مقاله پژوهشی

Research Article

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران
جلد ۳۹، شماره ۱، صفحه ۶۸-۵۵ (۱۴۰۲)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijmapr.2022.359184.3194
شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1402.39.1.4.9

اثر مغناطیس بر تغییرات متابولیت‌های ثانویه قارچ گانودرما لوسیدوم به‌عنوان نمونه یک ارگانیسم یوکاریوتی

لیلا مرادی‌پور[۱] و وحیده پیام‌نور[۲*]

۱- دانشجوی دکترا، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار، دانشکده علوم جنگل، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

پست الکترونیک: mnoori56@gmail.com

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۱ تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۱

چکیده

در فرآیندهای بیوتکنولوژی، افزایش تولید زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه، از شرایط اقتصادی بودن پروژه‌هاست. هدف از مطالعه حاضر بررسی امکان افزایش زیست‌توده و متابولیت‌های ثانویه قارچ *Ganoderma lucidum* با استفاده از میدان مغناطیسی به‌عنوان یک محرک غیر زنده بود. چهار سطح مغناطیس شامل ۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌تسلا به‌مدت ۰، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه در سه تکرار بر میسلیوم با قطر یک سانتی‌متری قارچ خالص‌سازی شده، اعمال و بهترین تیمار براساس میزان رشد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی انتخاب گردید. میزان ترکیب‌های ثانویه در میسلیوم‌های تحت میدان مغناطیس منتخب (۶۰ میلی‌تسلا به‌مدت ۹۰ دقیقه) شامل بتولین، اسید بتولینیک، اسید آسکوربیک، آستاگزانتین، پلی‌ساکارید کل و آنتی‌اکسیدان‌ها اندازه‌گیری و با تیمار شاهد و قارچ طبیعی مقایسه گردید. نتایج نشان داد مغناطیس کردن باعث افزایش بیش از ۲/۵ برابری بتولین (یک تری‌ترپن ضد سرطانی قوی) نسبت به قارچ طبیعی و ۳/۷ برابری نسبت به میسلیوم شاهد شد. غلظت پلی‌ساکاریدها در بستر کشت میسلیوم تیمار شده و شاهد، به‌ترتیب ۵/۰۵ و ۵/۱۷ برابر قارچ طبیعی اندازه‌گیری گردید. میزان اسید گانودریک در میسلیوم تیمارشده (درون سلولی) و محیط کشت PDB (برون سلولی) بررسی شد. بیشترین مقدار اسید گانودریک (۱/۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در میسلیوم تیمارشده بدست آمد و قارچ طبیعی و محیط کشت PDB میزان تقریباً یکسانی (۱/۸۷ و ۱/۸۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از این ترکیب داشتند. میزان اسید بتولینیک (یک ترکیب ضدسرطانی مشتق شده از بتولین)، اسید آسکوربیک و آستاگزانتین به‌ترتیب در قارچ طبیعی بیشتر از تیمار ۶۰ میلی‌تسلا مغناطیس به‌مدت ۹۰ دقیقه و پس از آن در شاهد بود. درصد آنتی‌اکسیدان‌ها در شاهد، حدود ۸۵٪ و در قارچ طبیعی و میسلیوم تیمار شده، حدود ۷۵٪ بدست آمد. با توجه به نتایج، چشم‌انداز مناسبی برای بکارگیری کشت‌های درون‌شیشه‌ای (in vitro) قارچ گانودرما به جای بهره‌برداری از قارچ طبیعی و همچنین احداث مزارع پرخرج وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: بتولین، بتولینیک اسید، آسکوربیک اسید، آستاگزانتین، گانودریک اسید، پلی‌ساکارید کل.

مقدمه

با اینکه در دید عامه محصول اصلی جنگل، چوب است اما گل، برگ، ساقه، ریشه، غده، بذر، پوست، صمغ، شیره، مان، گال و قارچ که در موارد دارویی، صنعتی، خوراکی و تزئینی مورد استفاده قرار می‌گیرند جزء محصولات فرعی جنگل محسوب می‌شوند (Frey *et al.*, 2021). کمبود مطالعات در زمینه دارویی محصولات فرعی جنگل بسیار محسوس و حائز اهمیتی ویژه است. قارچ‌ها از دیرباز به‌طور

Copyright: © 2023 by the authors. This is an open access, peer-reviewed article published by Research Institute of Forests and Rangelands (http://ijmapr.areeo.ac.ir/) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

گسترده در رژیم غذایی روزانه انسان به‌ویژه مردم آسیا، به‌عنوان یک ماده غذایی مکمل استفاده می‌شده است (Mohan *et al*., 2015). همزمان با توسعه علم و فناوری و نیاز روزافزون به مواد طبیعی برای تولید داروهای گیاهی جهت پیشگیری و درمان بیماری‌ها، ارزش و جایگاه قارچ‌های جنگلی نیز بیشتر شناخته شده است (Siwulski *et al*., 2015). قارچ گانودرما لوسیدوم (*Ganoderma lucidum*) متعلق به سلسله قارچ‌ها، شاخه بازیدیومایکوتا (Basidiomycota)، رده هموبازیدیومایست‌ها (Basidiomycota)، راسته آفیلوفورالس (Aphyllophorales)، خانواده گانودرماتاسه (Ganodermataceae)، جنس گانودرما (*Ganoderma*) و گونه لوسیدوم (*lucidum*) می‌باشد (Chang & Buswell, 1999). این قارچ به‌صورت ساپروفیت و انگل بوده و از بقایای چوب‌های مرده و تنه درختان خزان‌کننده جنگلی مانند بلوط، ممرز و انجیلی تغذیه می‌کند (Keypour *et al*., 2020). قدمت استفاده دارویی از گانودرما لوسیدوم که در حال حاضر در فارماکوپه چین گنجانده شده و برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌های کاملاً متفاوت در آسیا مورد استفاده قرار می‌گیرد (Siwulski *et al*., 2019)، به ۴۰۰۰ سال قبل برمی‌گردد (Wasser, 2005). مطالعات انجام شده در شرایط In vitro و In vivo تأثیر چند جانبه این قارچ بر سلامتی و تقویت سیستم ایمنی بدن را تأیید کرده است (Tang *et al*., 2006 ؛Yen & Wu, 1999).

طبق مطالعات انجام شده، مهمترین اثرهای گانودرما لوسیدوم شامل تعدیل سیستم ایمنی، اثرهای ضد سرطان، ضد التهاب، ضد آلرژی، ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد دیابتی، ضد پیری و محافظت‌کننده از کبد، تقویت‌کننده سیستم قلب و عروق است. براساس جدیدترین مطالعات انجام شده، این قارچ خاصیت دارویی خود را مدیون محتویات و ترکیب‌های بیولوژیکی فعال خود است (Wasser, 2005؛ Krasutsky, 2006). اندام بارده (Fruiting body) میسلیوم و اسپور و محیط کشت این قارچ دارای ۴۰۰ ماده فعال هستند که از مهمترین آنها می‌توان به تری‌ترپنوئیدها (گانودریک اسید)، پلی‌ساکاریدها (بتا-گلوکان)، استرول‌ها (ارگسترول)، استروئیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، پپتیدها، ترکیب‌های فنلی، ویتامین‌ها، مواد معدنی و بسیاری مواد کمیاب دیگر اشاره کرد (Gao *et al*., 2011؛ Kim & Kim, 1999).

