیزهای مربوطه در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (شکل ۱).

شکل ۱: مراحل مختلف کشت و جداسازی قارچ‌های اندوفیت از قسمت‌های مختلف گیاه فندق *a*: گیاه فندق، b:استریل کردن بخش‌های مختلف گیاه، c: کشت بر روی محیط PDA ، e-d : رشد و ذخیره‌سازی ایزوله‌های قارچی.

Figure 1: Different stages of cultivation and isolation of endophytic fungi from different parts of the Hazel plant. a: Hazel plant, b: Sterilization of different parts of the plant, c: Cultivation on PDA medium, d-e: Growth and storage fungal isolates

استخراج DNAژنومی

استخراج DNA ژنومی ایزوله‌های قارچی با استفاده از بافر CTAB انجام شد. و شناسایی مولکولی آنها براساس آغازگرهای ITS1 (5□-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3□) و ITS4 (5□-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3□) انجام شد (White *et al*., 1990). پس از انجام واکنش PCR، ژن‌های ITS به منظور بررسی صحت انجام واکنش PCR بر روی ژل ۱٪ آگارز بارگذاری و محصول واکنش PCR توسط شرکت ژنتیک کدن (ایران) تعیین توالی شد.

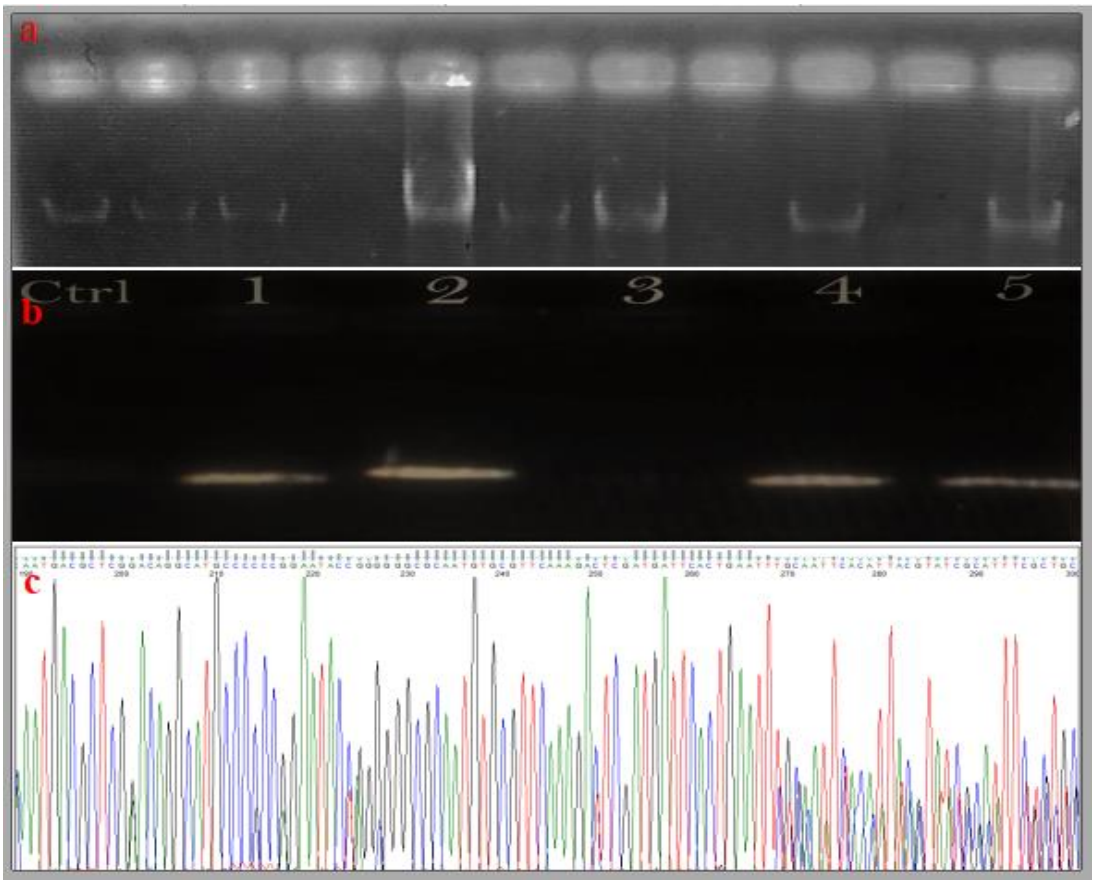
استخراج اسیدهای فنلی

برای استخراج اسیدهای فنلی ابتدا ۴۰ درصد متانول حاوی ۰/۵ درصد استیک اسید تهیه شد. سپس به ۰/۵ گرم میسلیوم قارچ، ۴ میلی‌لیتر از حلال ذکرشده اضافه و همگن شد. مخلوط حاصل به‌مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی جدا و با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر صاف و برای سنجش به دستگاه HPLC (Waters, e2695, USA) تزریق شد. ستون مورد استفادهC18-ODS3 با طول ۲۵۰ میلی‌متر و قطر ۴/۶ میلی‌متر بود و آنالیز در دو طول موج ۲۷۸ و ۳۰۰ با گرادیانی از متانول ۳۰ تا ۸۰ درصد انجام شد. محاسبه غلظت اسیدهای

