Archive of SID

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

مقصود سیفی [۱]، سنبل ناظری [۲*]، جلال سلطانی [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: تاکسول یک داروی ضدسرطان با منشاء گیاهی است که به‌طور گسترده 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 به‌نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق قارچ‌های اندوفیت از پوست سرخدار بومی ایران (*Taxus baccata*) جداسازی شدند. ایزوله‌ها در محیط PDB (Potato Dextrose Broth) کشت داده شده و به‌مدت ۲۱ روز انکوبه شدند. DNA ژنومی نمونه‌ها استخراج گردید و حضور ژن *DBAT* (۱۰-داستیل باکاتین استیل ترانسفراز)، یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی 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 به‌وسیله 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 جداشده از سرخدار ایرانی حضور ژن مسیر بیوسنتزی 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 درحال 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

مقدمه

تاکسول یکی از مهمترین داروهای ضدسرطان است که در حوزه کلینیکی به‌طور گسترده بر علیه سرطان‌هایی 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 آرتریت روماتوئید، مالاریا، آلزایمر و بیماری پلی‌کیستیک اتوزومی غالب کلیه گزارش شده‌است [۳]. پس از بررسی‌های کلینیکی برروی 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 میتوز شده و موجب مرگ سلول‌های درحال تکثیر می‌گردد [٤].

در نهایت با انجام آزمایشات تکمیلی، تاکسول در سال ۱۹۹۲ جهت درمان سرطان تخمدان و در سال ۱۹۹٤ برای درمان سرطان سینه از سوی FDA مورد تائید قرار گرفت [۱]. تاکسول در گروه ترکیبات پایدار کننده ساختار میکروتوبول‌ها طبقه‌بندی می‌شود که پویایی میکروتوبول‌ها را که در تقسیم سلولی کاملا ضروری است هدف قرار می‌دهد [۵]. میکروتوبول‌ها از هترودیمرهای α و β توبولین به شکل رشته‌های استوانه‌ای طویل در داخل سلول تشکیل شده‌اند که به شکل پویایی در داخل سلول سرهم‌بندی و از هم پاشیده می‌شوند. این پویایی در انجام وظایف سلولی از جمله در تقسیم میتوز نقش حیاتی دارد. تاکسول با اتصال به β توبولین در ساختار میکروتوبول، مانع ازهم پاشیدن آن شده و پویایی میکروتوبول‌ها را در داخل سلول از بین می‌برد [٦]. با از بین رفتن پویایی میکروتوبول‌ها تقسیم سلولی مختل شده و این اختلال سب القاء فرایند آپوپتوزیس و از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌گردد [٦،٥]. درحال حاضر منبع اصلی تولید تاکسول روش نیمه سنتز آن از پیش ماده‌های اصلی‌اش ازجمله باکاتین-III است [۷]. باکاتین-III در مراحل انتهایی بیوسنتز تاکسول با اضافه شدن یک گروه استیل به کربن شماره ۱۰ هسته تاکسان بوجود می‌آید (شکل شماره ۱). آنزیم ۱۰-داستیل باکاتین استیل ترانسفراز (*DBAT*) که

[۱] 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

* **نشانی نویسنده مسئول:**

همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی

تلفن: ۳۱۹۱۵۶۵ ۰۹۱۸ **دورنویس:** ۴۴۲۴۰۱۲ ۰۸۱۱

پست الکترونیک: snblnazeri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۷ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۲/۳/۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

این واکنش را کاتالیز می‌کند، یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است [۸]. به‌دنبال یک طرح گسترده 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 خالص سازی تاکسول و پیش ماده‌های آن به دلیل مقدار بسیار کم، حدود ۰/۰۰۸ - ۰/۰۰۰۱ وزن خشک درخت، و حلالیت کم آن بسیار سخت و هزینه‌بر است [۱]؛ به‌طوری‌که برای به‌دست آوردن یک کیلوگرم تاکسول ۱۰ هزار کیلوگرم پوست برابر با ۲۰۰۰-۲۵۰۰ درخت سرخدار نیاز است [۱۰]. میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاهان، به‌عنوان یک منبع ارزان، ساده و پذیرفته شده از لحاظ زیست محیطی برای تولید تاکسول به‌شمار می‌آیند [۱۰،۳]. از مزایای میکروارگانیسم‌ها می‌توان به رشد سریع در محیط‌های کشت ساده، امکان کشت در محیط‌های تخمیری در مقیاس وسیع، مقاومت بیشتر در برابر استرس‌ها، دست‌کاری 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 به‌دنبال میکروارگانیسم‌های 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 به‌دلیل میزان تولید کم به‌وسیله اغلب آنها [۱۰]، جستجو به‌دنبال گونه‌های با میزان تولید بالا ادامه دارد. تا به امروز مطالعات بسیار اندکی برروی 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 هرباریومی: ۳۳۰۴۹، هرباریوم دانشگاه بوعلی سینا) جنگل‌های استان مازندران، در حدود ۱۵۰-۲۰۰ ساله، نمونه برداری شد. نمونه‌ها از نواحی سالم و فاقد نشانه‌های بیماری از پوست تنه اصلی و شاخه‌های جانبی درختان انتخاب شده و در پاکت‌های کاغذی سربسته 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 هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (به‌مدت ۱۰ دقیقه)، جهت از بین بردن قارچ‌های اپی‌فیت و ساپروفیت، استریل گردید. نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو داده شده و به قطعات کوچکتر تقسیم شدند. قطعات فوق بر روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar)، (Merck)، قرار داده شدند تا امکان رشد برای قارچ‌های اندوفیت فراهم گردد. محیط‌های کشت به‌مدت سه هفته در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه نگهداری گردیدند. پس از این مدت، نوک هیف قارچ‌های رشد یافته از قطعات پوست جداشده و به محیط کشت PDA جدید منتقل شد. برای اطمینان از خلوص قارچ‌های به‌دست آمده این عمل دو بار دیگر انجام گرفت [۱۲].

استخراج DNA ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: جهت استخراج DNA ژنومی ابتدا دو قطعه ۱×۱ سانتی‌متری از کشت ۳۰ ایزوله قارچی جدا گردیده و در ارلن‌های ۱۰۰ میلی-لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط PDB (Potato Dextrose Broth)، (Scharlau)،کشت شدند. ارلن‌ها به‌مدت یک هفته برروی شیکر انکوباتور با دمای۲۸ درجه سانتی‌گرادو دور rpm 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. ۰/۵-۱ گرم از میسیلیوم‌ها با استفاده از نیتروژن مایع کاملا پودر گردید و استخراج DNA ژنومی به روش CTAB انجام گرفت [۱۳]. از DNA ژنومی سرخدار به‌عنوان شاهد مثبت در واکنش PCR استفاده شد. برای این منظور ۰/۵-۱ گرم از برگ های سرخدار با استفاده از نیتروژن مایع پودرگردید 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 [۱٤]. PCR در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf) در حجم نهایی ۲۵µl با ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن) انجام گرفت. مخلوط PCR به‌مدت ٦ دقیقه در دمای ۹٤ درجه و سپس ۳۵ سیکل در ۹٤ درجه به‌مدت ٦۰ ثانیه، ۵۰ درجه به‌مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه به‌مدت ۸۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه به‌مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. آنالیز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد و دستگاه الکتروفورز (Bio Rad) صورت گرفت.

تخمیر قارچی و استخراج تاکسول: دو قطعه، در حدود ۱×۱ سانتی متر مربع، از کشت جامد ایزوله‌ها جدا گردیده و در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB به‌علاوه ۰/۰۱گرم بر لیتر فنیل آلانین جهت تهیه کشت سوسپا-نسیون قرارداده شد [۱۵]. کشت‌ها به‌مدت سه هفته برروی شیکر با

www.SID.ir

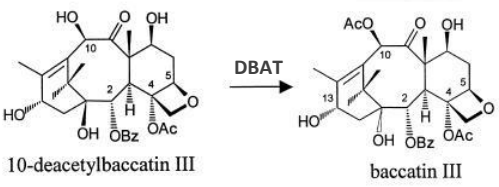
Archive of SID

دور rpm ۱۵۰ 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 دی‌کلرومتان (هم‌حجم) اضافه گردید و به‌خوبی تکان داده شد. با استفاده از یک قیف دکانتور فاز آلی حاصل جداسازی شده و در دمای اتاق تبخیر گردید. ماده خشک باقیمانده در ۱ میلی لیتر متانول حل گردید و در فریزر ۲۰- درجه نگهداری شد.

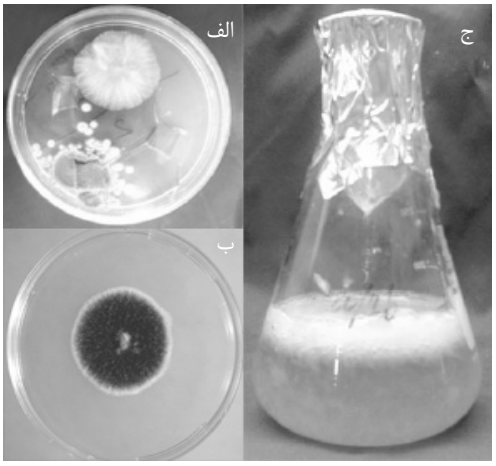
کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): حضور تاکسول در کشت قارچ‌های اندوفیت با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک بررسی شد. برای این منظور از صفحات سیلیکاژل ۲۰×۲۰ سانتی-مترمربع و حلال‌های: A: کلروفورم: متانول (۱:۷)، B: کلروفورم: استونیتریل (۳:۷)، C: اتیل استات: ایزوپروپانول (۵:۹۵)، D: کلروفورم: استونیتریل (۱:٤) وE: کلروفورم: متانول (۰/۸:۹/۲) استفاده گردید. صفحات سیلیکاژل پس از قرارگرفتن 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

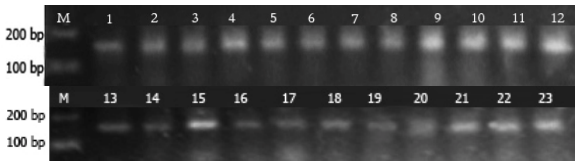
پس از خالص سازی قارچ‌ها، ٦۰ ایزوله که هرکدام از لحاظ شکل کلونی، رنگ و سرعت رشد باهم تفاوت داشتند از سرخدار جداسازی شد. اکثر ایزوله‌های جداسازی شده، با سرعت متفاوت، در محیط کشت جامد PDA به‌خوبی رشد کردند. بیشتر این ایزوله‌ها در محیط کشت مایع PDB به‌سرعت رشد کرده و پس از ۷ روز کل حجم محیط را پرکردند (شکل شماره ۲). DNA استخراج شده از کمیت و کیفیت بالایی جهت انجام 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 ۱۵۰bp 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 ٤ ایزوله مشخص شد. پس از رنگ آمیزی، لکه مربوط به تاکسول در نمونه‌های قارچی دارای خصوصیات کروماتوگرافیکی مشابه با تاکسول استاندارد بود (شکل شماره ٤). اندازه متفاوت هاله‌ها نشان دهنده مقدار متفاوت تاکسول در عصاره‌های مورد بررسی بود.



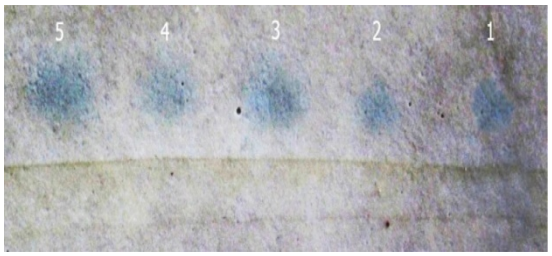
شکل شماره ۱- تشکیل باکاتین-III از 10-DAB در مسیر بیوسنتزی تاکسول



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 وایزوله‌های 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 ٤- کروماتوگرافی لایه نازک نمونه‌های قارچی تولید کننده تاکسول. شماره ۱، تاکسول استاندارد؛ شماره ۲ تا ۵، عصاره‌های به‌دست آمده از کشت قارچ‌های اندوفیت.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

قارچ‌های اندوفیت تولیدکننده تاکسول به‌عنوان یک منبع تجدید شونده برای تولید این ترکیب باارزش به‌شمار 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 متفاوت قادر به تولید تاکسول بودند. Strobel و همکاران مشخص کردند که از بین ۳۳ ایزوله قارچ اندوفیت جداسازی شده از *Taxus wallachiana* یک ایزوله به‌نام *Pestalotiopsis microspora* قادر به سنتز تاکسول است [۱۶]. Caruso و همکارن ۱۵۰ ایزوله قارچ اندوفیت از *Taxus baccata* رویش 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 نشان‌دهنده مناسب بودن این محیط برای کشت قارچ-های اندوفیت بود. قارچ‌ها در محیط کشت مایع سریع‌تر از محیط کشت جامد رشد کردند که این امر می‌تواند به‌علت دسترسی راحت‌تر قارچ‌ها به مواد غذایی، عدم تجمع مواد زائد در اطراف توده میسیلیومی قارچ‌ها، اکسیژن‌دهی بهتر و حضور اسیدآمینه فنیل آلانین درمحیط مایع باشد [۲۱]. Liu و همکاران اضافه کردن مقادیر کمی فنیل آلانین به کشت مایع قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول را مفید دانستند، آنها این امر را به‌وجود 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 بیوسنتزی تاکسول با استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR (به-عنوان مارکر مولکولی) اخیرا به‌عنوان یک ابزار کارآمد جهت غربال اولیه قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول معرفی شده است [۲۲]. ژن *DBAT* یکی از ژن‌های درگیر در مراحل انتهایی مسیر بیوسنتزی تاکسول است، به همین علت در این تحقیق حضور ژن *DBAT*، به‌عنوان مارکر مولکولی اولیه برای غربال سریع و آسان قارچ‌های اندوفیت تولید کننده تاکسول مورد استفاده قرار گرفت [۱٤]. در بررسی حاضر از بین ۳۰ قارچ مورد آزمایش در ۲۲ نمونه حضور ژن *DBAT* به اثبات رسید. Zhang و همکاران از بین ۹۰ ایزوله قارچ جداسازی شده از *T. media* و *T. yunnannesis* 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 بیوسنتزی 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 هم‌اکنون به‌عنوان مهمترین پیش ماده تولید تاکسول از طریق روش نیمه‌سنتزی 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 [۲٤]، با این حال این روش تنها اشاره به حضور برخی ژن‌های مورد نیاز جهت بیوسنتز تاکسول داشته و نمی‌تواند صد در صد تولید تاکسول را تضمین کند [۲۲]. در این تحقیق روش کروماتوگرافی لایه نازک به‌عنوان یک غربال‌گر بیوشیمیایی مناسب، امکان تشخیص قارچ‌های مولد تاکسول در شرائط آزمایشگاهی را فراهم کرد. از ابتدای کشف تاکسول از محیط کشت قارچ‌های اندوفیت تاکنون، کروماتوگرافی لایه نازک به‌عنوان یکی از روش‌های متداول در تشخیص تاکسول در محیط کشت، مورد استفاده قرار گرفته است [۱۷،۱٦]. 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 می-گردد، زیرا استخراج و خالص‌سازی تاکسول از محیط کشت میکروبی در مقیاس صنعتی آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر است [۱۸،۱]. با آنکه نتایج برخی از تحقیقات نشان داده که میزان تولید تاکسول توسط قارچ‌های اندوفیت در مقایسه باسرخدار نسبتا کم است [۱٦]، اما میکروارگانیسم‌ها با داشتن قابلیت رشد در محیط‌های کشت ساده، دوره تولیدی کوتاه و امکان دست‌کاری ژنتیکی آسان، منبع بالقوه‌ی مهمی برای تولید تاکسول به‌حساب می‌آیند [۱۸،۱۱]. به‌علاوه، با شناسایی ژن‌های درگیر در مسیر بیوسنتزی تاکسول در قارچ‌های اندوفیت و با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک، می‌توان میزان تولید تاکسول در قارچ‌های اندوفیت را بهبود بخشید.

www.SID.ir

Archive of SID

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 ٤ ایزوله مشخص گردید. مطالعات تکمیلی در این زمینه ادامه دارند.

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 بوعلی سینا تامین 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] KavanaghK. 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.

www.SID.ir