به دلایل مختلف ازجمله عوارض جانبی نامطلوب داروهای شیمیایی، نیاز مبرم صنعت داروسازی به مواد خام و پیشینه استفاده از گیاهان دارویی تقاضای جهانی برای استفاده از داروهای با منشأ طبیعی افزایش یافته است (Moraes *et al*., 2021). به همین دلیل در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی در مورد تنوع و پراکنش گیاهان دارویی و کشت و اصلاح‌نژاد، شناخت ترکیب‌ها و مواد مؤثره، استخراج و افزایش عملکرد ترکیب‌ها با شیوه‌های نوین انجام شده و نتایج قابل توجهی بدست آمده است. در قارچ‌ها در بیشتر مواقع، تولید متابولیت‌های ثانویه در میسلیوم کمتر از اندام بارده است. با توجه به سرعت رشد بالای میسلیوم‌ها افزایش مقدار این ترکیب‌ها با کمک انواع الیسیتورها در دهه‌های اخیر به‌عنوان یک راه حل مفید تلقی شده است. الیسیتورها می‌توانند با ایجاد تنش پاسخ‌های دفاعی، تغییرات فیزیولوژیکی ایجاد و بیوسنتز و انباشت ترکیب‌های ثانویه را در گیاهان القاء کنند. تحقیقات تأیید کرده است که میدان‌های الکترومغناطیس ضعیف با فرکانس بسیار پایین (ELF؛ <۳۰۰ هرتز) به‌عنوان الیسیتور می‌توانند بر سیستم‌های بیولوژیکی تأثیر بگذارند. در مطالعه Taghizadeh و همکاران (۲۰۱۹) اثر مثبت میدان مغناطیسی بر متابولیت‌های ثانویه محیط کشت سوسپانسیون *Dracocephalum polychaetum* Bornm. تأیید شد. فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیالاز و محتوای فنل کل، فلاونوئید، آنتوسیانین، لیگنین و مالون دی‌آلدئید در تمام سلول‌های تیمار شده تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان داد. همچنین محتوای داخل سلولی رزمارینیک اسید، نارینگین، آپیژنین، تیمول، کارواکرول، کوئرستین و روتین در تمام سلول‌های تیمار شده به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. در مطالعه Rezaei و همکاران (۲۰۱۰) اثر میدان مغناطیسی ساکن و سالیسیلیک اسید و ترکیب هر دو الیسیتور باعث هم‌افزایی در

تولید تاکسول در فندق (*Corylus avellana*) شده است. اثر میدان‌های الکترومغناطیسی با شدت کم برای رشد گیاهان و تحریک پاسخ‌های رشد آنها مانند تحقیق Vashisth و Nagarajan (۲۰۱۰) درباره تأثیر میدان مغناطیسی ایستا بر جوانه‌زنی و خصوصیات رشد اولیه دانه آفتابگردان (*Helianthus annuus*) با فعال شدن آنزیم‌های دخیل در جوانه‌زنی و رشد و بهبود عملکرد بذرهای توس (*Betula pendula* Roth) با استفاده از نانوپرایم و مغناطیس توسط Pordel و همکاران (۲۰۲۲) ثابت شد. در تحقیق Gao و همکاران (۲۰۱۱) سوسپانسیون سلولی گونه *Aspergillus niger* در معرض ۴ ساعت میدان مغناطیسی ۱ میلی‌تسلا با فرکانس ۵۰ هرتز قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش اسید سیتریک و فعالیت سلولاز بلافاصله پس از روشن شدن میدان مغناطیسی شروع شد؛ هم بازده اسید سیتریک و هم فعالیت سلولاز با افزایش مدت زمان قرار گرفتن در معرض میدان مغناطیسی افزایش یافت. در مطالعه Sabu و همکاران (۲۰۱۸) میدان مغناطیسی کم به مدت ۱۲ هفته باعث افزایش سرعت جوانه‌زنی، افزایش کلروفیل در بذرهای *Pisum sativum*، *Zea mays*، *Solanum lycopersicum*، *Cyamopsis tetragonoloba* و *Cajanus cajan* در گروه‌های آزمایشی در مقایسه با شاهد شد. به‌طور کلی میدان مغناطیسی باعث افزایش شاخص‌های رشد گردید. مطالعه Xiong و همکاران (۲۰۲۰) نیز نشان داد که میدان مغناطیسی کم می‌تواند متابولیت ثانویه سیترینین را مهار و تولید رنگدانه را در گونه *Monascus purpureus* تحریک کند و غلظت Na^+ داخل سلولی و خارج سلولی را نیز تغییر دهد. هدف از انجام این تحقیق، بررسی تغییرات تولید ترکیب‌های ثانویه گانودرما لوسیدوم با استفاده از مغناطیس به‌عنوان الیسیتور غیرزنده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

با گردش در جنگل، به‌صورت تصادفی از طرح جنگل‌داری دکتر بهرام‌نیا- گرگان نمونه‌برداری شد. نمونه قارچی در محیط PDA کشت و میسلیوم قارچ گانودرما لوسیدوم پس از چندبار بازکشت، خالص‌سازی گردید. ۳ سطح تیمار مغناطیسی ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌تسلا در ۳ زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه و تیمار شاهد (بدون قرار گرفتن در معرض میدان مغناطیسی) در سه تکرار بر روی میسلیوم با قطر ۱ سانتی‌متر اعمال شد. تیمارهای میدان مغناطیس توسط دستگاه مغناطیس موجود در کارگاه مکانیک ماشین‌آلات کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان اعمال گردید. رشد پرگنه قارچ‌ها تا زمان پر شدن پتری‌دیش اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری رشد قارچ، پتری‌دیش‌های حاوی میسلیوم تیمار شده و شاهد در انکوباتور با دمای محیط قرار داده شد و تا پرشدن پتری‌دیش‌ها، مقدار رشد قارچ در چهار جهت اصلی به میلی‌متر با خط‌کش در طی ۱۰ روز متوالی توسط Sanei و Razavi (۲۰۰۶) اندازه‌گیری گردید. سپس قطعه‌های یک سانتی‌متری از میسلیوم جدا و در محیط کشت PDB بر روی دستگاه شیکر قرار گرفت. محیط پس از ۱۴ روز با استفاده از کاغذ واتمن شماره ۴ فیلتر و در آون با دمای ۶۰ درجه به مدت ۲۵ دقیقه خشک شد. وزن خشک میسلیوم اندازه‌گیری شده با توجه به مقدار میسلیوم اولیه مصرف شده، زیست‌توده تولیدی و سرعت ویژه رشد (رابطه ۱) محاسبه گردید (Noora *et al*., 2017).

$$\mu = \ln x_2 - \ln x_1 / t_2 - t_1 \qquad \text{رابطه ۱}$$

M یا μ: سرعت ویژه رشد، X2: غلظت ثانویه (گرم در لیتر)، X1: غلظت اولیه، t2: زمان ثانویه، t1: زمان اولیه

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH

مقدار ۰/۰۰۴ گرم DPPH در متانول مطلق حل و بعد به آرامی به مدت ۳ دقیقه تکان داده و به‌علت حساسیت به نور در داخل کاغذ آلومینیومی پیچانده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه با ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول رقیق شد. برای تهیه

شاهد ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول بالا و ۰/۵ میلی‌لیتر از متانول ۸۰٪ استفاده شد. میزان جذب نمونه‌ها بعد از مدت زمان ۳۰ دقیقه در تاریکی در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و با استفاده از رابطه ۲، درصد آنتی‌اکسیدان بدست آمد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی به‌صورت IC_{50} یعنی غلظتی از عصاره که باعث بازدارندگی ۵۰٪ ظرفیت رادیکالی (دی‌فنیل پیکریل هیدرازیل) می‌شود، نشان داده شد. از آسکوربیک اسید به‌عنوان استاندارد استفاده می‌شود (Adeyi *et al*., 2021).

