

شناسایی قارچ‌های همزیست درخت سرخدار منطقه ارسباران با استفاده از مارکرهای مولکولی *bapt* و *dbat*، *ts*

یوسف محمدی^۱، محمدرضا مشایخی^۲، معصومه آقایان خانه برق^۳

^۱ هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی

^۲ هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی

^۳ کارشناسی ارشد زیست سلولی و مولکولی گرایش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

چکیده

تاکسول یک ترکیب دی تریپنی با ساختاری پیچیده می باشد که غالباً از گیاه سرخدار استخراج می گردد. این ماده در حال حاضر به عنوان مهم ترین ترکیب طبیعی ضدسرطان با مکانیسمی متفاوت از سایر داروهای مشابه در این زمینه، مورد استفاده قرار می گیرد. در حال حاضر تلاش های فراوانی برای سنتز کامل و نیمه سنتز تاکسول و همچنین استخراج آن در کشت های سلولی صورت می گیرد که هر کدام از این روش ها مشکلات خاصی را به دنبال دارد. ژن *DBAT* یکی از ژن های کلیدی مسیر بیوسنتزی تاکسول است که با تشکیل باکاتین *III* یکی از پیش سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول را کاتالیز می کند. با توجه به اهمیت داروی تاکسول در درمان انواع سرطان ها و تولید کم این دارو در بافت های گیاهی، شناسایی قارچ های همزیست تولید کننده تاکسول هدف گذاری شده است. نمونه های گیاهی سرخدار از ۱۰ منطقه ارسباران جمع آوری شدند و پس از جمع آوری، با استفاده از هیپوکلیت سدیم، ضد عفونی سطحی انجام و برای کشت بر روی محیط کشت *PDA* کشت شدند. پس از یک ماه و ظاهر شدن کلنی های قارچ، خالص سازی قارچ های مورد نظر در محیط کشت *PDA* انجام و سپس در محیط کشت *PDB* کشت شده و استخراج *DNA* قارچی انجام شد. پس از استخراج *DNA*، واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *ITS1*، *ITS4* جهت شناسایی گونه و جنس قارچ و آغازگرهای اختصاصی ژن های *ts*، *bapt* و *dbat* جهت شناسایی قارچ های اندوفیت تولید کننده تاکسول، انجام گردید. توالی یابی قطعات تکثیری انجام و خوانش توالی ها با استفاده از نرم افزار *chromas* صورت گرفت. نتایج نشان داد که از هشت ایزوله قارچی جدا شده، در پنج ایزوله تکثیر قطعه *its* صورت پذیرفت و توالی یابی قطعات نشان داد که ایزوله F1 جداسازی شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Guignardia philoprina* با میزان مشابهت ۹۹/۱۸ درصد می باشد، همچنین قارچ نمونه F2 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Platychocha ulmi* با میزان مشابهت ۹۸/۸۳ درصد می باشد، مطالعات نشان داده شده در نمونه F3 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Ochrocladosporium elatum* با میزان مشابهت ۹۷/۰۴ درصد می باشد، همچنین قارچ نمونه F5 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Aureobasidium pullulans* با میزان مشابهت ۹۴/۸۸ درصد می باشد، نهایتاً نتایج نشان داد که نمونه F7 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Alternaria tenuissima* بوده ولی به دلیل این که میزان مشابهت این توالی با گونه های شناخته شده جنس های دیگر در حدود ۹۹/۸۱ درصد می باشد،

احتمالا گونه جدیدی می باشد که نیاز به مطالعه تکمیلی می باشد. مطالعات تکمیلی با استفاده از ژن های *ts*، *dbat* و *bapt* نشان داد که هیچ کدام از ایزوله ها تولید کننده تاکسول نبودند. نتایج نشان داد که از پنج گونه درخت سرخدار، نوع متفاوت قارچ های اندوفیت که از نظر شکل و کلونی متفاوت بودند، رشد کردند و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *ts*، *bapt*، *dabt*، مشخص گردید که این قارچ ها تولید کننده تاکسول نیستند.

کلمات کلیدی: تاکسوس، درخت سرخدار، نشانگرهای مولکولی، قارچ های اندوفیت، *ts*، *bapt*، *dabt*

مقدمه

گیاهان دارویی منبع تأمین بیش از ۲۵ درصد کل داروهای مصرفی دنیا را تشکیل می‌دهند که در این میان نقش ویژه‌ای در تأمین داروهای ضدسرطانی ایفا می‌کنند. ترکیبات طبیعی به خصوص ترکیبات گیاهی، صدها سال است که برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند [1]. نامشخص بودن بسیاری از عوامل ایجادکننده سرطان، پیچیدگی مکانیسم بقا و تکثیر سلول‌های سرطانی و در نهایت کارکرد غیرانتخابی داروهای شناخته شده، سرطان را به یک بیماری ویژه با هزینه‌های سرسام‌آور تبدیل کرده است. بنابراین به پژوهش‌های بیشتری برای یافتن راه‌های جایگزین و تولید داروهای نوین با اختصاصیت بالا برای درمان و کنترل سرطان و کاهش مرگ و میرهای آن، نیاز می‌باشد [۲-۳]. تاکسول به عنوان مهم‌ترین داروی ضد سرطان، یک ترکیب طبیعی مشتق شده از گیاه سرخدار می‌باشد. این دارو در سلول‌های جانوری به زیرواحد بتاتوبولین رشته میکروتوبول، متصل می‌شود و تعادل بین اشکال پلیمری میکروتوبول را برهم می‌زند. این مسئله منجر به توقف چرخه سلولی در فازهای G2/M و القای مرگ سلولی در سلول در حال تقسیم می‌شود [۴-۵].

از این روی دسترسی بیماران به تاکسول با دشواری همراه است. با این وجود ویژگی منحصر به فرد تاکسول به عنوان داروی ضد سرطان، انگیزه کافی را برای گسترش درمان‌های بالینی این دارو فراهم می‌کند [۶-۷]. قارچ‌های اندوفیت به دلیل اینکه به عنوان منبعی از متابولیت‌های ثانویه، ترکیبات دارویی و عوامل کنترل بیولوژیکی شناخته شده‌اند از دید زیست فناوری بسیار قابل توجه هستند. از همین روی کشت و جداسازی این ارگانیسم‌ها برای تولید ترکیبات دارویی ضروری می‌باشد. یکی از روش‌های جایگزین تولید تاکسول، کشت تخمیری قارچ‌های اندوفیت هم زیست با گیاه سرخدار و سایر گونه‌های گیاهی می‌باشد. پس از کشف تاکسول در قارچ‌های اندوفیت و یکسان بودن این ترکیب در قارچ و میزبان گیاهی آن، پژوهش‌های گسترده‌ای برای یافتن قارچ‌های اندوفیت سازنده تاکسول آغاز شد که تا به امروز نیز ادامه داشته است [۸-۹].

پیشینه تحقیق

تاکنون تحقیقات وسیعی به منظور افزایش متابولیت‌های مفید این گیاه انجام شده است که در زیر به برخی از آن‌ها اشاره می‌شود.

Zhang و همکاران از بین ۹۰ ایزوله قارچ جداسازی شده از *Taxus. yunnanensis* و *Taxus. media* حضور ژن *dbat* را در ۱۵ ایزوله نشان داده و تولید تاکسول را در سه ایزوله گزارش کردند. از آن جا که بررسی ژن در مسیر بیوسنتزی می‌تواند با دقت بیشتر قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول را شناسایی کند، تحقیقات تکمیلی بر روی ژن‌های 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 هم اکنون به عنوان مهم‌ترین پیش ماده تولید تاکسول از طریق روش نیمه سنتزی به شمار می‌رود [۵۷].

