

## Presence of the *DBAT* gene and *in vitro* production of Taxol in endophytic fungi isolated from Iranian yew (*Taxus baccata*)

Seifi M<sup>1</sup>, Nazeri S<sup>1\*</sup>, Soltani J<sup>2</sup>

1- Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University of Hamedan, Hamedan, I. R. Iran.

2- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University of Hamedan, Hamedan, I. R. Iran.

Received October 29, 2012; Accepted June 2, 2013

### Abstract:

**Background:** Taxol, as a plant-derived anticancer drug, is widely used for the treatment of a variety of cancers. Traditional methods of extracting Taxol from the bark of *Taxus* species are inefficient and costly. Therefore, searching for alternative sources of this valuable compound is necessary.

**Materials and Methods:** In this study, endophytic fungi are isolated from the bark of Iranian yew (*Taxus baccata*). Isolates were grown in Potato Dextrose Broth medium for 21 days. Genomic DNAs were extracted and subjected to polymerase chain reaction (PCR) analysis for the presence of the *DBAT* gene, a key gene in Taxol biosynthesis pathway. The broth culture of the *DBAT* containing fungi was extracted and Taxol production was assessed by thin layer chromatography.

**Results:** A total of 60 endophytic fungal strains were isolated from Iranian yew. In 22 isolates, the presence of *DBAT* gene was confirmed. The results of thin layer chromatography showed the production of Taxol by some endophytic fungi isolates.

**Conclusion:** Presence of *DBAT* gene as well as Taxol production were demonstrated in some endophytic fungi isolated from Iranian yew. These results showed that Taxol-producing endophytic fungi of yew can be a suitable alternative source for the Taxol supply.

**Keywords:** Taxol, Anticancer drug, Endophytic fungi, *DBAT* gene, Yew

\* Corresponding Author.

Email: snblnazeri@yahoo.com

Tel: 0098 918 319 1565

Fax: 0098 811 442 4012

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences July, 2013; Vol. 17, No 3, Pages 255-260

Please cite this article as: Seifi M, Nazeri S, Soltani J. Presence of the DBAT gene and *in vitro* production of Taxol in endophytic fungi isolated from Iranian yew (*Taxus baccata*). Feyz 2013; 17(3): 255-60.

# حضور ژن DBAT و تولید داروی ضدسرطان تاکسول در قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه سرخدار بومی ایران (*Taxus baccata*) در شرایط درون‌شیشه‌ای

مقصود سیفی<sup>۱</sup>، سنبل ناظری<sup>\*۲</sup>، جلال سلطانی<sup>۳</sup>

## خلاصه:

سابقه و هدف: تاکسول یک داروی ضدسرطان با منشاء گیاهی است که به طور گستردۀ برای درمان انواع مختلف سرطان استفاده می‌شود. روش‌های استخراج سنتی تاکسول از گونه‌های سرخدار بسیار سخت و هزینه‌بر است. بنابراین، بررسی منابع جایگزین برای این داروی با ارزش ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق قارچ‌های اندوفیت از پوست سرخدار بومی ایران (*Taxus baccata*) جداسازی شدند. ایزوله‌ها در محیط (Potato Dextrose Broth) PDB کشت داده شده و به مدت ۲۱ روز انکوبه شدند. DNA ژنومی نمونه‌ها استخراج گردید و حضور ژن DBAT (۱۰-داستیل باکاتین استیل ترانسفراز)، یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوستزی تاکسول، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بررسی شد. عصاره‌گیری از کشت مایع قارچ‌های حاوی ژن DBAT انجام شده و تولید تاکسول در آنها به وسیله روش کروماتوگرافی لایه نازک بررسی گردید.

نتایج: در مجموع ۶۰ ایزوله قارچ اندوفیت از سرخدار بومی ایران جداسازی گردید. حضور ژن DBAT در ۲۲ ایزوله تائید شد. نتایج کروماتوگرافی لایه نازک تولید تاکسول را در محیط کشت برخی از ایزوله‌ها به اثبات رساند.