$$DPPH\% = A - B / A * 100$$ رابطه ۲

A جذب شاهد، B جذب نمونه

اندازه‌گیری گانودریک اسید

پس از دوره ۲۱ روزه کشت، میسلیوم‌ها جمع‌آوری و طبق روش Fang و Zhong (۲۰۰۲) گانودریک اسید میسلیوم تیمارها و همچنین قارچ طبیعی استخراج شد. ۰/۱ گرم قارچ با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۵۰٪ به مدت یک هفته دوباره استخراج گردید. دو عصاره مخلوط و به‌مدت ۴۰ دقیقه در آون با دمای ۶۰ درجه قرار داده شد، به رسوب باقیمانده ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه گردید و بعد از ۲۴ ساعت روی شیکر در قیف دکانتور ریخته و فاز پایین که کلروفرم آلی است برداشته شد. به نسبت آن بی‌کربنات سدیم ۵٪ اضافه شده و ۱۲ ساعت شیکر شد. فاز بالای بی‌کربنات سدیم را برداشته و با هیدروکلریک اسید ۲ نرمال اسیدی شد. سپس به مقدار بی‌کربنات موجود کلروفرم اضافه و ۲۴ ساعت شیکر شد. با استفاده از قیف دکانتور کلروفرم (فاز پایین) برداشته و در آون گذاشته و به رسوب باقیمانده ۱ میلی‌لیتر اتانول مطلق اضافه و با فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرونی فیلتر شد. در نهایت با استفاده از طیف‌سنج اسپکتروفوتومتر (UV-Vis) در طول موج ۲۴۵ نانومتر جذب آن خوانده شد و با استاندارد تیمول مقایسه گردید.

اندازه‌گیری پلی‌ساکارید کل (قند کل)

نسبت ۴:۱ محیط (۱ میلی‌لیتر) و قارچ (۰/۱ گرم) با اتانول ۹۶٪ مخلوط و NaOH یک مولار اضافه و با دور ۳۵۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ قرار داده شد و بعد در آون با دمای ۶۰ درجه به مدت ۴۰ دقیقه نگهداری گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره الکلی با ۳ میلی‌لیتر معرف آنترون مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه تغلیظ شد. میزان جذب پس از سرد شدن در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت و با استاندارد گلوکز مقایسه شد (Dubois *et al*.,1956).

اندازه‌گیری آسکوربیک اسید

۰/۵ میلی‌لیتر عصاره الکلی قارچ با ۰/۲ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالچو مخلوط و با آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر محیط کشت با ۰/۲ میلی‌لیتر معرف مذکور مخلوط و به‌مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت و جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد (Klein & Perry, 1982).

اندازه‌گیری آستاگزانتین

۰/۱ گرم قارچ با ۴ میلی‌لیتر هگزان مخلوط، ۰/۵ میلی‌لیتر محیط و هگزان مخلوط و یک دقیقه ورتکس شد. جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت و با رابطه ۳ محاسبه شد (Ambati *et al*., 2014).

$$Cartenoid\ (mg) = A*V*P/\varepsilon$$ رابطه ۳

A: مقدار جذب، V: حجم رقیق شده به میلی‌متر، P: وزن مولکولی کاروتنویید، ε: ضریب جذب مولی

اندازه‌گیری بتولین و بتولینیک اسید

مقدار ۰/۱ گرم قارچ و ۱ میلی‌لیتر محیط با ۵ میلی‌لیتر متانول گرید HPLC مخلوط و ۲۴ ساعت شیکر و بعد با کاغذ واتمن شماره ۴ فیلتر شد. با دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) با ستون C18 با ابعاد ۲۵۰×۶/۴ میلی‌متر، فاز متحرک شامل ۹۹٪ استونیتریل و ۱٪ آب دیونیزه ارزیابی حضور این دو ماده مؤثره انجام می‌شود. برای عصاره‌گیری از محیط کشت نسبت ۱:۱۰ کلروفرم/متانول برابر حجم محیط مخلوط و در قیف دکانتور ریخته و فاز آلی (پایین) را برداشته و در دمای ۶۰ درجه در آون خشک و تا زمان آزمایش در تاریکی و در یخچال نگهداری می‌شود. به رسوب باقیمانده ۱ میلی‌متر متانول گرید HPLC اضافه و به دستگاه تزریق شد. استاندارد بتولین و بتولینیک اسید به مقدار ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ppm تهیه و تزریق شد و با رسم منحنی کالیبراسیون غلظت واقعی این دو ترکیب بدست آمد (Nazari *et al*., 2018).

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها

آزمایش در قالب طرح فاکتوریل دو عامله انجام شد. به‌منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از بسته نرم‌افزاری SPSS 24، برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولوموگروف- اسمیرنوف و برای مقایسه میانگین از آزمون چند دامنه دانکن و به‌منظور بررسی همبستگی شاخص‌های رشد، زی‌توده و سرعت ویژه رشد از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد. براساس نتایج بدست آمده از رشد میسلیوم و آزمایش خواص آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH بهترین تیمار برای اندازه‌گیری میزان سایر متابولیت‌های ثانویه انتخاب و ترکیب‌های ثانویه گانودریک اسید، پلی‌ساکارید کل، آسکوربیک اسید، آستاگزانتین، بتولین و بتولینیک اسید برای تیمار منتخب، شاهد و قارچ به‌نحوی که توضیح داده شد، اندازه‌گیری و مقایسه گردید. یادآوری می‌شود در مقاله از تیمارها به‌صورت مخفف نام برده شده است، دو عدد اول میزان مغناطیس و دو عدد بعدی مدت زمان القاء می‌باشد؛ به‌عنوان نمونه تیمار ۶۰۹۰ به معنای کاربرد میدان مغناطیس ۶۰ میلی‌تسلا به مدت ۹۰ دقیقه است.

نتایج

براساس نتایج داده‌های توصیفی شاخص‌های رشد، میانگین رشد، زی‌توده و میزان سرعت ویژه رشد میسلیوم قارچ گانودرما لوسیدوم به‌ترتیب ۷۹/۵ میلی‌متر، ۸/۶۹ گرم بر لیتر و ۰/۰۰۲۶ بدست آمد. بیشترین رشد، زی‌توده و سرعت ویژه رشد در روز، مربوط به تیمار ۹۰ دقیقه، ۶۰ میلی‌تسلا بود. کمترین مقادیر شاخص‌های رشد، زی‌توده و سرعت ویژه رشد مربوط به تیمارهای ۲۰۶۰، ۶۰۳۰ و ۶۰۶۰ بود (جدول ۱).

همچنین نتایج همبستگی پیرسون بین شاخص‌های سرعت ویژه رشد، مقدار رشد و زی‌توده حکایت از آن دارد که رابطه سرعت رشد و مقدار زی‌توده معنی‌دار است و دارای همبستگی یک می‌باشد که منطقی است (جدول ۲).

نحوه رشد روزانه در تیمارهای اعمال شده بررسی گردید که نشان‌دهنده تنش ناشی از مغناطیس بر میسلیوم‌ها می‌باشد. به‌عنوان نمونه، رشد ناشی از قرارگیری ۹۰ دقیقه‌ای میسلیوم‌ها در مغناطیس با درجه ۶۰ میلی‌تسلا، مدل سینوسی داشته و با روند رشد در نمونه‌های شاهد کاملاً متفاوت است (شکل ۱).

نتایج حاصل از آزمون فاکتوریل دو عامله نشان داد که اثر سطوح مختلف مغناطیس (۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌تسلا) بر درصد آنتی‌اکسیدان تیمارها در برابر شاهد تأثیر معنی‌داری داشت. اما اثر سطوح مختلف زمان تیمار و اثر متقابل زمان و مغناطیس معنی‌دار نبود (جدول ۳ و شکل ۲).