فنلی موجود در عصاره قارچ با مقایسه پیک ها با نمونه‌های استاندارد سینامیک اسید،کوماریک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید و سالیسیلیک اسید (USA, Sigma) انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی قارچ‌های اندوفیت تولیدکننده اسیدهای فنلی براساس تجزیه و تحلیل توالی ITS ژنومی و مطابقت با توالی‌های ثبت شده درپایگاه داده NCBI انجام شد (شکل ۲). براساس نتایج در مجموع ۱۲ ایزوله قارچی جداسازی و خالص شد که شامل قارچ‌های *Alternaria* sp., *Arthrinium* sp., *Auxarthron* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Cryptosporiopsis* sp., *Epicoccum* sp., *Melanconium* sp., *Neopestalotiopsis* sp., *Phoma* sp., *Stemphylium* sp. است.



شکل ۲: مراحل مختلف a:استخراج DNA قارچی، b: واکنش PCR، c: توالی‌یابی نواحی ITS قارچ‌های اندوفیت.

Figure 2: Different steps a: Extraction of fungal DNA, b: PCR reaction, c: Sequencing of ITS regions of endophytic fungi.

جنس‌های شناسایی شده به همراه مقدار اسیدهای فنلی درون سلولی (باقی مانده در میسلیوم قارچ) (جدول ۱) و برون سلولی (رها شده به محیط کشت) (جدول۲) تولید شده توسط هر کدام از قارچ‌های اندوفیت ارائه شده است. بررسی درصد

آزادسازی این ترکیبات به محیط نشان داد که در اکثر قارچ‌ها بخش زیادی از این ترکیبات به محیط رها شدند، به طوری که در دو قارچ *Fusarium* sp. و *Stemphylium* sp. صد درصد ترکیبات به محیط آزاد شد که این امر تاکیدی بر فرایند آسان و کم هزینه استخراج فنلیک اسیدها از قارچ‌های اندوفیت دارد. گزارش‌های بسیار کمی در مورد قارچ‌های اندوفیت سنتز کننده اسیدهای فنلی ثبت شده است. حضور کومارین به مقدار ۳/۶ میلی گرم بر گرم در قارچ *Alternaria* sp. گزارش شده است (Umashankar *et al*., 2015). در مطالعه دیگر که در سال ۲۰۱۷ انجام شد، پس از شناسایی ژن‌های فرویل استراز در قارچ *Aspergillus* sp. و انتقال آن به گیاه گندم تولید فرولیک اسید وکوماریک اسید در این گیاه تا ۶ برابر افزایش یافت (Dilokpimol *et al*., 2017). قارچ‌های شناسایی شده در تحقیق حاضر، به عنوان قارچ‌های اندوفیت سنتز کننده هیدروکسی سینامیک اسید برای نخستین بار معرفی می‌شوند. قارچ‌های مختلف پتانسیل متفاوتی در تولید هر کدام از ترکیبات از خود نشان داده‌اند. به طوری که قارچ *Alternaria* sp. بهترین عملکرد را در تولید کافئیک اسید، کوماریک اسید، فرولیک اسید و سینامیک اسید از خود نشان داد که نه تنها نسبت به سایر قارچ‌های شناسایی شده بالاترین مقدار تولید را داشت بلکه نسبت به مقادیر گزارش شده این ترکیبات در بسیاری از نمونه‌های گیاهی نیز بسیار بالاتر بود (Alvarado *et al*., 2003). مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ بر روی فندق انجام شد که نشان داد در تمام عصاره ها، هم به صورت آزاد و هم به صورت استری اسید گالیک فراوان‌ترین اسید فنلی بود (Prosperini *et al*., 2009). بسیاری از میکروارگانیسم‌ها می‌توانند از کوماریک اسید به عنوان تنها منبع کربن برای ساختن کافئیک اسید استفاده کنند. برای مثال باکتری هایی مانند *Streptomyces griseus* و قارچ‌های رشته‌ای مانند *Gliocladium deliquescens* کوماریک اسید را به کافئیک اسید و ترکیبات مربوطه تبدیل می کنند (Torres & Rosazza 2001). اما تنها تعداد کمی از قارچ‌های اندوفیت قادرند که با استفاده از هیدروکسیلاسیون کوماریک اسید به کافئیک اسید دست یابند. در این مطالعه چهار قارچ *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Epicoccum* sp. کافئیک اسید را در مقادیر قابل توجه تولید کردند. هم چنین تولید سینامیک اسید در قارچ *Alternaria* sp. به میزان ۳۰۳ µg/g Fw نشان داد که قارچ‌های اندوفیت می‌توانند به عنوان یک منبع جایگزین مناسب برای تولید این ترکیبات آنتی اکسیدانی باشند. بررسی درصد آزادسازی این ترکیبات به محیط نشان دادکه در اکثر قارچ‌ها بخش زیادی از این ترکیبات به محیط رها شد، به طوری که در دو قارچ *Fusarium* sp. و *Stemphylium* sp. صد درصد ترکیبات به محیط آزاد شد. این امرتاکید مجددی بر فرایند آسان و کم هزینه استخراج اسیدهای فنلی از قارچ‌های اندوفیت دارد.