نتیجه‌گیری: در برخی از قارچ‌های جدادشده از سرخدار ایرانی حضور ژن مسیر بیوستزی و هم‌چنین تولید تاکسول به اثبات رسید. این نتایج نشان داد که قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول سرخدار می‌توانند منبع جایگزین مناسبی برای تامین تاکسول باشند. مطالعات تکمیلی در این مورد در حال انجام است.

**واژگان کلیدی:** تاکسول، داروی ضدسرطان، سرخدار، قارچ اندوفیت، ژن DBAT

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۲، صفحات ۲۶۰-۲۵۵

در نهایت با انجام آزمایشات تکمیلی، تاکسول در سال ۱۹۹۲ جهت درمان سرطان تخمدان و در سال ۱۹۹۴ برای درمان سرطان سینه از سوی FDA مورد تأیید قرار گرفت [۱]. تاکسول در گروه ترکیبات پایدار کننده ساختار میکروتوبول‌ها طبقه‌بندی می‌شود که پویایی میکروتوبول‌ها را که در تقسیم سلولی کاملاً ضروری است هدف قرار می‌دهد [۵]. میکروتوبول‌ها از هترودیمرهای  $\alpha$  و  $\beta$  توبولین به شکل رشته‌های استوانه‌ای طویل در داخل سلول تشکیل شده‌اند که به شکل پویایی در داخل سلول سرهمندی و از هم پاشیده می‌شوند. این پویایی در انجام وظایف سلولی از جمله در تقسیم میتوуз نقش حیاتی دارد. تاکسول با اتصال به  $\beta$  توبولین در ساختار میکروتوبول، مانع از هم پاشیدن آن شده و پویایی میکروتوبول‌ها را در داخل سلول از بین می‌برد [۱]. با از بین رفتن پویایی میکروتوبول‌ها تقسیم سلولی مختل شده و این اختلال سبب القاء فرایند آپوپتوزیس و از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌گردد [۶،۷]. در حال حاضر منبع اصلی تولید تاکسول روش نیمه سنتز آن از پیش ماده‌های اصلی اش از جمله باکاتین-III است [۷]. باکاتین-III در مراحل انتهایی بیوستز تاکسول با اضافه شدن یک گروه استیل به کربن شماره ۱۰ هسته تاکسان بوجود می‌آید (شکل ۱). آنزیم ۱۰-داستیل باکاتین استیل ترانسفراز (DBAT) که شماره ۱۰۱۸۳۱۹۱۵۶۵ تلفن: ۰۸۱۱۴۴۲۴۰۱۲ دوچرخه: snblnazeri@yahoo.com پست الکترونیک: تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۳/۱۲ تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۷

## مقدمه

تاکسول یکی از مهمترین داروهای ضدسرطان است که در حوزه کلینیکی به طور گستردۀ بر علیه سرطان‌های مانند کولون، رکتوم، ریه، رحم، تومورهای سر و گردن، سرطان سینه متاستاتیک و نوع خاصی از سرطان وابسته به بیماری ایدز استفاده می‌شود [۲،۱]. اخیرا نیز استفاده از تاکسول در درمان بیماری‌هایی مانند آرتربیت روماتوئید، مالاریا، آزادیم و بیماری ایزیستک اتوزومنی غالباً کلیه گزارش شده است [۳]. پس از بررسی‌های کلینیکی بروی رده-های مختلف سلول‌های سرطانی موش مشخص شد که تاکسول با مکانیسم عمل منحصر به فرد خود با تشکیل دوک تقسیم غیر طبیعی، موجب توقف رونویسی DNA در مرحله G2/M در تقسیم میتوуз شده و موجب مرگ سلول‌های در حال تکثیر می‌گردد [۴].

دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲ استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۳ استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

\* نشان نویسنده مسئول؛

همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی

تلفن: ۰۸۱۱۴۴۲۴۰۱۲ دوچرخه: snblnazeri@yahoo.com پست الکترونیک:

در صد (به مدت ۱۰ دقیقه)، جهت از بین بردن قارچ‌های اپی‌فیت و ساپروفت، استریل گردید. نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شده و به قطعات کوچک‌تر تقسیم شدند. قطعات فوق بر روی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck)، قرار داده شدند تا امکان رشد برای قارچ‌های اندوفیت فراهم گردد. محیط‌های کشت به مدت سه هفته در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه نگهداری گردیدند. پس از این مدت، نوک هیف قارچ‌های رشد یافته از قطعات پوست جدا شده و به محیط کشت PDA جدید منتقل شد. برای اطمینان از خلوص قارچ‌های به دست آمده این عمل دو بار دیگر انجام گرفت [۱۲].

استخراج DNA ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: جهت استخراج DNA ژنومی ابتدا دو قطعه  $1 \times 1$  سانتی‌متری از کشت ۳۰ ایزوله قارچی جدا گردیده و در ارلن‌های ۱۰۰ میلی-لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط Potato Dextrose (PDB) (Broth Scharlau)، کشت شدند. ارلن‌ها به مدت یک هفته rpm بر روی شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گرادو دور ۱۲۰ نگهداری گردیدند. پس از گذشت این مدت، محیط‌ها با استفاده از کاغذ صافی چهار لایه فیلتر شدند. سپس، میسیلیوم‌ها جداسازی گردیده و دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. ۱۰/۵ گرم از میسیلیوم‌ها با استفاده از نیتروژن مایع کاملاً بودر گردید و استخراج DNA ژنومی به روش CTAB انجام گرفت [۱۳]. از DNA ژنومی سرخدار به عنوان شاهد مثبت در واکنش PCR استفاده شد. برای این منظور ۱۰/۵ گرم از برگ‌های سرخدار با استفاده از نیتروژن مایع پودر گردید و استخراج DNA ژنومی به روش CTAB انجام گرفت [۱۳]. جهت بررسی حضور ژن DBAT در قارچ‌ها، از پرایمرهای اختصاصی که یک ناحیه حفاظت شده از ژن DBAT را تکثیر می‌کنند استفاده گردید [۱۴]. PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) در حجم ۲۵µl با ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (سینتاژ) انجام گرفت. مخلوط PCR به مدت ۶ دقیقه در دمای ۹۴ درجه و سپس ۳۵ سیکل در ۹۴ درجه به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۰ درجه به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۸۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. آنالیز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ در صد و دستگاه الکتروفورز (Bio Rad) صورت گرفت.

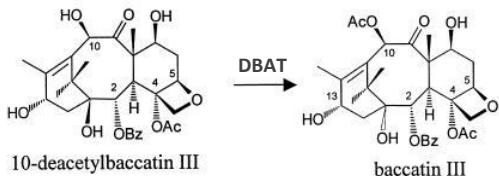
تخمیر قارچی و استخراج تاکسول: دو قطعه، در حدود ۱۰/۱ سانتی‌متر مریع، از کشت جامد ایزوله‌ها جدا گردیده و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB به علاوه ۰/۰۱ گرم بر لیتر فنیل آلانین جهت تهیه کشت سوسپانسیون قرارداده شد [۱۵]. کشت‌ها به مدت سه هفته بر روی شیکر با

این واکنش را کاتالیز می‌کنند، یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوستزی تاکسول است [۸]. به دنبال یک طرح گسترشی غربال گیاهان برای شناسایی ترکیباتی با خاصیت ضدسرطانی، تاکسول از درخت سرخدار گونه‌ی *Taxus brevifolia* جداسازی شد [۹]. با ادامه تحقیقات، این ترکیب در سایر گونه‌های سرخدار از جمله *Taxus baccata* نیز یافت شد [۵]. استخراج و خالص‌سازی تاکسول و پیش‌ماده‌های آن به دلیل مقدار بسیار کم، حدود ۰/۰۰۸ - ۰/۰۰۱ وزن خشک درخت، و حلالیت کم آن بسیار سخت و هزینه‌بر است [۱]؛ به طوری که برای به دست آوردن یک کیلوگرم تاکسول ۱۰ هزار کیلوگرم پوست برابر با ۲۵۰۰-۲۰۰۰ درخت سرخدار نیاز است [۱۰]. میکرووارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاهان، به عنوان یک منع ارزان، ساده و پذیرفته شده از لحاظ زیست محیطی برای تولید تاکسول به شمار می‌آیند [۱۰، ۳]. از مزایای میکرووارگانیسم‌ها می‌توان به رشد سریع در محیط‌های کشت ساده، امکان کشت در محیط‌های تخمیری در مقیاس وسیع، مقاومت بیشتر در برابر استرس‌ها، دست کاری ژنتیکی آسان و تولید مطمئن و نامحدود اشاره کرد که برای تولید صنعتی بسیار مهم تلقی می‌شوند [۱۱]. محققین بسیاری در سرتاسر جهان در حال جستجو به دنبال میکرووارگانیسم‌های مولد تاکسول، جهت تولید این دارو از طریق تخمیر میکروبی هستند [۱۰، ۱]. تاکنون بیش از ۳۰ جنس قارچ اندوفیت مولد تاکسول شناسایی شده است [۳]. اما به دلیل میزان تولید کم به وسیله اغلب آنها [۱۰]، جستجو به دنبال گونه‌های با میزان تولید بالا ادامه دارد. تا به امروز مطالعات بسیار اندکی بر روی قارچ‌های اندوفیت سرخدار بومی ایران صورت گرفته است. در تحقیق حاضر قارچ‌های اندوفیت از سرخدار بومی ایران جداسازی شده و حضور ژن DBAT و نیز تولید داروی ضدسرطان تاکسول در ۳۰ ایزوله از آنها مورد بررسی قرار گرفت.

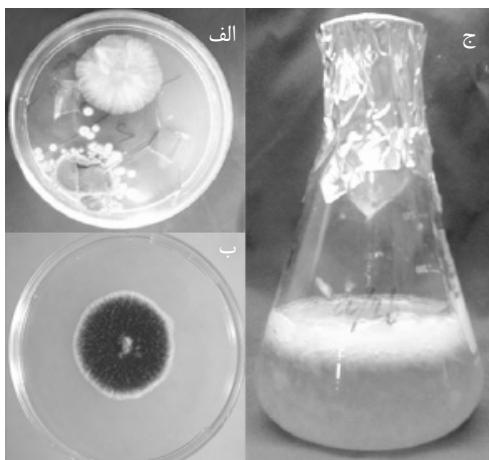
## مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از سرخدار: از درختان سرخدار (*Taxus baccata*) (شماره هریاریومی: ۳۳۰۴۹، هریاریوم دانشگاه بولمی سینا) جنگل‌های استان مازندران، در حدود ۲۰۰-۱۵۰ ساله، نمونه برداری شد. نمونه‌ها از نواحی سالم و قادر نشانه‌های بیماری از پوست ته اصلی و شاخه‌های جانبی درختان انتخاب شده و در پاکت‌های کاغذی سریسته به آزمایشگاه منتقل گردید.

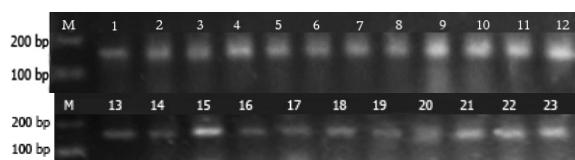
جداسازی قارچ‌های اندوفیت: پوست رویی درخت با استفاده از تیغ اسکالپل حذف شده و پوست زیرین با استفاده از اتانول ۷۰ درصد (به مدت ۱/۵ دقیقه) و هپیوکلریت سدیم ۱/۵



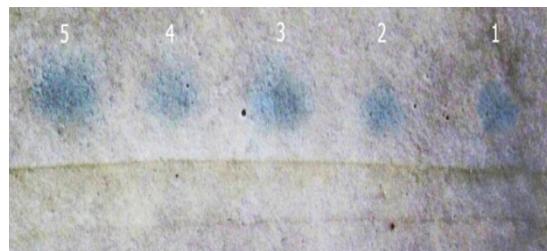
شکل شماره ۱- تشکیل باکاتین-III از ۱۰-DAB در مسیر بیوسترن تاکسول



شکل شماره ۲- کشت قارچ‌های اندوفیت. الف: قارچ‌های اندوفیت از نمونه‌های پوست سرخدار رشد یافته در محیط PDA. ب: قارچ رشد یافته در محیط PDA پس از سه بار خالص سازی. ج: قارچ رشد یافته در محیط کشت مایع PDB پس از ۲۱ روز رشد.



شکل شماره ۳- حضور ژن DBAT در PCR ژنوم سرخدار و ایزوله‌های قارچی. چاهک M، مارکر؛ چاهک ۱؛ باند مربوط به گیاه سرخدار (شاهد مثبت) و چاهک‌های ۲ تا ۲۳ باندهای مربوط به نمونه‌های قارچی.



شکل شماره ۴- کروماتوگرافی لایه نازک نمونه‌های قارچی تولید کننده تاکسول. شماره ۱، تاکسول استاندارد؛ شماره ۲ تا ۵، عصاره‌های به دست آمده از کشت قارچ‌های اندوفیت.

دور ۱۵۰ rpm و در دمای ۲۸ درجه انکوبه گردیدند [۱۶]. پس از گذشت این مدت به محیط‌های مایع، پس از حذف میسیلیوم قارچی توسط کاغذ صافی، حلال دی کلرومتان (هم‌حجم) اضافه گردید و به خوبی تکان داده شد. با استفاده از یک قیف دکاتور فاز آلی حاصل جداسازی شده و در دمای اتفاق تبخیر گردید. ماده خشک باقیمانده در ۱ میلی لیتر متانول حل گردید و در فریزر -۲۰ درجه نگهداری شد.

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): حضور تاکسول در کشت قارچ‌های اندوفیت با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک بررسی شد. برای این منظور از صفحات سیلیکاژل ۲۰×۲۰ سانتی-متر مریع و حلال‌های A: کلروفورم: متانول (۱،۰:۷)، B: کلروفورم: استونیتریل (۳:۷)، C: اتیل استات: ایزوپروپانول (۵:۹۵)، D: کلروفورم: استونیتریل (۴:۱) و E: کلروفورم: متانول (۰/۸:۹/۲) استفاده گردید. صفحات سیلیکاژل پس از قرار گرفتن ۱۰ میکرولیتر از هر عصاره و ۱۰ میکرولیتر تاکسول استاندارد (حاوی ۲۰ میکروگرم تاکسول) ران شده و با استفاده از وانیلین: اسید سولفوریک یک درصد (وزن/حجم) رنگ‌آمیزی گردید [۱۷].

#### نتایج

پس از خالص سازی قارچ‌ها، ۶۰ ایزوله که هر کدام از لحاظ شکل کلونی، رنگ و سرعت رشد باهم تفاوت داشتند از سرخدار جداسازی شد. اکثر ایزوله‌های جداسازی شده، با سرعت متفاوت، در محیط کشت جامد PDA به خوبی رشد کردند. بیشتر این ایزوله‌ها در محیط کشت مایع PDB به سرعت رشد کرده و پس از ۷ روز کل حجم محیط را پر کردند (شکل شماره ۲). استخراج شده از کمیت و کیفیت بالایی جهت انجام DNA کارهای مولکولی برخوردار بود. عدم وجود باندهای اضافی و وضوح باندها نشان‌دهنده مناسب بودن پرایمرهای مورد استفاده و شرایط PCR بود. نتایج PCR، باند مورد انتظار ۱۵۰ bp را در ۲۲ نمونه قارچی، از ۳۰ نمونه، نشان داد (شکل شماره ۳). تولید تاکسول در عصاره‌ی ایزوله‌های حاوی ژن DBAT توسط کروماتوگرافی لایه نازک بررسی گردید. از ۲۲ نمونه بررسی شده تولید تاکسول در ۴ ایزوله مشخص شد. پس از رنگ‌آمیزی، لکه مربوط به تاکسول در نمونه‌های قارچی دارای خصوصیات کروماتوگرافیکی مشابه با تاکسول استاندارد بود (شکل شماره ۴). اندازه متفاوت هاله‌ها نشان دهنده مقدار متفاوت تاکسول در عصاره‌های مورد بررسی بود.

## بحث

قارچ‌های اندوفیت تولید کننده تاکسول مورد استفاده قرار گرفت [۱۴]. در بررسی حاضر از بین ۳۰ قارچ مورد آزمایش در ۲۲ نمونه حضور ژن DBAT به اثبات رسید. Zhang و همکاران از T. media بین ۹۰ ایزوله قارچ جداسازی شده از T. media و T. yunnannensis حضور ژن DBAT را در ۱۵ ایزوله نشان داده و تولید تاکسول را در سه ایزوله گزارش کردند [۲۲]. از آنجاکه بررسی ژن در مسیر بیوسترزی می‌تواند با دقت بیشتر قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول را شناسایی کند، تحقیقات تکمیلی برروی ژن‌های دیگر درگیر در تولید تاکسول توسط این گروه در حال انجام است. حضور ژن DBAT نشان دهنده سنتز باکاتین-III توسط قارچ‌های اندوفیت است. این ترکیب هم‌اکتون به عنوان مهمترین پیش‌ماده تولید تاکسول از طریق روش نیمه‌سترزی به شمار می‌رود [۲۳]. بدین دلیل قارچ‌های حاوی این ژن که در این تحقیق قادر به تولید تاکسول نبودند، از نظر تولید باکاتین-III بسیار با ارزش هستند. مطالعات نشان داده است که هرچند روش غربال ملکولی بسیار مفید بوده و به شرایط محیطی و آزمایشگاهی وابسته نیست [۲۴]. با این حال این روش تنها اشاره به حضور برخی ژن‌های مورد نیاز جهت بیوسترز تاکسول داشته و نمی‌تواند صد درصد تولید تاکسول را تضمین کند [۲۲]. در این تحقیق روش کروماتوگرافی لایه نازک به عنوان یک غربال گر بیوشیمیابی مناسب، امکان تشخیص قارچ‌های مولد تاکسول در شرایط آزمایشگاهی را فراهم کرد. از ابتدای کشف تاکسول از محیط کشت قارچ‌های اندوفیت تاکنون، کروماتوگرافی لایه نازک به عنوان یکی از روش‌های متداول در تشخیص تاکسول در این می‌دانند. در این تحقیق هم‌چنین مشاهده گردید که قارچ‌های اندوفیت تاکسول سنتزی را به محیط کشت ترشح می‌کنند؛ این ویژگی یکی از مزایای تولید تاکسول توسط قارچ‌های اندوفیت محسوب می‌گردد، زیرا استخراج و خالص‌سازی تاکسول از محیط کشت میکروبی در مقایس صنعتی آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر است [۱۸، ۱]. با آنکه نتایج برخی از تحقیقات نشان داده که میزان تولید تاکسول توسط قارچ‌های اندوفیت در مقایسه با سرخدار نسبتاً کم است [۱۶]، اما میکرووارگانیسم‌ها با داشتن قابلیت رشد در محیط‌های کشت ساده، دوره تولیدی کوتاه و امکان دست‌کاری ژنتیکی آسان، منبع بالقوه‌ی مهمی برای تولید تاکسول به حساب می‌آیند [۱۸، ۱۱]. بعلاوه، با شناسایی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسترز تاکسول در قارچ‌های اندوفیت و با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، می‌توان میزان تولید تاکسول در قارچ‌های اندوفیت را بهبود بخشید.

قارچ‌های اندوفیت تولید کننده تاکسول به عنوان یک منبع تجدید شونده برای تولید این ترکیب بالارزش به شمار می‌آیند و از لحاظ تعداد و تنوع، که مزیتی در توسعه فرایند تخمیر میکروبی برای تولید تجاری تاکسول است، بسیار جالب توجه هستند [۱۸]. در این تحقیق از بین ۳۰ ایزوله، چهار قارچ اندوفیت میکاران مشخص کردند که از بین ۳۳ ایزوله قارچ اندوفیت جداسازی شده از Taxus wallachiana قادر به سنتز تاکسول است [۱۶]. ایزوله Caruso ۱۵۰ روش یافته در ایتالیا را جداسازی نموده و تولید تاکسول در ۱۵ ایزوله را گزارش کردند [۱۹]. نصیری و همکاران نیز ۸۰ ایزوله قارچ اندوفیت از درخت سرخدار جنگل‌های گلستان جداسازی کرده، که ۵ ایزوله توانایی تولید تاکسول در محیط کشت را داشتند [۲۰]. با توجه به نمونه برداری از نواحی سالم و فاقد نشانه‌های بیماری، استریل سازی دقیق و مناسب نمونه‌ها و هم‌چنین جداسازی قارچ‌هایی که از روی نمونه‌های چوبی شروع به رشد کرده بودند، امکان حضور قارچ‌هایی غیر اندوفیت به حداقل رسید. با سه بار خالص سازی از طریق نوک هیف از خالص بودن ایزوله‌های قارچی جداسازی شده اطمینان حاصل شد. سرعت رشد بالای اکثر قارچ‌ها در محیط کشت PDA نیز نشان دهنده مناسب بودن این محیط برای کشت قارچ‌های اندوفیت بود. قارچ‌ها در محیط کشت مایع سریع‌تر از محیط کشت جامد رشد کردند که این امر می‌تواند به علت دسترسی راحت‌تر قارچ‌ها به مواد غذایی، عدم تجمع مواد زائد در اطراف توده می‌سیلیومی قارچ‌ها، اکسیژن‌دهی بهتر و حضور اسید‌آمینه فنیل آلانین در محیط مایع باشد [۲۱]. Lili و همکاران اضافه کردن مقادیر کمی فنیل آلانین به کشت مایع قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول را مفید دانستند، آنها این امر را به وجود زنجیره جانبی از جنس فنیل آلانین در ساختار تاکسول نسبت دادند [۱۵]. غربال قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول با روش‌های مرسوم زمان‌بر و هزینه‌بر است. شناسایی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسترز تاکسول با استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR (به عنوان مارکر مولکولی) اخیراً به عنوان یک ابزار کارآمد جهت غربال اولیه قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول معرفی شده است [۲۲]. ژن DBAT یکی از ژن‌های درگیر در مراحل انتهایی مسیر بیوسترز تاکسول است، به همین علت در این تحقیق حضور ژن DBAT به عنوان مارکر مولکولی اولیه برای غربال سریع و آسان

## نتیجه‌گیری

در این تحقیق تولید داروی ضدسرطان تاکسول در کشت قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از سرخدار بومی ایران و نیز حضور ژن DBAT ژن کدکننده آنزیم مسئول سنتز باکاتین-III در مسیر بیوسنتزی، بررسی گردید. از بین ۳۰ ایزوله بررسی شده حضور ژن DBAT در ۲۲ ایزوله و تولید تاکسول در ۴ ایزوله مشخص گردید. مطالعات تکمیلی در این زمینه ادامه دارد.

## تشکر و قدردانی

از همکاری متخصصین اداره کل منابع طبیعی شهرستان نوشهر بهویژه آقای مهندس خدابخش و نیز از خانم مهندس یوسفی پور که در تهیه نمونه از گیاهان سرخدار با این گروه همکاری کردند، صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد. شایان ذکر است که این مقاله قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده و بودجه پژوهشی آن از طرف دانشگاه بوعالی سینا تأمین شده است.

## References:

- [1] Ji Y, Bi JN, Yan B, Zhu XD. Taxol-producing fungi: A new approach to industrial production of taxol. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2006; 22(1): 1-6.
- [2] Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili MH, Cusidó RM, et al. Biotechnological Production of Taxol and Related Taxoids: Current State and Prospects. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9(1): 109-21.
- [3] Zhao J, Shan T, Mou Y, Zhou L. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini Rev Med Chem* 2011; 11(2): 159-68.
- [4] Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979; 277(5698): 665-7.
- [5] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(4): 253-65.
- [6] Boulikas T, Tsogas I. Microtubule-targeted antitumor drugs: chemistry, mechanisms and nanoparticle formulations. *Gene Ther Mol Biol* 2008; 12: 343-87.
- [7] Heinig U, Jennewein S. Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionary obscure origin. *Afr J Biotechnol* 2009; 8(8): 1370-85.
- [8] Walker K, Croteau R. Taxol biosynthetic genes. *Phytochemistry* 2001; 58(1): 1-7.
- [9] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971; 93(9): 2325-7.
- [10] Zhou X, Zhu H, Liu L, Lin J, Tang K. A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86(6): 1707-17.
- [11] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol MolBiol R* 2003; 67(4): 491-502.
- [12] Miao Z, Wang Y, Yu X, Guo B, Tang K. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. *Appl Biochem Microbiol* 2009; 45(1): 81-6.
- [13] Murray M, Thompson W. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 1980; 8(19): 4321-5.
- [14] Zhang P, Zhou PP, Yu LJ. An Endophytic Taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Curr Microbiol* 2009; 59(3): 227-32.
- [15] Liu K, Ding X, Deng B, Chen W. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2009; 36(9): 1171-7.
- [16] Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. *Microbiology* 1996; 142(Pt 2): 435-40.
- [17] Chakravarthi B, Das P, Surendranath K, Karande AA, Jayabaskaran C. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *J Biosci* 2008; 33(2): 259-67.
- [18] Bustamante ZR, Orduna FN, Cardenas AM, Flores-Cotera LB. Microbial paclitaxel: advances and perspectives. *J Antibiot (Tokyo)* 2010; 63(8): 460-7.
- [19] Caruso M, Colombo AL, Fedeli L, Pavesi A, Quaroni S, Saracchi M, et al. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Ann Microbiol* 2000; 50: 3-13.
- [20] Nasiri-Madiseh Z, Mofid MR, Ebrahimi M, Khayyam-Nekoei SM, Khosro-Shahli M. Isolation of Taxol-producing endophytes fungi from Iranian yew (*Taxus baccata* L.). *J Shahrekord Univ Med Sci* 2010; 11(4): 101-7. [in Persian]
- [21] Kavanagh K. Fungi biology and applications. Department of biology national university of Ireland Maynooth: Wiley-Blackwell; 2005. p. 376.
- [22] Zhang P, Zhou PP, Jiang C, Yu H, Yu LJ. Screening of taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*. *Biotechnol Lett* 2008; 30(12): 2119-23.
- [23] Malik S, Cusido RM, Mirjalili MH, Moyano E, Palazon J, Bonfill M. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review. *Proc Biochem* 2011; 46: 23-34.
- [24] Zhou X, Wang Z, Jiang K, Wei Y, Lin J, Sun X, et al. Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. mairei. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 2007; 43(4): 490-4.