جدول ۱- آمار توصیفی شاخص‌های رشد میسلیوم قارچ ***Ganoderma lucidum*** تحت تأثیر تیمار مغناطیس

Table 1. Descriptive statistics of *Ganoderma lucidum* mycelium growth indices affected by magnetism treatment

Treatment	Average growth (mm)	Biomass content ($g.l^{-1}$)	Specific growth rate per day
M20T30	82±0.021	9.28±0.115	0.0029
M20T60	76±0.011	7.58±0.092	0.0021
M20T90	77±0.056	9±0.11	0.0028
M40T30	81±0.11	9.42±0.0113	0.0030
M40T60	79±0.013	9.41±0.181	0.0030
M40T90	79±0.017	8.71±0.121	0.0027
M60T30	80/01±0.012	7.14±0.13	0.0018
M60T60	78±0.014	8.28±0.036	0.0019
M60T90	83.1±0.002	9.57±0.08	0.00321
Control	80.5±0.028	9.55±0.014	0.00312

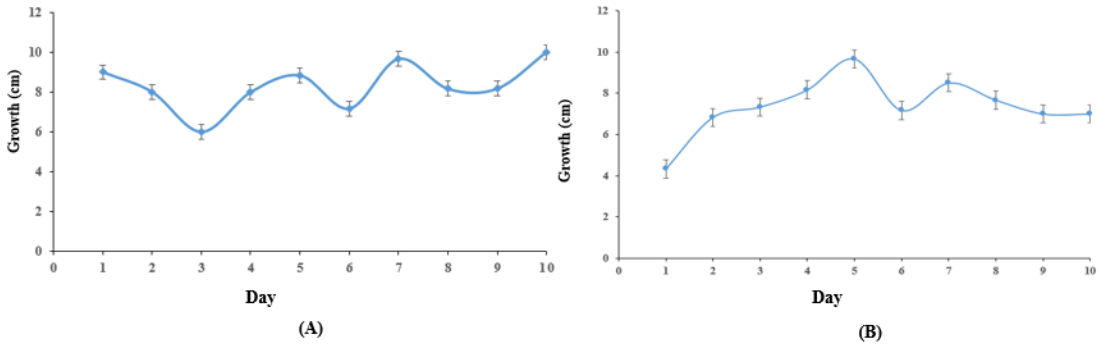
M: magnetism levels (mT); T: magnetization time levels (min)

جدول ۲- همبستگی پیرسون بین شاخص‌های رشد و زیست‌توده میسلیوم قارچ ***Ganoderma lucidum*** تحت تأثیر مغناطیس

Table 2. Pearson correlation between growth indices and mycelium biomass in *Ganoderma lucidum* affected by magnetism

Pearson correlation	Specific growth rate	Biomass	Amount of mycelium growth
Specific growth rate	1	1**	0.53
Amount of mycelium growth	0.53	0.54	1
Biomass	1**	1	0.54

**: significant at 1% probability level.



شکل ۱- میانگین رشد روزانه میسلیوم قارچ ***Ganoderma lucidum*** تحت تأثیر **A**: ۶۰ میلی‌تسلا مغناطیس به‌مدت ۹۰ دقیقه و **B**: شاهد

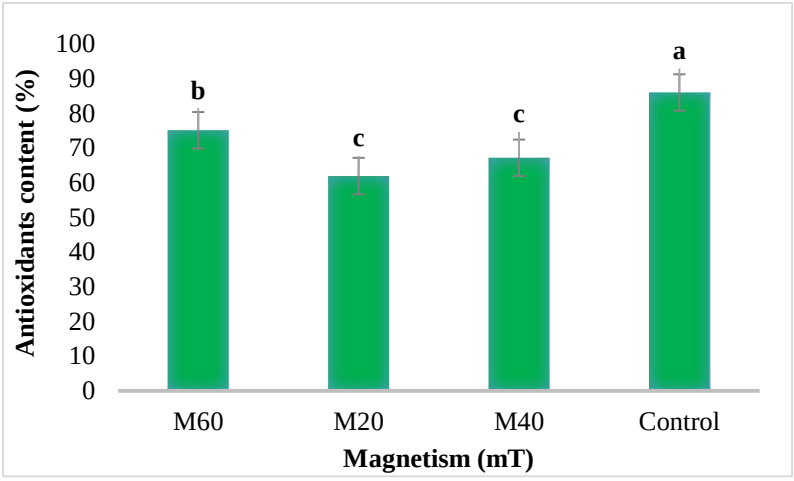
Figure 1. Average of daily mycelium growth in *Ganoderma lucidum* affected by A: 60 mT magnetization for 90 min and B: control

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر تیمارهای مغناطیس و مدت زمان بر درصد آنتی‌اکسیدان میسلیوم قارچ ***Ganoderma lucidum***

Table 3. ANOVA of magnetism and magnetization time treatments on mycelium antioxidant percentage in *Ganoderma lucidum*

S.O.V.	d.f.	Mean square
Magnetism (M)	2	1011.23^{**}
Magnetization time (T)	2	$30.07^{n.s.}$
M×T	4	$7.36^{n.s.}$
Experimental error	20	15.24
C.V. (%)		19.66

n.s. and **: non-significant and significant at 1% probability level, respectively (Duncan test).



شکل ۲- مقایسه میانگین درصد آنتی‌اکسیدان میسلیوم قارچ ***Ganoderma lucidum*** تحت تأثیر تیمار مغناطیس

Figure 2. Means comparison of antioxidants percentage in *Ganoderma lucidum* mycelium affected by magnetism treatment

Similar letters on columns indicate the absence of significant differences between treatments (Duncan test).

مقایسه میانگین نشان داد که اعمال مغناطیس در هر سه سطح ۶۰، ۴۰ و ۲۰ میلی‌تسلا باعث کاهش درصد آنتی‌اکسیدان تیمارها نسبت به شاهد شده است؛ ولی بااین‌حال فعالیت آنتی‌اکسیدان در میسلیوم‌های تیمار شده با ۶۰ میلی‌تسلا نسبت به دو سطح ۴۰ و ۲۰ میلی‌تسلا بالاتر و در حد ۷/۹۵٪ و ۱۳/۲٪ بیشتر ولی نسبت به شاهد حدود ۱۰/۸۹٪ کمتر است.

با توجه به بررسی‌های ذکر شده در بالا تیمار ۹۰ دقیقه‌ای نمونه‌ها در سطح ۶۰ میلی‌تسلا به‌عنوان تیمار منتخب در نظر گرفته شد و متابولیت های گانودریک اسید، آستاگزانتین، بتولین، بتولینیک اسید، آسکوربیک اسید، پلی‌ساکارید و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی اندازه‌گیری و با نمونه قارچ طبیعی اولیه مقایسه شد. نتایج نشان داد اختلاف معنی داری بین میانگین متابولیت های اندازه‌گیری شده وجود دارد (جدول ۴).

جدول ۴- تجزیه واریانس یک طرفه محتوی متابولیت‌های ثانویه قارچ ***Ganoderma lucidum*** در تیمارهای مختلف

(قارچ طبیعی، تیمار ۹۰ دقیقه مغناطیس در سطح ۶۰ میلی تسلا و شاهد)

Table 4. One-way ANOVA of secondary metabolites content in *Ganoderma lucidum* in different treatments (natural fungus, 60 mT magnetization for 90 min treatment, and control)

S.O.V.		d.f.	M.S.	C.V. (%)
Ascorbic acid	Between treatments	2	0.510**	4.15
	Within treatments (Between replications)	6	0.001	
	Total	8		
Total polysaccharides	Between treatments	2	7193.914**	6.8
	Within treatments (Between replications)	6	0.001	
	Total	8		
Total ganoderic acid	Between treatments	2	0.002$^{n.s.}$	2.09
	Within treatments (Between replications)	6	0.002	
	Total	8		
Astaxanthin	Between treatments	2	0.401*	3.64
	Within treatments (Between replications)	6	0.000	
	Total	8		
Betulin	Between treatments	2	174074.358**	1.66
	Within treatments (Between replications)	6	0.232	
	Total	8		
Betulinic acid	Between treatments	2	191983.73**	3.01
	Within treatments (Between replications)	6	0.172	
	Total	8		
Antioxidants	Between treatments	2	113.453**	6.82
	Within treatments (Between replications)	6	0.154	
	Total	8		

n.s., *, and **: non-significant, significant at 5%, and 1% probability levels, respectively (Duncan test).

جدول ۵- مقایسه میانگین محتوی متابولیت‌های ثانویه قارچ ***Ganoderma lucidum*** در تیمارهای مختلف

(قارچ طبیعی، تیمار ۹۰ دقیقه مغناطیس در سطح ۶۰ میلی تسلا و شاهد)

Table 5. Means comparison of secondary metabolites content in *Ganoderma lucidum* in different treatments (natural fungus, 60 mT magnetization for 90 min treatment, and control)

Secondary metabolite	Natural fungus	60 mT magnetization for 90 min	Control
Betulin	$243.7^{b} \pm 0.205$	$614.7^{a} \pm 0.301$	$162.2^{c} \pm 0.315$
Betulinic acid	$532.6^{a} \pm 0.298$	$127.2^{b} \pm 0.049$	$66.9^{c} \pm 0.284$
Ascorbic acid	$1.32^{a} \pm 0.023$	$0.74^{b} \pm 0.003$	$0.53^{c} \pm 0.025$
Total polysaccharides	$0.35^{b} \pm 0.002$	$1.77^{a} \pm 0.005$	$1.81^{a} \pm 0.30$
Astaxanthin	$1.77^{a} \pm 0.014$	$0.006^{b} \pm 0.009$	$0.004^{b} \pm 0.003$
Antioxidants	$75.1^{b} \pm 0.002$	$74.8^{b} \pm 0.005$	$85.9^{a} \pm 0.060$
Total ganoderic acid	1.88 ± 0.002	1.87 ± 0.003	1.83 ± 0.030

Similar letters in each row indicate the absence of significant differences between treatments (Duncan test).

مقدار بتولین تیمار براساس رابطه Y=3620X+190740 و ضریب همبستگی ۰/۹۹ محاسبه گردید. تیمار منتخب ۶۰۹۰ باعث القاء میزان بالای بتولین گردید، به‌نحوی که مقدار بتولین در این تیمار ۶۱۴/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، در حالی که میزان بتولین در قارچ طبیعی به مراتب پایین‌تر و در حد ۰/۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ۲۴۳ بود (جدول ۵). بتولین در نمونه شاهد (بدون تیمار مغناطیس) ۱۶۲/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. میزان بتولینیک اسید قارچ، تیمار و شاهد با توجه به رابطه Y=3423.7X-10509 و ضریب همبستگی ۰/۹۹ به‌ترتیب ۵۳۲/۷، ۱۲۷/۲ و ۶۶/۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. میزان پلی‌ساکارید کل با رابطه استاندارد Y=0.0017X+0.0745 و ضریب همبستگی ۰/۹۸ محاسبه و مشخص شد. نمونه‌های تولید شده آزمایشگاهی از میزان بالاتری پلی‌ساکارید برخوردار بودند، به‌نحوی که بیش از ۵ برابر (برای شاهد، تیمار منتخب و قارچ به‌ترتیب ۱/۸۱، ۱/۷۷، ۰/۳۵۷ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) هستند. در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشخص شد که حداکثر مقدار (حدود ۸۶٪) مربوط به نمونه‌های شاهد است، قارچ طبیعی و تیمار منتخب ۶۰۹۰ (حدود ۷۵٪) در یک گروه آماری قرار گرفتند. مقدار آسکوربیک اسید براساس رابطه Y=0.0002X-0.0734 با ضریب همبستگی ۰/۹۹ اندازه‌گیری شد. میزان این ترکیب ثانویه در نمونه‌های آزمایشگاهی بدون الیسیتور ۲/۵ برابر کمتر و در نمونه‌های تیمار شده ۱/۷ برابر کمتر است. به‌نحوی که برای قارچ طبیعی، تیمار منتخب ۶۰۹۰ و شاهد به‌ترتیب ۱/۲۲، ۰/۷۴ و ۰/۵۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده و در سه گروه مجزا قرار گرفتند. آستاگزانتین در نمونه‌های آزمایشگاهی مقادیر خیلی کمی دارد، به‌نحوی که میزان آن در قارچ طبیعی، تیمار منتخب و شاهد به‌ترتیب ۱/۷۷، ۰/۰۰۶ و ۰/۰۰۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. گانودریک اسید تیمار منتخب براساس فرمول استاندارد تیمول Y=0.382X+0.9439 و ضریب همبستگی ۰/۹۷ در دو حالت درون سلولی و برون سلولی اندازه‌گیری و با تیمار شاهد مقایسه شد. بیشترین میزان گانودریک اسید در عصاره درون سلولی مشاهده شد و عصاره‌های برون سلولی و قارچ طبیعی به‌صورت مشترک در گروه پایین‌تر قرار گرفتند (به‌ترتیب ۲/۵۳، ۲/۴۳ و ۲/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر).

بحث

افزایش تولید بیومس و متابولیت‌های ثانویه، از شرایط اقتصادی بودن پروژه‌های مربوط به کاربرد منابع گیاهی در شرایط in vitro است. با همین هدف، میدان مغناطیسی به‌عنوان الیسیتور در کشت‌های میسلیومی قارچ گانودرما لوسیدوم در شرایط in vitro در نظر گرفته شد. نتایج تجزیه‌وتحلیل داده‌های این تحقیق نشان داد که اعمال ۹۰ دقیقه‌ای میدان مغناطیسی با قدرت ۶۰ میلی‌تسلا باعث رشد و زی‌توده بیشتر نسبت به سایر تیمارها می‌شود. همین تیمار میزان آنتی‌اکسیدان بیشتری نسبت به سایر تیمارهای مغناطیس اعمال شده را نشان داد، اگرچه مدت زمان اعمال تیمار و سطح مغناطیس اثر متقابل معنی‌داری بر نتایج نداشت. در کل براساس تقسیم‌بندی مقدار رشد میسلیوم قارچ‌ها که توسط Sanei و Razavi (۲۰۰۶) انجام شد، پرگنه قارچ گانودرما لوسیدوم در محیط PDA با میانگین رشد ۷/۹ سانتی‌متر در طی ۱۰ روز در طبقه رشد «خیلی سریع» قرار دارد. در این تحقیق مطالعه روند رشد نشان داد که میدان مغناطیس به‌عنوان یک الیسیتور فیزیکی باعث ایجاد تنش در میسلیوم‌ها شده و این تنش با تغییر در تعادل بیوشیمیایی سلول، احتمالاً تولید آنزیم‌های مختلف و افزایش PH محیط باعث سینوسی شدن نمودار رشد گردید که نشان از مصرف انرژی نمونه‌ها برای دفاع در مقابل تنش و در نتیجه القاء و تجمع ترکیب‌های ثانویه است (Rezaei *et al.*, 2010؛ Javanmardi *et al.*, 2008؛ Manoliua *et al.*, 2006). اعمال الیسیتورها معمولاً باعث تغییراتی در شاخص‌های فیزیولوژیکی و زیست شیمیایی منابع گیاهی می‌شوند؛ این تغییرات از طریق القاء پاسخ‌های دفاعی باعث انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاه شده و با اهداف کاربرد تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Zhao *et al.*, 2005). اثر میدان مغناطیسی به‌عنوان الیسیتور در برخی تحقیقات

بررسی شده است. در پژوهشی که توسط Behroozi و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد، دریافتند که اعمال شدت میدان ۴ و ۱ میلی‌تسلا برای ۲ روز به‌ترتیب باعث افزایش قطر پرگنه در قارچ صدفی (*Pleorotus florida*) شد؛ از سویی، اعمال تیمار ۶ میلی‌تسلا برای مدت طولانی‌تر ۲ تا ۳ روز باعث بازدارندگی رشد پرگنه قارچ نسبت به شاهد گردید. براساس تحلیل این نویسندگان، اعمال میدان مغناطیسی با شدت مناسب، بر میزان شار یون‌ها به‌ویژه کلسیم در غشای سلول اثر گذاشته و باعث افزایش تقسیم سلولی و در نهایت افزایش رشد می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر القاء میدان مغناطیسی سبب افزایش سرعت رشد مخمر *Saccharomyces cerevisiae* و *Candida albicas* در شدت‌های کمتر از ۱ میلی‌تسلا شد. چهار عامل زمان تیمار، دامنه و بسامد میدان مغناطیسی و دما علاوه‌بر شرایط بیولوژیکی در فرایند رشد مخمر *Saccharomyces cerevisiae* نیز مؤثر هستند (Mehedintu & Berg, 1997). در این تحقیق، میدان مغناطیسی بر شاخص‌های رشد میسلیوم گانودرما لوسیدوم اثر معنی‌داری نداشت که با نتایج Fiedler و همکاران (۱۹۹۵)، Mehedintu و Berg (۱۹۹۷) و Behroozi و همکاران (۲۰۱۱)، مبتنی بر اثرهای معنی‌دار مغناطیس بر رشد ارگانیسم زنده مطابقت ندارد. الیسیتورها با روش‌های بیوفیزیک در موارد زیادی بر بیوسنتز و تولید متابولیت‌های ثانویه ارگانیسم‌های زنده تأثیرگذارند. الیسیتورها ممکن است ژن‌های جدیدی را فعال کنند که آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی مختلفی را راه‌اندازی کنند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه شوند (Zhao *et al*., 2005). بنابراین، با توجه به نوع گونه و شدت میدان مغناطیسی اثرهای آن نیز متفاوت می‌باشد. ارگانسیم‌های زنده به‌دلیل داشتن یون‌ها و رادیکال‌های آزاد در غشاء سلولی از میدان‌های مغناطیسی تأثیر می‌پذیرند (Mehedintu & Berg, 1997). در این تحقیق تیمار ۹۰ دقیقه‌ای در معرض ۶۰ میلی‌تسلا میدان مغناطیسی از بین تیمارهای اعمال شده انتخاب و ترکیب‌های ثانویه آن ارزیابی شد. نتایج نشان داد در همه ترکیب‌های اندازه‌گیری شده اختلاف معنی‌داری بین قارچ طبیعی، میسلیوم تیمار شده با مغناطیس و میسلیوم بدون اعمال تیمار (شاهد) وجود دارد. مقدار بتولین که یک ترکیب ضد سرطانی قوی برای طیف وسیعی از سرطان‌ها است (Nazari *et al*., 2018)، به‌صورت تیمار منتخب> قارچ> شاهد بود. میزان بتولین در تیمار مغناطیس شده بیشتر از ۲/۵ برابر قارچ طبیعی و ۳/۷ برابر میسلیوم شاهد می‌باشد که نتیجه بسیار مطلوبی است. خاصیت ضد توموری در طیف وسیعی از سرطان‌ها، ضد ویروسی و ضد باکتریایی از مهمترین خواص بتولین هستند (Rastogi *et al*., 2015). پلی‌ساکارید در بستر کشت میسلیوم تیمار شده ۵/۰۵ برابر و شاهد ۵/۱۷ برابر قارچ طبیعی اندازه‌گیری شد. پلی‌ساکاریدها خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و محافظت‌کنندگی در برابر اشعه و تقویت سیستم ایمنی دارند. مقدار پلی‌ساکاریدهای کل موجود در قارچ گانودرما لوسیدوم برای سنجش کیفیت محصول تولید شده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Yang *et al*., 2007؛ Keypour *et al*., 2020). تحقیقات دانشمندان نشان داده است که پروتئین‌های متصل به پلی‌ساکاریدهایی که از این قارچ استخراج شده است، دارای فعالیت ضدتومور هستند (Wang *et al*., 2002). نتیجه حاصل شده در مورد این دو ترکیب ثانویه، بسیار حائز اهمیت است. ترکیب پر اهمیت دیگر اندازه‌گیری شده بتولینیک اسید می‌باشد. خواص ضد توموری و سمّیت سلولی بتولینیک اسید که یک ترکیب تری‌ترپن پنج حلقه‌ای است به‌طور گسترده در انواع رده‌های سلولی تومور انسانی، نمونه‌های تومور اولیه و مدل‌های موش مطالعه شده و سیتوتوکسیک بودن آن با سازوکار عمل القاء استرس اکسیداتیو میتوکندری به اثبات رسیده است. به این ترتیب این ماده می‌تواند سلول‌های سرطانی را از بین ببرد اما هیچ اثر آشکاری بر سلول‌های طبیعی نداشته باشد (Jiang *et al*., 2021). میزان این ترکیب در قارچ طبیعی حدود ۵۳۲ و در تیمار شاهد ۶۶/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. الیسیتور مغناطیس در منتخب ۶۰۹۰ باعث افزایش دو برابری آن نسبت به تیمار شاهد گردید. با توجه به خواص این ترکیب

و همین‌طور دوره کوتاه‌مدت حصول نتایج و سرعت رشد بالا در شرایط In vitro، نتیجه مثبت قابل تأملی از این تیمار حاصل شده است. مقادیر سایر ترکیب‌های اندازه‌گیری شده همانطور که انتظار هم می‌رفت در قارچ بیشتر است. در اغلب مواقع، تولید متابولیت‌های ثانویه در میسلیوم قارچ کمتر از اندام بارده می‌باشد. با توجه به سرعت رشد بالای میسلیوم‌ها افزایش مقدار این ترکیب‌ها با کمک الیسیتورها به‌عنوان یک راه حل مفید تلقی می‌شود (Rao & Ravishankar, 2002). آسکوربیک اسید (ویتامین C و یکی از مهمترین آنتی‌اکسیدان‌ها) و آستاگزانتین (جزء کاروتنوئیدها با فعالیت غیرمعمول و بسیار قوی آنتی‌اکسیدانی) در قارچ طبیعی> تیمار ۶۰۹۰> شاهد می‌باشد، بااین‌حال در هر دو این میزان در نمونه تیمار شده بیشتر از نمونه شاهد است. غلظت آسکوربیک اسید قارچ ۱/۷ برابر تیمار و ۲/۵ برابر شاهد بود. غلظت آستاگزانتین نیز در قارچ طبیعی ۲۹۵ برابر تیمار ۶۰۹۰ و شاهد است. در عین حال، آستاگزانتین تیمار ۶۰۹۰، ۱/۵ برابر شاهد بود. Rajasekaran و Kalaimagal (۲۰۱۱) در تجزیه‌وتحلیل مقدار آسکوربیک اسید و درصد آنتی‌اکسیدان قارچ گانودرما لوسیدوم مقدار آسکوربیک اسید ۱۳/۵۷±۱/۵۷ میلی‌گرم در گرم و حداکثر درصد مهار رادیکال آزاد را ۷۲/۲۴٪ بدست آوردند. میسلیوم‌های فاقد تیمار بیشترین درصد آنتی‌اکسیدان را در حد ۸۵٪ داشتند. آنتی‌اکسیدان قارچ و میسلیوم تیمار شده مقداری کمتر و در حد ۷۵٪ بود. میزان گانودریک اسید کل در دو حالت درون سلولی و برون سلولی بررسی شد. بیشترین مقدار در شرایط درون سلولی (میسلیوم) به میزان ۱/۹۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود، قارچ طبیعی و محیط کشت (برون سلولی) حدوداً میزان یکسانی (۱/۸۷ و ۱/۸۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) گانودریک اسید داشتند. گانودریک اسید یک تری‌ترپن با خاصیت آنتی‌تومور می‌باشد (Liu *et al.*, 2011) و دلیل مزه تلخ گانودرما نیز هست. نتایج حاصل از کشت‌های آزمایشگاهی تفاوت خیلی کمی با قارچ طبیعی دارد و با هدف بهره‌برداری از این تری‌ترپن قابل توجه است. تنش ناشی از مغناطیس در موارد زیادی باعث ترشح متابولیت‌ها در سلول می‌شود که می‌توان به تحقیق Shang و همکاران (۲۰۰۴) در رشد سلول و تولید دی‌ترپنوئید تاکسول از گونه *Taxus chinensis* var. *mairei* در کشت سوسپانسیون اشاره کرد که مغناطیس باعث افزایش ۱/۴ برابری نسبت به شاهد شد. در مطالعه‌ای دیگر، Gao و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر مثبت میدان مغناطیسی را بر افزایش فعالیت اسید سیتریک و فعالیت سلولازی آسپرژیلوس نیجر گزارش کردند، ضمن اینکه اذعان داشتند افزایش مدت زمان جریان میدان مغناطیسی باعث کاهش این متابولیت‌ها می‌گردد. در طول چرخه زندگی، موجودات زنده به‌طور مداوم در معرض محرک‌های مختلف خارجی قرار می‌گیرند که این موضوع مستلزم آن است که پاسخ‌های کافی برای حفظ هموستاز سلولی داده شود. عوامل استرس‌زا، به‌طورکلی باعث تغییراتی در بیان ژن می‌شوند که منجر به واکنش‌های تطبیقی در پروتئوم (سنتز پروتئین‌های مربوطه) یا سطوح متابولوم (تولید متابولیت‌های ثانویه) می‌شود (Vo *et al.*, 2021). با توجه به نتایج حاصل شده در این تحقیق و تحقیق‌های مشابه، به نظر می‌رسد القاء میدان مغناطیسی باعث دفاع سلولی، تجمع و ترشح متابولیت‌ها شده و اثرهای مثبتی داشته است.

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که در این تحقیق تأثیر مغناطیس به‌عنوان یک الیسیتور غیرزنده بر بازدهی متابولیت‌های برون سلولی در واقع بستر رشد میسلیوم تیمارشده بررسی شد که نتایج آن می‌تواند در نوع خود نوآوری محسوب شود. اثر معنی‌دار میدان مغناطیسی بر متابولیت‌های ثانویه بتولین، بتولینیک اسید، گانودریک اسید کل و آسکوربیک اسید تیمار منتخب ۶۰۹۰ در مقایسه با شاهد معنی‌دار شد. اختلاف چندین برابری بین برخی مقادیر متابولیت‌های ثانویه قارچ و تیمار و شاهد نشان از واکنش دفاعی سلول در برابر الیسیتور میدان مغناطیسی و در نهایت انباشت ترکیب‌های ثانویه سلول است. به‌طور کلی، استفاده از الیسیتورهای غیرزنده فیزیکی مانند میدان مغناطیسی در دوزهای مناسب، در بسیاری از پژوهش‌های رشته علوم

زیستی جنگل با اهداف مختلف ازجمله افزایش جوانه‌زنی بذر، کاهش استفاده بذر برای نهالستان، افزایش توده ریشه، افزایش عملکرد توده رویشی، افزایش مقاومت در برابر انواع تنش‌ها و بهبود مقادیر متابولیت‌های ثانویه رستنی‌های دارویی جنگل کاربرد دارد.

References

- Adeyi, A.O., Awosanya, S.A., Adeyi, O.E., James, A.S. and Adenipekun, C.O., 2021. Ganoderma lucidum ethanol extract abrogates metabolic syndrome in rats: In vivo evaluation of hypoglycemic, hypolipidemic, hypotensive and antioxidant properties. Obesity Medicine, 22: 100320.
- Ambati, R.R., Phang, S.M., Ravi, S. and Aswathanarayana, R.G., 2014. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications a review. Marine Drugs, 12(1): 128-152.
- Behroozi, R., Farsi, M., Jafari, N. and Sheikhpour Ahandani, M., 2011. The effect of static magnetic field on some growth characteristics of oyster mushrooms (*Pleorotus florida*). Journal of Horticultural Sciences, 26(1): 1-9.
- Chang, S.T. and Buswell, J.A., 1999. *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae)- a mushrooming medicinal mushroom. International Journal of Medicinal Mushrooms, 1(2): 139-146.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28(3): 350-356.
- Fang, Q.H. and Zhong, J.J., 2002. Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum*. Biotechnology Progress, 18(1): 51-54.
- Fiedler, U., Grobner, U. and Berg, H., 1995. Electrostimulation of yeast during fermentation. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 38: 423-425.
- Frey, G.E., Chamberlain, J.L. and Jacobson, M.G., 2021. Producers, production, marketing, and sales of non-timber forest products in the United States: a review and synthesis. Agroforestry Systems, 1-14.
- Gao, M., Zhang, J. and Feng, H., 2011. Extremely low frequency magnetic field effects on metabolite of *Aspergillus niger*. Bioelectromagnetics, 32(1): 73-78.
- Javanmardi, J., Ranjbar, M. and Shams, Gh., 2008. Effect of magnetic field on growth indices of oyster mushroom (*Pleurotus florida*). Proceeding of the 17th Congress of The International Society for Mushroom Scince, 459-913.
- Jiang, W., Li, X., Dong, S. and Zhou, W., 2021. Betulinic acid in the treatment of tumour diseases: Application and research progress. Biomedicine & Pharmacotherapy, 142: 111990.
- Keypour, S., Riahi, H., Asef, M.R., Abdollahzadeh, J., Borhani, A. and Safaie, N., 2020. The true nature of *Ganoderma* in Iran: Taxonomy based on ITS and mtSSU rDNA. Forest Pathology, 50(4): e12605.
- Kim, H.W. and Kim, B.K., 1999. Biomedicinal triterpenoids of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetideae). International Journal of Medicinal Mushrooms, 1(2): 121-138.
- Klein, B.P. and Perry, A.K., 1982. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. Journal of Food Science, 47(3): 941-945.
- Krasutsky, P.A., 2006. Birch bark research and development. Natural Product Research, 23: 919-942.
- Liu, G.Q., Xiao, H.X., Wang, X.L., Zhao, Y., Zhang, Y.G. and Ren, G.P, 2011. Stimulated production of triterpenoids of *Ganoderma lucidum* by an ether extract from the medicinal insect, *Catharsius molossus*, and identification of the key stimulating active components. Applied Biochemistry and Biotechnology, 165(1): 87-97.
- Manoliua, A.L., Opricab, L., Olteanub, Z., Neacsub, L., Artenieb, V., Creangac, D.E., Rusuc, L. and Bodalec, L., 2006. Peroxidase activity in magnetically expose cellulolytic fungi. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 300(1): 323-326.
- Mehedintu, M. and Berg, H, 1997. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 43: 67-70.
- Mohan, K., Padmanaban, M. and Uthayakumar, V., 2015. Isolation, structural characterization and antioxidant activities of Polysaccharide from *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes). American Journal of Biology and Life Sciences, 3(5): 168-175.
- Moraes, R.M., Cerdeira, A.L. and Lourenço, M.V., 2021. Using micropropagation to develop medicinal plants into crops. Molecules, 26(6): 1752.
- Nazari, J., Payamnoor, V., Kavosi, M.R. and Asadi, J., 2018. Extraction of anti-cancer triterpenoids (betulinic acid and betulin) from the birch bark-inhabiting lichen (*Ramalina sinensis*). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 34(4): 604-616.
- Noora, H., Shahabivand, P., Karimi, F., Aghaei, A. and Darvish, F., 2017. Optimizing the growth and biomass production of the endophytic fungus

- Taghizadeh, M., Nasibi, F., Kalantari, K.M. and Ghanati, F., 2019. Evaluation of secondary metabolites and antioxidant activity in *Dracocephalum polychaetum* Bornm. cell suspension culture under magnetite nanoparticles and static magnetic field elicitation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 136(3): 489-498.
- Tang, W., Liu, J.W., Zhao, W.M., Wei, D.Z. and Zhong, J.J., 2006. Ganoderic acid T from *Ganoderma lucidum* mycelia induces mitochondria mediated apoptosis in lung cancer cells. Life Sciences, 80(3): 205-211.
- Vashisth, A. and Nagarajan, S., 2010. Effect on germination and early growth characteristics in sunflower (*Helianthus annuus*) seeds exposed to static magnetic field. Journal of plant physiology, 167(2): 149-156.
- Vo, K.T.X., Rahman, M.M., Rahman, M.M., Trinh, K.T.T., Kim, S.T. and Jeon, J.S., 2021. Proteomics and metabolomics studies on the biotic stress responses of rice: an update. Rice, 14(1): 1-16.
- Wang, Y.Y., Khoo, K.H., Chen, S.T., Lin, C.C., Wong, C.H. and Lin, C.H., 2002. Studies on the immunomodulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: functional and proteomic analyses of a fucose containing glycoprotein fraction responsible for the activities. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 10(4): 1057-1062.
- Wasser, S.P., 2005. Reishi or ling zhi (*Ganoderma lucidum*). Encyclopedia of Dietary Supplements, 1: 603-622.
- Xiong, X., Zhen, Z., Liu, Y., Gao, M., Wang, S., Li, L. and Zhang, J., 2020. Low-frequency magnetic field of appropriate strengths changed secondary metabolite production and Na+ concentration of intracellular and extracellular *Monascus purpureus*. Bioelectromagnetics, 41(4): 289-297.
- Yang, X., Chen, Ch., Mi, K. and Yang, Q., 2007. The potential use of limulus G test assay for evaluation of immunomodalatory activity of *Ganoderma* Polysaccarides. Int. J. Med. Mushr, 9(3-4): 219-220.
- Yen, G.C. and Wu, J.Y., 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. Food Chemistry, 65(3): 375-379.
- Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23(4): 283-333.

Piriformospora indica. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 30(3): 304-312.
- Pordel, R., Payamnoor, V., Mohammadi, J., Goodarzi, G., Yousefi, H. and Ahmadi, A., 2022. Improving the performance of birch seeds (*Betula pendula*) using nanoprime and magnetic field. Iranian Journal of Forest, 13(4): 425-436.
- Rajasekaran, M. and Kalaimagal, C., 2011. In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of a medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum*. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 3(9): 1427-1433.
- Rao, S.R. and Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology Advances, 20(2): 101-153.
- Rastogi, S., Pandey, M.M. and Kumar, S.W., 2015. Medicinal plants of the genus *Betula*: Traditional uses and a phytochemical pharmacological revie. Journal of Ethnopharmacology, 159: 62-83.
- Rezaei, A., Ghanati, F. and Behmanesh, M., 2010. Static magnetic field improved salicylic acid effect on taxol production in suspension cultured hazel (*Corylus avellana*) cells. In 6th International workshop on Biological Effects of Electromagnetic Fields, 70-71.
- Sabu, A., Dave, P. and Jain, N.K., 2018. Static electromagnetic field (EMF) of low frequency enhances seed germination and plant growth at early stages of development. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences, 6(6): 966-972.
- Sanei, J. and Razavi, A., 2006. Agenda of Mycology Laboratory. Peyk Reyhan Publications, 211p.
- Shang, G.M., Wu, J.C. and Yuan, Y.J., 2004. Improved cell growth and Taxol production of suspension-cultured *Taxus chinensis* var. *mairei* in alternating and direct current magnetic fields. Biotechnology letters, 26(11): 875-878.
- Siwulski, M., Budzyńska, S., Rzymski, P., Gąsecka, M., Niedzielski, P., Kalač, P. and Mleczek, M., 2019. The effects of germanium and selenium on growth, metalloid accumulation and ergosterol content in mushrooms: Experimental study in Pleurotus ostreatus and *Ganoderma lucidum*. European Food Research and Technology, 245(9): 1799-1810.
- Siwulski, M., Sobieralski, K., Golak-Siwulska, I., Sokol, S. and Sekara, A., 2015. *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr.) Karst. -health-promoting properties: A review. Herba Polonica.61(3): 105-118.

Magnetism effects on secondary metabolites changes in *Ganoderma lucidum* as a eukaryotic organism

L. Moradipour[1] and V. Payam Noor[2*]

1- Ph.D. student, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2*- Corresponding author, Faculty of Forest Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, E-mail: mnoori56@gmail.com

Received: June 2022 Revised: November 2022 Accepted: November 2022

Abstract

In biotechnology processes, increasing the production of biomass and secondary metabolites is one of the economic factors of such projects. The present study was conducted to investigate the effects of magnetic field as an abiotic elicitor on increase of biomass and secondary metabolites of *Ganoderma lucidum*. Mycelium with a diameter of 1 cm of pured fungi was exposed to magnetism at four levels including 0, 20, 40, and 60 mT for 0, 30, 60, and 90 min with three replications. The best treatment was selected based on growth rate and antioxidant activity. The amounts of secondary compounds in mycelium under selected magnetic field (60 mT for 90 min) including betulin, betulinic acid, ascorbic acid, astaxanthin, total polysaccharide, and antioxidants were measured and compared with control and natural fungi. The results showed that magnetization increased betulin (a potent anticancer triterpene) more than 2.5 times compared to natural fungi and 3.7 times compared to control mycelium. Polysaccharides concentration in the treated mycelium and control media was obtained 5.05 and 5.17 times more than natural fungi, respectively. Ganoderic acid content was measured in the treated mycelium (intracellular) and PDB medium (extracellular). The highest amount of ganoderic acid (1.9 $mg.ml^{-1}$) was obtained in the treated mycelium. Natural fungi and PBD medium had almost the same amount of this compound (1.87 and 1.86 $mg.ml^{-1}$). The amount of betulinic acid (an anticancer compound derived from betulin), ascorbic acid, and astaxanthin was obtained high in natural fungus followed by 90 min magnetization at 60mT level treatment and control, respectively. Antioxidants percentage was about 85% in control and about 75% in natural fungi and treated mycelium. According to the results, there seems to be a good prospect to use *in vitro* cultures of *Ganoderma* instead of using natural fungi and also constructing costly farms.

Keywords: Betulin, betulinic acid, ascorbic acid, astaxanthin, ganodric acid, total polysaccharide.