جدول ۱. اسیدهای فنلی تولید شده از بخش درون سلولی قارچ‌های اندوفیت

Table 1. produced Phenolic acids from the intracellular part of endophytic fungi

قارچ‌های اندوفیت	سینامیک اسید µg/g Fw	سالیسیلیک اسید µg/g Fw	فرولیک اسید µg/g Fw	کوماریک اسید µg/g Fw	کافئیک اسید µg/g Fw
Alternaria sp.	۱۷۹	–	۸۴۵	۸/۵	–
Arthrinium sp.	–	۵/۶	–	–	–
Auxarthron sp.	–	–	۶	–	–
Fusarium sp.	–	–	–	–	–
Penicillium sp.	۱/۵	–	۱۰	–	۲/۵
Cryptosporiopsis sp.	۲/۵	–	۱۰/۳	–	–
Epicoccum sp.	۵/۱	۷	۵	–	۴
Melanconium sp.	–	۴/۲	۰/۲	۰/۴	–
Neopestalotiopsis sp.	–	۵/۵	۲/۵	–	–
Phoma sp.	-	-	-	۳	-
Stemphylium sp.	-	-	-	-	-

جدول ۲. محتوای اسیدهای فنلی رها شده به محیط برون سلولی

Table 2. The content of released phenolic acids into the extracellular culture

قارچ‌های اندوفیت	سینامیک اسید g/g µFw	سالیسیلیک اسید µg/g Fw	فرولیک اسید µg/g Fw	کوماریک اسید µg/g Fw	کافئیک اسید µg/g Fw	درصد رها سازی به محیط (٪)
Alternaria sp.	۱۲۴	–	–	۱۴۰/۵	۱۷	۲۱/۴
Arthrinium sp.	–	–	–	–	–	۰
Auxarthron sp.	۵/۲	–	–	۲	–	۵۵/۳
Fusarium sp.	۵/۱	۷	۵	–	۴	۱۰۰
Penicillium sp.	–	–	–	–	–	۰
Cryptosporiopsis sp.	۶/۲	–	–	–	–	۳۲/۶
Epicoccum sp.	–	–	–	–	–	۰
Melanconium sp.	–	–	–	–	–	۰
Neopestalotiopsis sp.	۴	۲۳/۳	–			۷۷/۳

Phoma sp.	-	-	۱۶/۵	-	-	۸۴/۶
Stemphylium sp.	۱۲۴	-	-	۱۴۰/۵	-	-

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد که قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه فندق پتانسیل بالایی در تولید بسیاری از مشتقات هیدروکسی سینامیک اسید از جمله کافئیک اسید، سینامیک اسید، کوماریک اسید، فرولیک اسید و سالیسیلیک اسید دارند. در میان اندوفیت های جدا شده، قارچ *Alternaria* sp. بیشترین مقدار سینامیک اسید (۳۰۳ µg/g Fw) و کافئیک اسید (۱۷ µ g/g Fw) ، فرولیک اسید (۸۴۵ µg/g Fw) و کوماریک اسید (۱۴۹ µg/g Fw) و قارچ *Neopestalotiopsis* sp. بیشترین مقدار سالیسیلیک اسید (۲۸/۸ µg/g Fw) را تولید کردند. از آنجا که قارچ‌های اندوفیت قابلیت تولید این ترکیبات ارزشمند را در طی یک دوره رشدی کوتاه مدت و در مقادیر بالا داشتند می توان آنها را به عنوان منبع مناسبی برای تولید این ترکیبات در مقیاس تجاری معرفی کرد.