Strobel و همکاران مشخص کردند که از بین ۳۳ ایزوله قارچ اندوفیت جداسازی شده از *wallachiana Taxus* یک ایزوله به نام *Pestalotiopsis microspora* قادر به سنتز تاکسول است [۵۸].

Caruso و همکاران ۱۵۰ ایزوله قارچ اندوفیت از *Taxus baccata* رویش یافته در ایتالیا را جداسازی نموده و تولید تاکسول را در ۱۵ ایزوله گزارش نمودند [۵۹]. نصیری و همکاران در سال ۲۰۱۰ نیز ۸۰ ایزوله قارچ اندوفیت از درخت سرخدار جنگل‌های گلستان جداسازی کرده، که ۵ ایزوله توانایی تولید تاکسول در محیط کشت را داشتند [۶۰]. Liu و همکاران در سال ۲۰۰۸، 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 داده‌اند [۶۱].

اهمیت و اهداف تحقیق

باتوجه به اهمیت داروی تاکسول در درمان انواع سرطان‌ها و تولید کم این دارو در بافت‌های گیاهی، شناسایی قارچ‌های همزیست تولیدکننده تاکسول هدف گذاری شده است.

فرضیات

- ۱- قارچ های همزیست تولیدکننده تاکسول در منطقه ارسباران وجود دارد
- ۲- مارکرهای مولکولی DABT، BAPT، TS توانایی شناسایی قارچ های همزیست تولید کننده تاکسول را دارند.

متغیرها

متغیرهای این تحقیق عبارتند از

متغیر مستقل: ریز نمونه های برگ و ساقه گونه درخت سرخدار ۱۰ منطقه ارسباران و ژن های *ts*، *dbat* و *bapt*

متغیر وابسته: قارچ های اندوفیت و توالی ژن های *ts*، *dbat* و *bapt* و همچنین طول قطعه تکثیری *its*

مواد و روش ها

تهیه گیاهان

گیاهان مورد استفاده در این تحقیق با نام فارسی سرخدار (*Taxus baccata*) شامل ۱۰ منطقه می باشند. کشت گیاهان جمع آوری شده در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز صورت گرفت.

تهیه محیط کشت

محیط کشت *PDA*^۱ برای کشت قارچ های اندوفیت، طبق پروتکل شرکت سازنده انجام شد. به اینصورت که داخل ارلن استریل، ۳۹ گرم از پودر محیط کشت *PDA* را در یک لیتر آب مقطر روی هیتر حل کرده تا کاملاً محلول شفاف شود. برای استریل کردن محیط کشت، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید. نهایتاً محیط کشت در پتری دیش های ۸ سانتی متری پخش شد. تمامی وسایل لازم برای کشت اعم از قیچی، پنس، فویل آلومینیومی، اسکالپل، تیغ اسکالپل، ارلن و بشر نیز در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند.

ضد عفونی نمونه های گیاهی

برای ضد عفونی سطحی نمونه های گیاهی از روش زیر استفاده شد.
- ابتدا ریزنمونه های برگ و ساقه به اندازه نیم سانتی متر توسط اسکالپل بریده شد.
- ریزنمونه های برگ و ساقه به صورت جداگانه ابتدا داخل الکل ۹۶٪ به مدت ۱-۱/۵ دقیقه و سپس به داخل هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه منتقل و ضد عفونی شدند.
- در نهایت قطعات گیاهی در آب استریل، ۲-۳ بار شستشو شدند.
- ریزنمونه های گیاهی روی کاغذ صافی گذاشته تا خشک شوند.

کشت ریزنمونه های گیاهی

محیط کشت PDA

به منظور جلوگیری از هرگونه آلودگی، کشت گیاهان باید در محیط استریل انجام گیرد. بنابراین تمام مراحل کشت در زیر هود انجام گرفت. قطعات توسط پنس در چهار سوی محیط کشت به داخل محیط کشت فرو برده شدند. سپس درب ظرف با پارافیلیم بسته شد و نام گذاری شدند و به داخل انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد انتقال داده شدند.

۲-۲-۲- خالص سازی

بعد از یک ماه هیف های قارچی مشاهده گردیدند. بر اساس خصوصیات فنوتیپی، هشت ایزوله قارچی تشخیص داده شد. قارچ ها از نظر خصوصیات مورفولوژیکی از جمله شکل کلنی، رنگ، حاشیه کلنی و سرعت رشد باهم متفاوت بودند. برای خالص سازی از هر کلنی قارچی مورد نظر در زیر هود استریل به وسیله پنس استریل، یک هیف منفرد جدا و در محیط کشت جدید *PDA* قرار داده شدند و به داخل انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد منتقل شدند.

^۱. potato dextrose agar

۳-۲-۲- محیط کشت PDB

بعد از یک ماه که قارچ ها رشد کردند، کشت مایع قارچ ها در محیط کشت PDB^۲ صورت پذیرفت. بر اساس پروتکل، مقدار ۲۴ گرم از پودر PDB را در یک لیتر آب مقطر روی هیتر حل کرده تا کاملاً شفاف شود. سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد و بعد زیر هود به داخل لوله های آزمایش استریل ریخته و پس از سرد شدن محیط کشت مایع، با استفاده از یک آنس از قارچ های خالص سازی شده برداشته و داخل لوله آزمایش حاوی محیط کشت PDB منتقل شد. محیط کشت های مایع در داخل انکوباتور شیکر در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۲۰ RPM به مدت سه هفته نگهداری شدند.

استخراج DNA**تهیه بافرها****بافر TE**

برای تهیه ۱۰۰ میلی لیتر بافر TE، یک میلی لیتر تریس یک مولار را با ۰/۲ میلی لیتر EDTA نیم مولار مخلوط کرده و نهایتاً با آب استریل به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و pH محلول به ۸ تنظیم شد.

استات سدیم ۳ مولار

۱/۲۳ گرم استات سدیم را در ۵ سی سی آب مقطر حل کرده و pH محلول به ۵/۲ رسانده شد.

بافراستخراج

۲/۴۲ گرم Tris Hcl را در ۲۰ سی سی آب مقطر حل کرده و پس از تنظیم pH بر روی ۵/۸، ۱/۴۲ گرم NaCl، ۷۳۰ میلی گرم EDTA و ۵۰۰ میلی گرم SDS را به محلول اضافه کرده و نهایتاً حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد.

دستورالعمل استخراج DNA

پس از رشد قارچ ها در محیط کشت مایع، لوله های آزمایش به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس از درو ریختن محیط کشت مایع (PDB) عمل شست و شوی رسوب قارچی با بافر TE انجام و سپس از دور ریختن بافر TE، رسوب قارچی به درون هاون منتقل شد. سپس با ازت مایع خرد کردن هیف ها انجام و سپس از پودر شدن قارچ ها، ۵۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج به هاون ریخته و با دسته هاون پودر شدند. سپس ۱۵۰ میکرو لیتر استات سدیم ۳ مولار با pH=5.2 به روی هاون ریخته و به درون تیوب 2 ml منتقل شد. تیوب ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه باقی مانده و سپس با دور ۵۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به تیوب جدید منتقل و هم حجم آن ایزو پروپانول اضافه شد و پس از ۵ دقیقه، سانتریفیوژ به مدت ۳ دقیقه با دور ۵۰۰۰ صورت گرفت. نهایتاً مایع رویی دور ریخته و پلیت DNA (به رنگ شفاف) با الکل اتانول ۷۰ در صد به آرامی شست و شو داده شد. پس از آن که الکل دور ریخته شده کمی صبر کرده تا رسوب خشک شود. بایستی مواظب بود تا رسوب از تیوب جدا نشود و در نهایت ۵۰ میکرو لیتر بافر TE یا آب استریل داروخانه اضافه و به آرامی حل کرده و پس از یک ساعت به فریزر ۲۰- درجه انتقال داده شد.

کنترل کیفیت و کمیت DNA

برای انجام مراحل بعدی و PCR باید کیفیت و کمیت DNA استخراج شده بررسی شود تا مناسب کارهای بعدی باشد.

اسپکتروفتومتری

کمیت یا غلظت DNA استخراج شده با روش اسپکتروفتومتری و به وسیله دستگاه نانو دراپ و اندازه گیری جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر (260A) مشخص شد. علاوه بر غلظت DNA نسبت خوانش در ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر ارائه داد. که این نسبت تقریباً ۱/۶ است. معمولاً نسبت ۱/۸ تا ۲ مناسب می باشد

² Potato dextrose broth.

طراحی پرایمر

برای طراحی پرایمر برای ژن های *its1, its4* (جهت شناسایی نوع گونه و قارچ) و ژن های *ts, bapt, dabt* (جهت شناسایی قارچ های اندوفیت تولید کننده تاکسول) توالی ژن ها از سایت *NCBI* دانلود شدند (توالی ژن ها در بخش ضمیمه آورده شده است) و سپس طراحی پرایمر با استفاده از نرم افزار *oligo7* انجام گرفت. توالی این پرایمرها در جدول شماره ۱ آورده شده است. برای اطمینان از اختصاصیت پرایمرها، بلاست پرایمر ها توسط نرم افزار پرایمر بلاست *NCBI* صورت گرفت و در نهایت پرایمر های طراحی شده جهت سنتز به شرکت سینا کلون سفارش داده شد. پرایمرهای خریداری شده از شرکت سینا کلون بدون آب می باشد، لذا با افزودن آب استریل طبق مقادیر موجود در بروشور ارائه شده توسط شرکت، آماده شدند و در ۸۰- درجه سانتی گراد به عنوان استوک اصلی نگه داری شدند.

جدول ۱. توالی پرایمر های طراحی شده برای ژن های *its1, its4, ts, dabt, bapt*

شماره دسترسی	دمای ذوب	توالی	نام
AJ000068	60.98	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	<i>its1</i>
AB500692	55.25	TCCTCCGCTTATTGATATGC	<i>its4</i>
AJ320538	58.87	CAAACCCATGTCGAATTGAGAAG	<i>tsF</i>
AJ320538	59.70	CAAGTTTGCATACACTCTGGAATCT	<i>tsR</i>
AF193765	58.24	GGGAGGGTGCTCTGTTTG	<i>dbatF</i>
AF193765	59.35	GTTACCTGAACCACCAGAGG	<i>dbatR</i>
AY082804	59.35	CCTCTCTCCGCCATTGACAA	<i>baptF</i>
AY082804	57.30	TCGCCATCTCTGCCATACTT	<i>baptR</i>

PCR برای ژن های *its*

از نمونه ای استخراج شده زیر برای PCR استفاده گردید:

پرایمر های *its1* و *its4* جهت شناسایی گونه و جنس قارچ ها است. *PCR* به شرح زیر صورت گرفت. نمونه های DNA استخراج شده از قارچ های اندوفیت، مستر میکس قرمز *Ampliqon*، پرایمر های رقیق شده و آب استریل با مقادیر جدول ۲ و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر برای واکنش PCR مخلوط شدند. در نهایت تیوب های آماده شده داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند و طبق چرخه دمایی که در جدول ۳ آورده شده، واکنش زنجیره ای پلیمرز صورت گرفت.

جدول ۲. اجزای لازم برای واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر

اجزا	حجم (بر حسب میکرو لیتر)
آب استریل	۴
آغازگر <i>ITS1</i>	۱
آغازگر <i>ITS4</i>	۱
مستر میکس قرمز	۱۰
DNA استخراجی	۴

جدول ۳. چرخه گرمایی PCR

تعداد چرخه	زمان انکوبه	دمای درجه سانتی گراد	مرحله
۱	۵ دقیقه	۹۴	دنا توره شدن اولیه
	۱ دقیقه	۹۴	دنا توره شدن
۳۰	۴۵ ثانیه	۵۰	اتصال پرایمر
	۱ دقیقه	۷۲	طویل شدن
۱	۵ دقیقه	۷۲	طویل شدن نهایی

الکتروفورز قطعه تکثیری ژن *its*

برای انجام الکتروفورز ابتدا باید ژل آگارز تهیه شود. برای تهیه ژل از TBE 0.5x استفاده می شود. برای این منظور بهتر است ابتدا TBE 5x تهیه شود و از آن TBE 0.5x تهیه شود. اجزا لازم برای تهیه TBE 5x در جدول آورده شده است. بعد از تهیه استوک TBE 5x به مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از استوک غلیظ را با ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر رقیق کرده و مورد استفاده قرار می دهیم.

جدول ۴. بافر TBE 5x در حجم یک لیتر

Tris base	۵۴ گرم
Boric acid	۲۷/۵ گرم
EDTA	۰/۵ مولار در ۲۰ میلی لیتر

تهیه ژل آگارز ۱٪

ابتدا حجم tray اندازه گرفته شده (۴۰ میلی لیتر) و سپس به همان اندازه TBE 0.5x درون ارلن ریخته و به آن ۰/۴ گرم پودر آگارز اضافه شد. در مرحله بعد ارلن بر روی هیتر گذاشته تا آگارز داخل آن حل شود، به طوری که مایع کاملاً شفاف شود. سپس بعد از رسیدن دمای محلول به ۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد از روی هیتر برداشته، منتظر مانده تا کمی سرد شود. به مقدار دو میکرولیتر DNA safe stain به محلول اضافه شد. شانه را درون tray گذاشته و محلول به داخل tray ریخته شد. پس از گذشت چند دقیقه ژل بسته شده و بعد شانه را به آرامی از زل خارج می کنیم. به این ترتیب ژل آگارز ۱٪ تهیه شد. tray داخل تانک الکتروفورز گذاشته و سپس ۳ میکرو لیتر ladder به چاهک لود کرده و سپس به ترتیب نمونه ها (به تعداد ۸ نمونه) به مقدار ۱۰ میکرولیتر درون چاهک ها لود شدند و دستگاه را روشن کرده روی ولتاژ ۱۰۰ و ۴۵ دقیقه تنظیم شده و سپس Run می کنیم. بعد از اتمام زمان دستگاه ژل را برداشته و داخل دستگاه ژل داک، تصویربرداری از قطعات تکثیری صورت گرفت.

توالیابی

برای قطعات تکثیری ژن *its*، الکتروفورز ژل آگارز یک در صد انجام گرفت. از آن جایی که غلظت بعضی از نمونه ها خوب نبودند از ۸ نمونه لود شده ۵ نمونه به خوبی باند داده و این ۵ نمونه برای توالیابی به شرکت پایش ژن پروتئین فرستاده شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز برای ژن های *bapt*، *dbat*، *ts*

برای پی بردن به این موضوع که کدام یک از قارچ های اندوفیت تولید کننده تاکسول هستند، تکثیر قطعات سه ژن مهم دخیل در سنتز تاکسول به نام های *bapt* و *dbat*، *ts* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سه ژن مذکور صورت گرفت. حجم نهایی واکنش PCR در ۲۰ میکرولیتر انجام شد. سپس برای مشاهده قطعات تکثیری از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد.

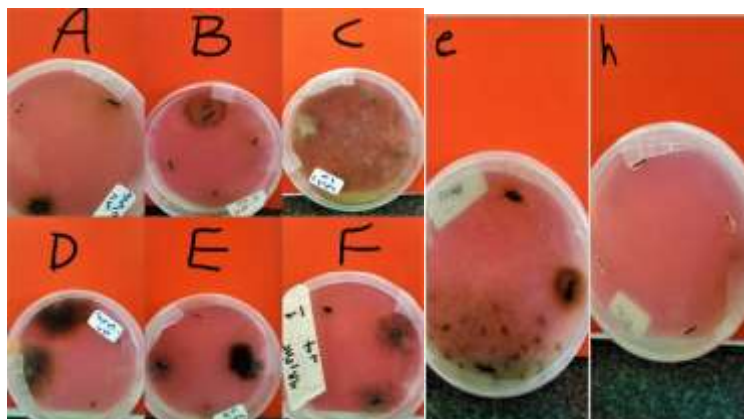
آنالیز فیلوژنتیک قارچ های شناسایی شده

با توجه به توالی ژن *its* شناسایی و آنالیز فیلوژنتیک قارچ های استخراجی با استفاده از بلاست توالیهای DNA و نرم افزار Mega5 صورت گرفت.

استخراج قارچ های اندوفیت

برای بررسی رشد قارچ های اندوفیت و تولید یا عدم تولید تاکسول با استفاده از ژن های *bapt* و *dbat*، *ts* در قارچ های اندوفیت، ابتدا کشت ریزنمونه های برگ و ساقه گیاهان سرخدار ۱۰ منطقه ارسباران در محیط کشت جامد PDA صورت گرفت. برای اطمینان از جداسازی قارچ های اندوفیت و حذف قارچ های اپیفیت و پاتوژن، نمونه ها از بافت کاملاً سالم و عاری از هر گونه نشانه بیماری انتخاب گردید. استریل کردن سطحی نمونه ها، منجر به حذف بیشتر قارچ های پاتوژن و غیر اندوفیت گردید. همچنین قرار دادن نمونه های پوست گیاه بر روی محیط کشت PDA نشان داد که قارچ های مورد مطالعه رشد خود را از روی نمونه گیاهی شروع کرده اند و در نتیجه کلنی های رشد یافته ناشی از آلودگی های محیطی نبوده اند.

قارچ های اندوفیت بر روی محیط PDA به سرعت رشد کردند بنابراین محیط غذایی برای رشد قارچ های اندوفیت مناسب ارزیابی شد. نمونه ای از کشت سالم و فاقد آلودگی گیاه سرخدار، رشد یافته در محیط PDA در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱. نمونه ای از رشد قارچ های اندوفیت در محیط

خالص سازی

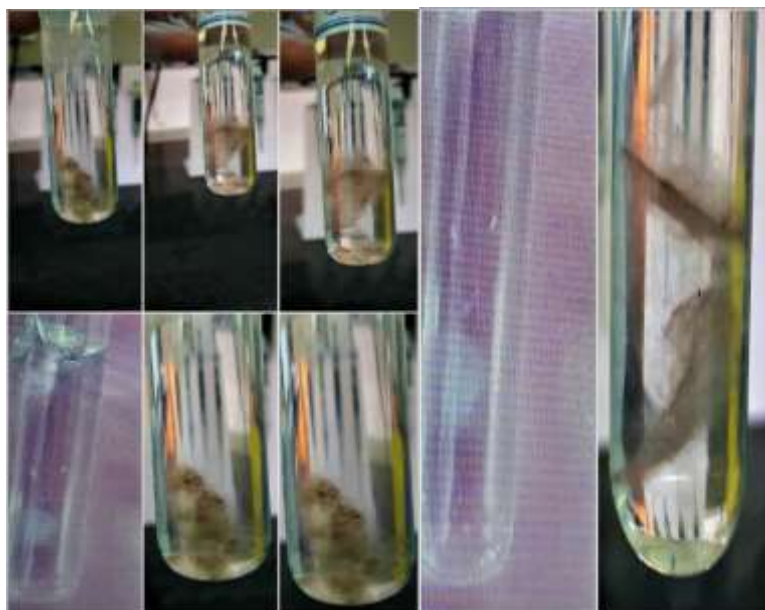
نتایج نشان داد که ۸ ایزوله قارچی از گیاهان مذکور جداسازی شد. همانطور که در شکل ۲ مشخص می باشد، قارچ هایی که رشد کرده اند از نظر خصوصیات مورفولوژیکی از جمله شکل، کلنی، رنگ، حاشیه کلنی و سرعت رشد با هم متفاوت بودند، که از هر کدام به صورت جداگانه در محیط کشت PDA جدید کشت و خالص سازی شدند. قارچ های مذکور (از قسمت برگ گیاه سرخداریک نوع قارچ، ساقه گیاه سرخدارهفت نوع قارچ) در محیط کشت جامد به خوبی خالص سازی شدند. اندوفیت ها به دلیل ماهیت ناشناخته ای که دارند، پتانسیل عظیمی در تولید ترکیبات بیواکتیو ایجاد می کنند. نتایج نشان داده که هر گیاه بصورت تکی، میزبان چند اندوفیت است [۶۲]. با این حال تنها تعداد بسیار معدودی از گیاهان در رابطه با جمعیت قارچ های اندوفیتی خود بررسی شده اند [۶۳].



شکل ۲. خالص سازی قارچ های اندوفیت در محیط کشت PDA، a قسمت ساقه درخت سرخدار، b ساقه درخت سرخدار، c ساقه درخت سرخدار، d ساقه درخت سرخدار، e ساقه سرخدار، f قسمت برگ درخت سرخدار، g قسمت ساقه درخت سرخدار، h ساقه درخت سرخدار

کشت قارچ‌های خالص سازی شده در محیط کشت مایع PDB

کشت قارچ‌های اندوفیت خالص در محیط کشت مایع صورت گرفت که در شکل ۳ آورده شده است.



شکل ۳. نمونه ای از رشد قارچ‌های اندوفیت در درون محیط کشت PDB

استخراج DNA ژنومی

نتایج تحقیقات متعدد نشان داده که استخراج DNA از قارچ‌ها به سختی صورت می‌گیرد. آلودگی DNA استخراج شده به فنول‌ها و پلی ساکاریدها موجب مهار عمل آنزیم پلیمرز و ایجاد اختلال در واکنش زنجیره ای پلیمرز می‌گردند [۶۴]. پلی ساکاریدها ۸۰ تا ۹۰ درصد محتویات دیواره سلولی قارچ‌ها را تشکیل می‌دهند [۶۵]. و برخی قارچ‌ها مقادیر زیادی از آن را در محیط کشت خود تولید و ترشح می‌کنند [۶۶]. از آنجائیکه روش CTAB به عنوان روشی موثر و کارآمد در حذف پلی ساکاریدها معرفی شده است [۶۷]، در پژوهش حاضر نیز جهت استخراج DNA از قارچ‌ها استفاده گردید.

واکنش زنجیره ای پلیمرز

بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده

در اسپکتروفتومتری DNA، میزان جذب در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نشان دهنده خلوص DNA از پروتئین و میزان جذب در طول موج ۲۶۰/۲۳۰ نشان دهنده میزان آلودگی DNA به پلی فنول‌ها و پلی ساکاریدها و EDTA است. میزان جذب اکثر نمونه‌ها در این طول موج‌ها در محدوده مناسب و نشان دهنده مقادیر ناچیز آلودگی می‌باشد. کمیت و خلوص DNAهای استخراج شده، توسط دستگاه نانو دراپ بررسی شد و میزان جذب نوری و همچنین نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر نیز بررسی گردید که جدول ۵ آورده شده است. نسبت جذب مناسب (۱/۸-۲) عدم وجود آلودگی‌های پروتئینی و خلوص بالای DNAهای استخراج شده را نشان می‌دهد.

جدول ۵. نتایج اسپکتروفتومتری DNA ژنومی استخراج شده از ایزوله‌های قارچی

غلظت DNA	نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر	نمونه
۹۱/۷	۱/۴۳	برگ سرخدار ۴b

ساقه سرخدار ۸S	۱/۷۹	۲۲/۹
ساقه سرخدار ۵S	-۱/۴۸	۲/۶
ساقه سرخدار ۱۵S	۱/۳۱	۱۷۲/۸
ساقه سرخدار ۱۳S	۱/۵۶	۳۲/۷
ساقه سرخدار ۱۳S	۱/۵۵	۶۸/۵
ساقه سرخدار ۹S	۱/۴۹	۶۴/۱
ساقه سرخدار ۱۰S	۱/۳۹	۵۹/۶

الکتروفورز قطعه تکثیری ژن *its*

پرایمر های ITS1، ITS4 جهت شناسایی گونه و جنس قارچ است. برای قطعات تکثیری ژن *its*، الکتروفورز ژل آگارز یک درصد انجام گرفت. از آن جاییکه غلظت بعضی از نمونه ها خوب نبود، از بین نمونه ها ۵ نمونه ای که غلظت مناسبی دارند انتخاب و PCR و الکتروفورز انجام شد. نمونه ی نتایج الکتروفورز ژن *its* در شکل ۴ آورده شده است.



شکل ۴. وجود باند برای ژن *its*، چاهک ۱: ladder، چاهک دوم: نمونه برگ سرخدار، چاهک سوم: ساقه سرخدار، چاهک چهارم: ساقه سرخدار، چاهک ششم: ساقه سرخدار، چاهک هشتم: ساقه سرخدار

شناسایی قارچ های اندوفیت جداسازی شده

پس از الکتروفورز، توالی یابی قطعات تکثیری انجام و خوانش توالیها با استفاده از نرم افزار chromas صورت گرفت. توالی ژن *its* قارچ های مورد نظر در شکل ۵ آورده شده است. برای شناسایی جنس و گونه قارچ های مورد نظر، بلاست توالیها در داده پایگاه <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> صورت گرفت. توالی یابی قطعات نشان داد که ایزوله F1 جداسازی شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Guignardia philoprina* با میزان مشابهت ۹۹/۱۸ درصد می باشد، همچنین قارچ نمونه F2 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Platychora ulmi* با میزان مشابهت ۹۸/۸۳ درصد می باشد، مطالعات نشان داده شده در نمونه F3 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Ochrocladosporium elatum* با میزان مشابهت ۹۷/۰۴

درصد می باشد، همچنین قارچ نمونه F5 جداشده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Aureobasidium pullulans* با میزان مشابهت ۹۴/۸۸ درصد می باشد، نهایتا نتایج نشان داد که نمونه F7 جداشده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Alternaria tenuissima*، می باشد ولی به دلیل این که میزان مشابهت این توالی با گونه های شناخته جنس های دیگر در حدود ۹۹/۸۱ درصد می باشد، احتمالاً گونه جدیدی می باشد که نیاز به مطالعه تکمیلی می باشد.

F1:

AGCGTTTGGGGGGGGTCTCTGTAAGGTCGTCGTAGGGGGCCCCCCTAA
ACAAGGGGGCCCCGAAGGTCCTCTAACACCCTTGTGTACCTTACCGCGTTGCTT
TGGCGGGCCGACCCGTTTCGACCCGGGCGGCCGCGCCCCAGCCCTCCA
GGGCCAGGACGTCAGGCCAAGCGCCCGCCAGTAAACAAAACCTCCAGCGATTAT
TTCATGCGGTCCTGATAAATTATTCAATTAATTAACAACTTTCAACAACGGATCTCT
GGTTCTGGCATCAATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA
GATTTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTATTCCGG
AGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGG
CGACGTCCGCTGCCGGACGCGCCTCGAAGACCTCGGCGACGGCGTCCCAGCC
TCGAGCGTAGTAGTAAATATCTCGCTCTGGAGTGCTGGGCGTTGGCCGCCGG
ACAACCGACCTTCGGTCACTATTTTCCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGA
TACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAA

F2:

AGCTATCTCTAGCATGTCTGTTCACTTACGTTTCCGGCGGTCCGCGCCGCGG
ATGGACAATTTAAACCATTGAGTTGGAAGCAGCGTCTGAAAAAACTTAATAGTTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT
GCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAC
ATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTT
CAAGCTCTGCTTGGTGTGGGTGTTTGTCTCGCCTCTGCGTGTAGACTCGCCTC
AAAACAATTGGCAGCCGGCGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTT
GCACTCATAACGACGACGTCCAAAAGTACATTTTACACTCTTGACCTCGGATCA
GGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGAAAAAG

F3:

AGGGCGTTGAATAAATACTAGGGAGGGGGGCTTCGGGTCCCTGTCTGACCCTT
GTCTTTTGCCTACTATTTGTTTGTAGGGGGGGTTCCTGCCAATAGGACACTAT
TAACTTTAAAGGAATTGCAATCAGCGTCAGAAAAACATAAATTACAACCTTTCAA
CAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAAAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC
CTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTG
CTTGGTGTGGGTGTTTGTCCCGCTTTTTCGTGGACTCGCCTCAAAGCAATTG
GCAGCCGGCGTACTAGCCTGGGAGCGCAGCACATTTTGCATCTCGACTGGA
ACGCTTGCCTCCATTAAGCCTACACTTTTGTCTTGGACCTCGGATCAGGTAGGG
ATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAGATCATTACCAATTTTAT
CGGGGGGACTTCGGTCCCTGTCTGAACCCTTGTCTTTTGCCTACTATTTGTTTC
CTTGGTAGGCTTTGCCTGCCAATAGGACACTATTAACCTTTTGTAAATTGCAATCA
GCGTCAGAAAAACATAAATAATTACCAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGGTTCT
GGCATCCATGAAGAAAGCAACGAAATGCGAAAAGTAGTGTGAATTGCGAAATTA
GTGGAATCATCAATCTTTGAACGCCATTTGCGCCCTTGGTATTTCTGTGGGGG
GGCATGCTCTGCTTCCAGGCGTACTATTTGTAACCTCTCTGCTCTGTGCTGTT

TAGTGATGAGGGTGTATTCAGCTCACTTATATTTTTGGCGGACGACATCCCTCCC
GCATAATGGAGCGC

F5:

AATTCGTGTAATGAAGTTTCAGTCCACGTCCGTACCTCCACCCTTTGTTGTAAA
ATTACCTTGATGCTTTGGAAAAAAGATCGGTCTCGAGCCGCTGGGGATTTCGTC
TTATGAAAGAAGCCGCCAGAGTTAAACCAAACTCTTGTTATTTAACCGGTCTGACT
GACTTAAAATTTTGAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTCGCA
TCTATGAAAAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCTCTGAA
TCTTCCAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTTGGTATTCCGAGGGGCGATGCCT
GTTTCGAGCGTCATTACACCACTCAAGCTATGCTTGGTATTGGGCGTCTGTCCTTAA
TTGGGCGCGCCTTAAAGACCTCGGCGAGGCCACTCCGGCTTTAGGCGTAGTAA
AATTTATTGAACGTCTGTCAAAGGAGAGGAAGTCTGCCGACTGAAACCTTTATT
TTTCTAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA
TAAGCGGAGGAA

F7:

AGGAATCCACTATGTAGGCGGGCTGGACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAAT
TATCACCCTTGCTTTTTCGCTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACCAC
TAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATT
ACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAA
ATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTGAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGC
ACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACC
CTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCAC
TCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTTGACCTCG
GATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA

شکل ۵- توالی ژن *its* قارچ های خالص سازی شده از نمونه های F1: گیاه *Guignardia philoprina* ، نمونه F2: گیاه *Platychora ulmi* ، نمونه F3: گیاه *Ochrocladosporium elatum* ، نمونه F5: گیاه *Aureobasidium pullulans* ، نمونه F7: گیاه *Alternaria tenuissima*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
☒ <i>Guignardia philoprina</i> strain CBS447.68 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1; 5.8S ribosomal RNA gene	1140	1140	96%	0.0	99.18%	FJ824768.1
☒ <i>Guignardia philoprina</i> specimen-voucher CBS 447.68 internal transcribed spacer 1; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer	1087	1087	93%	0.0	98.93%	AF312014.1

شکل ۶. بلاست ژن *its* مربوط به نمونه F1 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Guignardia philoprina*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
☐ <i>Platychora ulmi</i> strain MFLUCC 14-1189 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene	787	787	88%	0.0	98.83%	KX822126.1
☐ Fungal sp. strain T4 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete seq	783	783	93%	0.0	97.35%	MG779599.1

شکل ۷. بلاست ژن *its* مربوط به نمونه F2 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Platychora ulmi*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
☐ Fungal sp. strain T4 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	854	1294	100%	0.0	97.58%	GQ246176.1
☐ <i>Ochrocladosporium</i> strain 11C17E internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	187	1261	100%	0.0	97.04%	MG779599.1

شکل ۸. بلاست ژن *its* مربوط به نمونه F3 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Ochrocladosporium elatum*

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
☐ <i>Aureobasidium pullulans</i> isolate AD389 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	858	858	94%	0.0	94.88%	MN922119.1
☐ <i>Aureobasidium pullulans</i> isolate AD322 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	858	858	94%	0.0	94.88%	MN922107.1
☐ <i>Aureobasidium pullulans</i> isolate AD275 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence	858	858	94%	0.0	94.88%	MN922099.1

شکل ۹. بلاست ژن *its* مربوط به نمونه F5 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Aureobasidium pullulans*

☒ select all 100 sequences selected	GenBank	Graphics	Distance tree of results			
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Accession
☒ <i>Alternaria tenuissima</i> isolate C-2014 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete seq.	1029	1029	98%	0.0	100.00%	F544908.1

شکل ۱۰. بلاست ژن *its* مربوط به نمونه F7 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Alternaria tenuissima*

بررسی حضور ژن های کلیدی مسیر بیوسنتزی تاکسول در قارچ های جداسازی شده

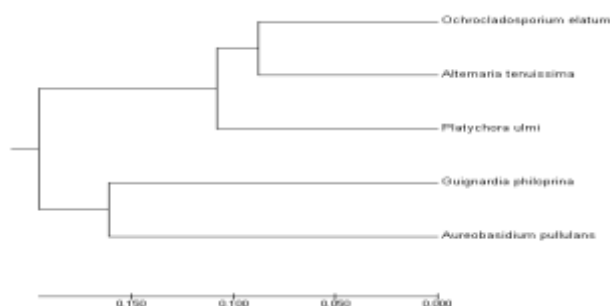
ژن های *dbat* و *bapt* از ژن های کلیدی دخیل در سنتز تاکسول در قارچ های اندوفیت تولید کننده تاکسول می باشد. بنابراین وجود هر کدام از این ژن ها در قارچ های اندوفیت به عنوان شاخصی برای تولید تاکسول در قارچ می باشد. در همین راستا تکثیر قطعات اختصاصی ژن های مذکور با الگو قرار دادن DNA های ژنومی قارچ های F1، F2، F3، F5 و F7 صورت گرفت. نتایج نشان داد که هیچ کدام از قارچ های استخراج شده تولید کننده تاکسول نمی باشند.



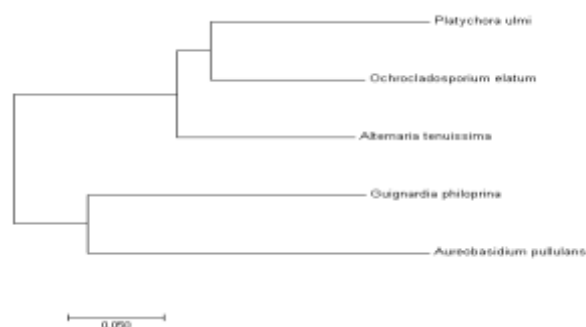
شکل ۱۱. نتایج الکتروفورز ژن های *dbat* و *bap*، چاهک اول: ladder، چاهک های دوم تا آخرین چاهک: نمونه ها

آنالیز فیلوژنتیک قارچ های جداسازی شده

برای ترسیم روابط تکاملی بین قارچ های شناسایی شده، همردیفی موضعی توالی های قارچی استفاده با استفاده از نرم افزار MEGA7 صورت گرفت. نتایج نشان داد که بر اساس روش UPGMA، ایزوله قارچی F1 و F5 که از گیاهان *Guignardia philoprina*، *Aureobasidium pullulans* در یک خوشه قرار گرفتند و بیشترین شباهت را به همدیگر دارند. همچنین ایزوله قارچی F2، F3 و F7 که از گیاهان *Platychora ulmi*، *Ochrocladosporium elatum*، *Alternaria tenuissima* جداسازی شده اند در خوشه های متفاوتی قرار گرفتند. و به احتکال زیاد گونه های جدیدی می باشند که بایستی مطالعات تکمیلی مولکولی و بیوشیمیایی برای شناسایی و نام گذاری آن ها صورت پذیرفت (شکل ۱۲). ترسیم درخت فیلوژنتیکی با روش اتصال همسایه (NJ) نیز صورت گرفت که نتایج روش قبلی را تایید کرد (شکل ۱۳).



شکل ۱۲. ترسیم درخت فیلوژنتیکی با روش UPGMA



شکل ۱۳. ترسیم درخت فیلوژنتیکی با روش اتصال همسایه

بحث

با وجود گستردگی تنوع تاکسویید ها، تاکنون ژن های بسیار کمی در مسیر بیوسنتزی آن ها شناسایی شده است، از این رو میکرو ارگانیزم ها می توانند به عنوان یک حوضه مناسب جهت بررسی و شناسایی ژن های درگیر در این مسیر به حساب آیند [۶۸]. نتایج تحقیقات نشان داده که علاوه بر جستجو به دنبال ایزوله های با عملکرد بیشتر، دستکاری ژن های کلیدی مسیر بیوسنتزی تاکسول در قارچ های اندوفیت نیز می تواند به عنوان یکی از روش های مناسب جهت افزایش میزان تولید تاکسول به حساب آید [۶۹]. با این حال ناشناخته بودن مسیر بیوسنتزی تاکسول در قارچ ها و عدم دسترسی به مجموعه کامل ژن های دخیل در این مسیر، عامل محدود کننده مهم در این زمینه است. با شناسایی ژن های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول در قارچ های اندوفیت می توان نقاط مبهم این مسیر را روشن ساخت و از آن ها به عنوان نشانگر مولکولی برای غربال قارچ های اندوفیت مولد تاکسول استفاده کرد [۷۰].

نتایج تحقیقات ما نشان داد که از هشت ایزوله قارچی جدا شده، در پنج ایزوله تکثیر قطعه *its* صورت پذیرفت و توالی یابی قطعات نشان داد که ایزوله F1 جداسازی شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Guignardia philoprina* با میزان مشابهت ۹۹/۱۸ درصد می باشد، همچنین قارچ نمونه F2 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Platychora ulmi* با میزان مشابهت ۹۸/۸۳ درصد می باشد، مطالعات نشان داده شده در نمونه F3 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Ochrocladosporium elatum* با میزان مشابهت ۹۷/۰۴ درصد می باشد، همچنین قارچ نمونه F5 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Aureobasidium pullulans* با میزان مشابهت ۹۴/۸۸ درصد می باشد، نهایتاً نتایج نشان داد که نمونه F7 جدا شده از گیاه سرخدار به نام قارچ *Alternaria tenuissima* بوده ولی به دلیل این که میزان مشابهت این توالی با گونه های شناخته شده جنس های دیگر در حدود ۹۹/۸۱ درصد می باشد، احتمالاً گونه جدیدی می باشد که نیاز به مطالعه تکمیلی می باشد. مطالعات تکمیلی با استفاده از ژن های *ts*، *dbat* و *bapt* نشان داد که هیچ کدام از ایزوله ها تولید کننده تاکسول نبودند.

اولین بار ژو و همکاران (۲۰۰۷) بحث استفاده از ژن های مسیر بیوسنتزی تاکسول را به عنوان مارکر مولکولی جهت غربال سریع قارچ های اندوفیت مولد تاکسول را مطرح کردند. این گروه حضور ژن *ts* را در ۱۲ ایزوله از ۳۸ ایزوله جداسازی شده از سرخدار گزارش کردند. این گروه تولید تاکسول را در سه ایزوله از ۱۲ ایزوله حاوی ژن *ts* گزارش کردند. از آنجائیکه غربال گری و یافتن قارچ های مولد تاکسول از بین کل قارچ های جداسازی شده فرایندی زمان بر است، این روش می تواند بسیار موثر باشد [۷۱]. استروبل و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که از میان ۳۳ قارچ اندوفیت جدا شده از *Taxus. wallachiana* تنها یک ایزوله به نام *pestalotiopsis* قادر به تولید تاکسول می باشد، در واقع ۳ درصد قارچ های اندوفیت، تولید کننده تاکسول بودند که با نتایج تحقیقات ما مبنی بر اینکه تعداد قارچ های اندوفیت تولید کننده تاکسول بسیار کم می باشد همخوانی دارد [۷۲].

کاروسو و همکاران (۲۰۰۵) تعداد ۱۵۰ ایزوله قارچی را از درخت *Taxus.baccata* جدا کردند و تولید تاکسول در ۱۵ ایزوله را گزارش کردند [۷۳]. در این تحقیق نیز ۱۰ درصد قارچ ها مولد تاکسول بودند که با نتایج تحقیق ما همخوانی دارد. با توجه به اینکه در مطالعه ما ۵ ایزوله قارچی جداسازی شده بود، احتمال مولد بودن تاکسول نیز کم بود. وانگ و همکاران (۲۰۰۲) ۲۱ ایزوله قارچی را از گونه *Taxus.chinensis* جداسازی نمودند که از میان آنها، استرین BT2 توانایی تولید تاکسول را دارا بود. این تحقیق نیز با نتایج مطالعه ما همخوانی دارد.

نتیجه گیری کلی

در نتایج آزمایشات تحقیق ما مشخص گردید که از پنج گونه سرخدار، نوع متفاوت قارچ های اندوفیت که از نظر شکل و کلونی متفاوت بودند، رشد کردند و با استفاده از پرایمر های اختصاصی *ts*، *bapt*، *dbat* مشخص شد که این قارچ ها تولید کننده تاکسول نمی باشند.

با توجه به این که مقدار قارچ های ایزوله ما تعداد کمتری نسبت به تحقیقات مشابه پیشین بود، لذا این انتظار وجود داشت که قارچ های مورد مطالعه تولید کننده تاکسول نباشند. در این تحقیق نمونه های گیاهی مورد استفاده جهت جداسازی قارچ های اندوفیت از جنگل های ارسباران و از ۱۰ منطقه انتخاب شده بودند. بنابراین به نظر می رسد مطالعه و بررسی سایر جنگل های سرخدار ارسباران به منظور جداسازی قارچ های اندوفیت موجود در آن ناحیه ضروری باشد.

پیشنهادهای

- * جمعیت قارچ ها و باکتری های اندوفیت درختان سرخدار مناطق دیگر بررسی گردد.
- * تولید یا عدم تولید سایر ترکیبات مهم دیگر نیز در این قارچ ها مطالعه شود.
- * حضور ژن های دیگر درگیر در بیوسنتز تاکسول در قارچ های اندوفیت بررسی گردد.
- * حضور تاکسول در محیط کشت قارچ های اندوفیت با روش های دقیق تر مانند روش های ایمنی سنجی بررسی شود.
- * خواص ضد قارچی، آنتی بیوتیکی و آنتی اکسیدانی عصاره های محیط کشت قارچ ها مطالعه شود.
- * شناسایی مولکولی و مورفولوژیکی قارچ های اندوفیت انجام شود.

منابع

- [1] Gurib-Fakim, A., Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of Medicine, 2006. 27(1): p. 1-93.
- [2] Onrubia, M., et al., Coronatine, a more powerful elicitor for inducing taxane biosynthesis in *Taxus media* cell cultures than methyl jasmonate. Journal of plant physiology, 2013. 170(2): p. 211-219.
- [3] Gómez-Galera, S., et al., The genetic manipulation of medicinal and aromatic plants. Plant cell reports, 2007. 26(10): p. 1689-1715.
- [4] Jaziri, M., et al., *Taxus* sp. cell, tissue and organ cultures as alternative sources for taxoids production: a literature survey. Plant cell, tissue and organ culture, 1996. 46(1): p. 59-75.
- [5] Sabater-Jara, A., L. Tudela, and A. López-Pérez, In vitro culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. Phytochemistry reviews, 2010. 9(2): p. 343-356.
- [6] Frense, D., Taxanes: perspectives for biotechnological production. Applied microbiology and biotechnology, 2007. 73(6): p. 1233-1240.
- [7] Malik, S., et al., Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: a review. Process Biochemistry, 2011. 46(1): p. 23-34.
- [8] Rao, S.R. and G. Ravishankar, Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances, 2002. 20(2): p. 101-153.
- [9] Patil, R.A., et al., Contribution of taxane biosynthetic pathway gene expression to observed variability in paclitaxel accumulation in *Taxus* suspension cultures. Biotechnology journal, 2012. 7(3): p. 418-427.
- [10] Liu WC, Gong T and Zhu P. Advances in exploring alternative Taxol sources. *Royal Society of Chemistry Advances* 2016; 6: 48800-48809.
- [11] Day BW, Rezenkran HS, Gunsekera ZSP, Loungley RE, Lin MC, Hamel E, Kowalski R and Haa E. Taxol: a unique antieoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasm. *Biochemistry*. 1996;35: 243-250.
- [12] Hortuwitz SB. Mechanism of action of taxol. *Trends in Pharmacol. Sci.* 1992;13:134-136.

- [13] Christen, A. A., Bland, J., and Gibson, D. M. 1989. Cell culture as a means to produce taxol. *Proc. Am. Assoc. Cancer*, 30: 2252.
- [14] Lesani, M. R. 1999. Yew. Tehran: Ministry of Jihad-e Sazandegi Publication. 81
- [15] Nadeem, M., Rikhari, H. C., Anil Kumar, L., Palni, M. S., and Nandi, S. K. 2002. Taxol content in the bark of Himalayan Yew in relation to tree age and sex. *Phytochemistry*, 60: 627-631.
- [16] Baloglu E, Kingston DG. The taxane diterpenoids. *Journal of natural products*. 1999; 62(10): 1448-72.
- [17] Venugopalan A and Srivastava S. Endophytes as *in vitro* production platforms of high value plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances* 2015; 33 (6): 873-887.
- [18] Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon Pand McPail AT. Plant antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 1971; 93: 2325-2327.
- [19] Ghershenzon J and Croteau R. Terpenoid biosynthesis: the basic pathway and formation of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: Moore TS (ed). *Lipid Metabolism in Plants*. CRC press, Boca Raton, FL. 1993; PP: 339-88.
- [20] Hezeta M, Lewis NG and Croteau R. Purification and characterization of tax-4 (5), 11(12)-diene synthase from Pacific yew (*Taxus brevifolia*) that catalyzes the first committed step of taxol biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 322: 437-444.
- [21] Hezari M and Croteau R. Taxol biosynthesis: An update. *Planta Medica*. 1997; 63: 291-295.
- [22] Kusari S, Singh S and Jayabaskaran C. Rethinking production of Taxol (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends in Biotechnol.* 2014; 32 (6): 304-311.
- [23] Baloglu E and Kingston DG. The taxane diterpenoids. *J. Nat. Prod.* 1999; 62: 1448-1472.
- [24] Floss HG and Mocek U. In *Taxol: Science and Applications*. Suffness M, ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 1995; PP: 191-208.
- [25] Sabater-Jara AB, Tudela LR and Lopez-Perez AJ. In vitro culture of *Taxus* sp.: strategies to increase cell growth and taxoid production. *Phytochem Rev.* 2010; 9: 343-56.
- [26] Frense D. Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007; 73: 1233-40.
- [27] Nims E, Dubois CP, Roberts SC and Walker EL. Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Metab Eng.* 2006; 8: 385-94.
- [28] Roberts SC. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biol.* 2007; 3: 387-95.
- [29] Walker K and Croteau RB. Molecular cloning of a 10-deacetyl baccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. *PNAS.* 2000; 97 (2): 583-7.
- [30] Ho C, Chang S, Lung J, Tsai C and Chen K. The Strategies to Increase Taxol Production by Using *Taxus mairei* Cells Transformed with TS and DBAT Genes. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2005; 3 (3): 179-85.
- [31] Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H, Hidalgo, Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M. & Palazon, J. (2014). Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High-Added Value Compounds in Plant Cell Factories. *Molecules*, 21: 182-189
- [32] Gorelick, J. & Bernstein, N. (2014). Elicitation: An underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. *Adv. Agronomy*, 124: 201-230.
- [33] Angelova, Z., Georgiev, S. & Roos, W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20: 72-83.

- [34] Baenas, N., Garcia-Viguera, C. & Moreno, D. A. (2014). Elicitation: A tool for enriching the bioactive composition of foods. *Molecules*, 19: 13541–13563.
- [35] Nims, E., Dubois, C. P., Roberts, S. C. & Walker, R. (2006). Expression profiling of genes involved in paclitaxel biosynthesis for targeted metabolic engineering. *Meta-engineering*, 8: 385–394.
- [36] Wu, J. A., Wang, C. B. & Mei, X. (2001). Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp. cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *Journal of Biotechnology*, 85: 67–73.
- [37] Zhang, C. H., Mei, X. G., Liu, L. & Yu, L. J. (2000). Enhanced paclitaxel production induced by the combination of elicitors in cell suspension cultures of *Taxus chinensis*. *Biotechnology Letters*, 22: 1561–1566.
- [38] Balažová, A., Blanáriková, V., Bilka, F. & Bilková, A. (2008). Effect of combined biotic and abiotic elicitor on the sanguinarine formation in cell suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *ACTA Facultatis Pharmaceuticae*, 55: 58–63.
- [39] Baldi, A., Singh, D. & Dixit, D. K. (2008). Dual elicitation for improved production of withaferin A by cell suspension cultures of *Withania somnifera*. *Appl Biochem Biotechnol*, 151: 556–564.
- [40] Lei C, Ma D, Pu G, Qiu X, Du Z, Wang H, Li G, Ye H and Liu B. 2011. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and Products* 33: 176–182.
- [42] Ferreira JFS, Simon JE and Janick J. 1995. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions. *Planta Medica-Journal of Medicinal Plant Research* 61: 167–170.
- [43] Mulabagal V and Tsay HS. 2004. Plant cell cultures—an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering* 2: 29–48.
- [43]. ثابت طالبی. خ. ۱۳۸۳. نگاهی به جنگل های ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع. صفحه ۱۱. [43].
- [44] اداره کل منابع طبیعی استان آذربایجان شرقی. ۱۳۸۲. طرح سیانت از جنگل ارسباران. صفحه ۳۲۱–۳۳۴.
- [45] قنبری شرفه. ع. ۱۳۸۴. بررسی توالی اکولوژیکی توده های سرخدار در جنگل های ارسباران. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران. صفحه ۱۲۵.
- [46] زرگری علی. گیاهان دارویی. چاپ ۵. انتشارات دانشگاه تهران. ۱۳۷۴. جلد ۵. صفحه ۴۵–۴۱.
- [47] Itokawa H. and Lee K – H. *Taxus the genus Taxus*. Taylor and francis. 2002. London and newyork.
- [48] on the History of taxol. Available from: [URL:Http:// WWW. Botanical – online. Com / taxol. Htm](http://WWW.Botanical-online.Com/taxol.Htm)
- [49] Evans W.C. Trease and Evans pharmacognosy. 2002. W.B. saunders. Edinburgh. London. Newyork.
- [50] Simpson, C.R., et al., Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the Monte Carlo inversion technique. *Physics in Medicine & Biology*, 1998. 43(9): p. 2465.
- [51] Baloglu E, Kingston DG. The taxanediterpenoids. *Journal of natural products*. 1999;62(10):1448–72.
- [52] Pichersky, E. and D.R. Gang, Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 2000. ۵(۱۰): 439–445.
- [53] 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.

- [54] Zhou X, Zhu H, Liu L, Lin J, Tang K. A review: recent advances and future prospect of taxol-producing endophytic fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86(6): 1707-17.
- [55] 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.
- [56] Zhang P, Zhou PP, Yu LJ. An Endophytic Taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. *Curr Microbiol* 2009; 59(3): 227-32.
- [57] 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]
- [58] 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.
- [59] 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.
- [60] 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
- [61] 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]
- [62] Li YC, Tao W and Chen L. Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and Paclitaxel producing endophytic fungi in a bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009; 83(2): 233-239.
- [63] Zhou, X., Zhu, H., Liu, L., Lin, J. & Tang, K. (2010). "A review: recent advances and future prospects of taxol-producing endophytic fungi". *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86: 1707-1717.
- [64] Strobel, G. & Daisy, B. (2003) "Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products". *Microbiol. Mol. Bio. Rev.*, 67(4): 491-502
- [65] Ausubel, M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D.D., Seidman, J.G. & Struhl, K. (2010). "Current Protocols in Molecular Biology". Wiley, New York. pp: 5888.
- [66] Farkas, V. (1979). "Biosynthesis of cell walls of fungi". *Microbiol. Rev.*, 43: 117-144.
- [67] Moller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H. & Geiger, H.H. (1992). "A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues". *Nucleic Acids Res.*, 20: 6115-6116.
- [68] Noor-Adila, A.K., Farah-Diba, A.B., Zamri, Z., Wan Mohtar, W.Y., Aidil, A.H., Mahadi, N.M. & Murad, A.M.A. (2007). "Comparison of methods for isolating high quality DNA and RNA from an oleaginous fungus *Cunninghamella bairdii* strain 2a1". *Malaysian J. Microbiol.*, 3: 7-13.
- [69] Flores-Bustamante, Z.R., Rivera-Orduña, F.N., Martínez-Cárdenas, A. & Flores-Cotera, L.B. (2010). "Microbial paclitaxel: advances and perspectives". *J. Antibiot.*, 63(8): 460-467.
- [70] Ajikumar, P.K., Xiao, W.H., Tyo, K.E., Wang, Y., Simeon, F., Leonard, E., ... & Stephanopoulos, G. (2010). "Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*". *Science*, 330(6000): 70-74.
- [71] Zhang, P., Zhou, P. & Yu, L. (2009a). "An Endophytic Taxol-Producing Fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2". *Curr. Microbiol.*, 59: 227-232.
- [72] Zhou, X., Wang, Z., Jiang, K., Wei, Y., Lin, J., Sun, X. & Tang, K. (2007). "Screening of taxol-producing endophytic fungi from *Taxus chinensis* var. *mairei*". *Appl. Biochem. Microbiol.*, 43(4): 439-443.

[73] DeJong, J., Liu, Y., Bollon, A., Long, R., Jennewein, S., Williams, D. & Croteau, R. (2005). "Genetic engineering of Taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*". *Biotechnol. Bioeng.*, 93(2): 212-224