منابع

Alvarado, I.E., Navarro, D., Record, E., Asther, m., Asther, M., Lesage-Meessen, L. (2003). Fungal biotransformation of p-coumaric acid into caffeic acid by *Pycnoporus cinnabarinus*: an alternative for producing a strong natural antioxidant. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 19: 157-160.
Christenhusz, M.J. and Byng, J.W. (2016). The number of known plants species in the world and its annual increase. Phytotaxa, 261: 201-217.

Dilokpimol, A., Mäkelä, M., Mansouri, S., Belova, O., Waterstraat, M., Bunzel, M., de Vries, R., Hildén, K. (2017). Expanding the feruloyl esterase gene family of *Aspergillus niger* by characterization of a feruloyl esterase, FaeC. New biotechnology, 37: 200-209.

Ghaderi, A., Omidi, M., Athena, O. (2009). Feasibility study of secondary metabolite engineering in hazelnut plant *Corylus avellana*. Regional Conference on Food and Biotechnology, 1-6

González, V. and Tello, M.L. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. Fungal Diversity, 47: 29-42.

Khoddami, A., Wilkes, M., Roberts, T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. Molecules, 18: 2328-2375.

Kusari, S. and Spiteller, M. (2011). Are we ready for industrial production of bioactive plant secondary metabolites utilizing endophytes? Natural product reports, 28: 1203-1207.

Owen, R., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2003). Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. Food and Chemical Toxicology, 41: 703-717.

Pereira, D.M., Valentão, P., Pereira, J. A., Andrade, P.B. (2009). Phenolics: From chemistry to biology, Molecular Diversity Preservation International. Molecules, 14: 2202–2211

Prosperini, S., Ghirardello, D., Scursatone, B., Gerbi, V., Zeppa, G. (2009). Identification of soluble phenolic acids in hazelnut (*Corylus avellana* l.) Kernel. Acta Horticulturae. 845: 677-680

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free radical biology and medicine, 20: 933-956.

Shen, B. (2015). A new golden age of natural products drug discovery. Cell, 163: 1297-1300.

Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R.S., Hess, W.M. (1996). Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. Microbiology, 142: 435-440.

Torres, y. Torres, J.L., Rosazza, J.P. (2001). Microbial Transformations of p-Coumaric Acid by *Bacillus m egaterium* and *Curvularia l unata*. Journal of natural products, 64: 1408-1414.

Umashankar, T., Govindappa, M., Ramachandra, Y.L., Chandrappa, C.P., Padmalatha R.S., Channabasava, R. (2015). Isolation, purification and in vitro cytotoxicity activities of coumarin isolated from endophytic fungi, *Alternaria* species of *Crotalaria pallida*. Indo American Journal of Pharmaceutical Research, 5: 926-936.

Wahle, K.W., Brown, I., Rotondo, D., Heys, S.D. (2010). Plant phenolics in the prevention and treatment of cancer. Bio-Farms for Nutraceuticals, 36-51.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18: 315-322.

Identification and quantitation of phenolic acids of endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*

N. Mohammadi Ballakuti[1], F. Ghanati[2*], S.Vazirifar[3]

Received: 2021.09.13
Accepted: 2022.05.21

Abstract

Introduction: Cinnamic acid, coumaric acid, ferulic acid, caffeic acid are of hydroxy-cinnamic acid derivatives with strong antioxidant properties. A few reports are available on the content and types of phenolic acids in endophytic fungi. The present study has been focused on the isolation of endophytic fungi from hazelnut (*Corylus avellana* L.), identification and measurement of their phenolic acids.

Materials and methods: Molecular identification of the fungi was achieved based on ITS primers and the presence of cinnamic acid derivatives was studied by HPLC method.

Results and discussion: Twelve phenolic acid-producing endophytic fungi were isolated and intracellular and extracellular amounts of above-mentioned compounds was monitored. Among the isolated endophytes, *Alternaria* sp. showed the highest amount of cinnamic acid (303µg / g Fw) and caffeic acid (17 µg / g Fw). It was also noteworthy that one hundred percent of phenolic acids produced by *Fusarium* sp. and *Stemphylium* sp., was released into the media of these fungi. Regarding to the cost effective and fast growth of endophyes, they can be introduced as alternative resources for commercial-scale production and extraction process of phenolic acids.

Keywords: Caffeic acid, Coumaric acid, Endophytic fungi, Ferulic acid, Hydroxy cinnamic acid

---

1. PhD of plant physiology, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Professor, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (*Corresponding Author: ghangia@modares.ac.ir)

3 PhD of plant physiology, Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran