In vitro study of two species of yew tree in terms of endophytic diversity and paclitaxel variation

Arezoo Jondoaghleboob[1], Azim Ghasemnezhad[1*], Kamran Rahnama[2], Mostafa Khoshhal Sarmast[1]

[1.] Department of Horticultural Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran

[2.] Department of phytopatology, Gorgan University of Agriculture and Natural Resources, Iran

Abstract

Due to the slow growth of the yew tree and importance of its metabolites, today, the paclitaxel producing endophytes have been found to be of great research interest. To that extent, in no presence of endophyte, the production of taxol in plant is not possible. In the present study, it has been tried beside the investigation of the qualitative changes of callus from the point of paclitaxel, the endophytic situation of it also be studied. For this purpose, an experiment was conducted with three levels of 1, 2 and 3 mg/L of 2, 4-D, and two levels of 0.5 and 0.2 mg/L of Kinetin in two species of *T.baccata* and *T.brevifolia*. Finally, the amount of paclitaxel and the endophytic status in callus were studied. After 3 months of cultivation, 9 colonies of the endophytic fungi appeared in the callus of both species and leaves of *T.baccata*. The isolated fungi were identified based on their morphology and reproductive organs, such as the formation of spores. Although molecular and biochemical studies of isolated endophytes did not show the ability to produce taxol in them, endophytic fungi in the yew callus, which was first reported, could be a turning point in a better understanding of host and endophytic fungi in the production of valuable metabolites of paclitaxel, especially in cell and hairy root cultures.

Keywords: Endophyte, Taxol, Tissue culture, Yew

* Corresponding Author: ghasemnezhad@gau.ac.ir

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

DOI. 10.22108/ijpb.2019.114287.1128

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال یازدهم، شمارهٔ چهل و دوم، زمستان ۱۳۹۸، صفحهٔ ۵۳-۶۶
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۸/۱۰/۱۴
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱۰/۲۸

بررسی درون‌شیشه‌ای دو گونهٔ سرخدار ازنظر تنوع اندوفیتی و تغییرات پاکلی‌تاکسل

آرزو جندواغله‌بوب[۱]، عظیم قاسم‌نژاد[۱*]، کامران راهنما[۲]، مصطفی خوشحال سرمست[۱]
[۱] گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
[۲] گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

چکیده

امروزه باتوجه‌به رشد کند گیاه سرخدار و اهمیت متابولیت‌های آن، اندوفیت‌های بیوسنتزکنندهٔ ترکیبات ارزشمند سرخدار اهمیت پژوهشی زیادی یافته‌اند؛ به‌طوری‌که تولید پاکلی‌تاکسل در سلول گیاهی بدون اندوفیت غیرممکن تلقی می‌شود. در پژوهش حاضر سعی شده است علاوه‌بر بررسی تغییرات کیفی کالوس از نظر پاکلی‌تاکسل در شرایط *درون‌شیشه‌ای*، وضعیت اندوفیتی کالوس بررسی شود؛ به این منظور، آزمایشی با سه سطح ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و دو سطح ۰/۵ و ۰/۲ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین برای دو گونهٔ سرخدار (*Taxus baccata* و *Taxus brevifolia*) طراحی و اجرا شد و درنهایت، میزان پاکلی‌تاکسل و وضعیت اندوفیت در کالوس بررسی شد. پس‌از گذشت ۳ ماه از زمان کشت، قارچ‌های اندوفیت به تعداد ۹ کلنی در کالوس ساقهٔ هر دو گونه و برگ گونهٔ *T. baccata* ظاهر شدند. قارچ‌ها بر اساس ریخت‌شناسی و نوع اندام زایشی مانند تشکیل هاگ و نوع هاگ شناسایی شدند. از میان اندوفیت‌های یافت‌شده، تنها *Aspergillus flavus* با ویژگی‌های شاخص کنیدی، سلول فیالید و کنیدیفور شناسایی شد و سایر نمونه‌های قارچی مشاهده‌شده فاقد اسپور بودند یا حالت پیکنیدیوم داشتند. اگرچه بررسی‌های مولکولی و بیوشیمیایی اندوفیت‌های جداسازی‌شده از کالوس توانایی تولید پاکلی‌تاکسل در آنها را نشان ندادند، ردیابی اندوفیت در کالوس سرخدار که برای نخستین‌بار گزارش می‌شود، نقطهٔ عطفی در درک بهتر جایگاه میزبان و اندوفیت در تولید متابولیت ارزشمند پاکلی‌تاکسل به‌ویژه در کشت بافت است.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، پاکلی‌تاکسل، سرخدار، کشت بافت

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: ghasemnezhad@gau.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۱۷۳۲۴۳۷۶۱۴

Copyright©2020, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

درخت سرخدار (*Taxus baccata* L.) متعلق به تیرهٔ سرخدار (Taxaceae) و از گونه‌های باارزش سوزنی‌برگان نادر و در خطر انقراض بومی جنگل‌های شمال ایران است. مطالعه‌های فسیل‌شناسی نشان می‌دهند قدمت درختان سرخدار بالغ بر ۱۹۰ میلیون سال است و قدیمی‌ترین فسیل سرخدار به دوره‌های میوسن و پلیوسن تعلق دارد؛ در دوره‌های بعد، توده‌های آمیختهٔ درختان سرخدار با گونه‌های راش و ممرز شکل گرفتند (Mossadegh, 1993). تیرهٔ سرخدار سه جنس دارد (Mossadegh, 1993): جنس *Austrotaxus* در جنگل‌های مرطوب کالدونی رشد می‌کند و بومی این سرزمین است؛ جنس *Torreya* ۵ گونه دارد که ۳ گونهٔ آن در شرق آسیا و دو گونهٔ آن در آمریکای شمالی وجود دارند؛ جنس *Taxus* شامل ۸ گونه است که در نیمکرهٔ شمالی، اروپا، آسیا و آمریکای شمالی پراکنده‌اند (Itokawa and Lee, 2002).

تاکسان‌ها ترکیبات اصلی سرخدار را تشکیل می‌دهند (Wani *et al*., 1971; Miller and Brief, 1980; Woods *et al*., 1996). بیش از ۳۵۰ تاکسان (مشتقات دی‌ترپنوئید) در گونه‌های مختلف تشخیص داده شده‌اند که تاکسل مهم‌ترین آنهاست (Evans, 2002). تاکسل، آلکالوئیدی گیاهی با ساختار شیمیایی بسیار پیچیده است که یکی از مؤثرترین داروهای ضدسرطان و از محبوب‌ترین داروها برای استفاده در شیمی‌درمانی به شمار می‌آید (Expósito *et al*., 2009). تاکسل در برابر گسترهٔ وسیعی از انواع تومورها ازجمله سرطان سینه، رحم، معده و سر و گردن مؤثر است و عامل ضدمیکروتوبولی فعال در برابر سارکومای کاپوزیس (*Kaposi's sarcoma*) وابسته به ایدز شناخته شده است (Strobel *et al*., 1996)؛ این ترکیب با اتصال به میکروتوبول‌ها سبب افزایش تجمع و اتصال توبولین‌ها و به دنبال آن، تشکیل میکروتوبول‌های پایدار می‌شود (Baloglu and Kingston, 1999).

تولید انبوه و سریع مواد مؤثره از روش‌های شیمیایی عمدتاً مشکل یا غیرممکن است و از سویی، محدودیت‌های مختلف مانع تأمین این ترکیبات از طبیعت می‌شوند. استفاده از راهکارهای زیست‌فناوری ازجمله کشت سوسپانسیون سلولی و کشت کالوس، راه حل مناسبی برای تولید سریع و انبوه متابولیت‌های ثانویه است (Bourgaud *et al*., 2002; Rao and Ravishankar, 2002; Sinha and Vidyarthi, 2011). کشت سلول‌های گیاهی منبع مناسب و مهمی برای تولید متابولیت‌های ثانویهٔ باارزش در بیشتر گیاهان است (Sinha and Vidyarthi, 2011). کالوس، تودهٔ سلولی کم‌وبیش سازمان‌نیافته با دیوارهٔ سلولی نازک است که معمولاً از سلول‌های پارانشیمی به وجود می‌آید. نخستین‌بار در سال ۱۹۷۱، تاکسل از پوست درخت *T. brevifolia* جداسازی و استخراج شد. این ترکیب در تمام بخش‌های گیاه سرخدار به‌جز میوهٔ تازهٔ آن وجود دارد و مقدار آن تحت‌تأثیر نوع اندام و گونهٔ گیاهی متفاوت است. مقدار تاکسل در گونهٔ *T. baccata* برابر ۰/۰۲درصد وزن خشک گیاه و در گونهٔ *T.brevifolia* برابر ۰/۰۱ درصد وزن خشک گیاه است (Yarikhosroshahi,

(2004. ازآنجاکه تولید ۱ کیلوگرم تاکسل از گیاه مستلزم قطع ۲۰۰۰ تا ۲۵۰۰ اصله درخت سرخدار بالغ است و بیمار سرطانی در طول درمان خود به ۶ درخت نیاز دارد، تولید تاکسل از این منبع طبیعی سبب قطع بی‌رویه و انقراض درختان سرخدار می‌شود. طی دههٔ اخیر، پژوهشگران در پی یافتن راه‌های جدید برای بهترکردن شرایط تولید و کاهش قیمت این داروی باارزش به‌منظور پاسخگویی به نیاز بیماران سرطانی و کلینیک‌های تخصصی بوده‌اند (Jennewein and Croteau, 2001). برخی از اندوفیت‌ها توانایی تولید تاکسل را دارند. تلاش‌ها برای شناسایی ریزموجودات همزیست سرخدار به کشف قارچ‌های تولیدکنندهٔ پاکلی‌تاکسل منجر شده‌اند (Lesani, 1999; Wang *et al*., 2000). شناسایی قارچ‌های اندوفیت گیاهان چوبی و چندساله و مطالعهٔ برهم‌کنش آنها با گیاهان میزبان کمتر از قارچ‌های اندوفیت گیاهان دیگر مدنظر قرار گرفته است (Weber, 2009).

برخی از قارچ‌های اندوفیت درختان سرخدار به‌علت داشتن توانایی تولید داروی ضدسرطان پاکلی‌تاکسل، منبع تجدیدشوندهٔ مهمی برای تولید این داروی باارزش و گران‌قیمت محسوب می‌شوند. باوجود مطالعه‌های بسیاری که در زمینهٔ این گروه از قارچ‌ها در دنیا انجام شده‌اند، تاکنون پژوهشی در زمینهٔ امکان جداسازی اندوفیت از کالوس و توانمندی قارچ‌های اندوفیت حاصل از کالوس سرخدار انجام نشده است؛ ازاین‌رو، مقالهٔ حاضر بخشی از نتایج پژوهش انجام‌شده به‌منظور شناسایی قارچ‌های اندوفیت حاصل از کالوس دو گونهٔ سرخدار را ارائه می‌دهد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ ریزنمونهٔ سرخدار از دو گونه: ساقه‌های جوان و بدون آلودگی درختان بالغ گونهٔ *T. baccata* واقع در روستای زیارت گرگان و گونهٔ *T. brevifolia* واقع در باغ گیاه‌شناسی نوشهر استان مازندران طی تیرماه ۹۶ در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های گیاهی تا زمان کشت، در یخچال و درون پارچهٔ نخی خیس نگهداری شدند. به‌منظور انتخاب ریزنمونه‌ها از ساقه‌های مناسب و قوی به طول ۵ سانتی‌متر استفاده شد. ساقه‌های منتخب با آب حاوی چند قطره مایع ظرفشویی به‌مدت ۱۰ دقیقه شستشو شدند و سپس برای حذف بقایای اضافی، نمونه‌ها چند مرتبه با آب روان شستشو و بی‌درنگ به دستگاه لامینار ایرفلوی استریل منتقل شدند. بهترین ضدعفونی ریزنمونه‌ها با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱۵ ثانیه و هیپوکلریدسدیم حاوی ۵ درصد کلر فعال با یک قطره مایع ظرفشویی به‌مدت ۲۵ دقیقه انجام شد؛ درنهایت، ریزنمونه‌هایی به‌اندازهٔ ۱ سانتی‌متر از اندام‌های گیاهی ضدعفونی‌شده تهیه و در محیط‌کشت Gamborg (B5) با شش سطح هورمونی ترکیبی 2,4-D و کینتین شامل غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین و سه تکرار با رعایت شرایط استریل کشت شدند و به اتاق رشد با دمای ۲۴ تا ۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی انتقال یافتند.

کشت کالوس در محیط Potato Dextrose Agar: پس‌از گذشت ۲۸ روز از رشد کالوس در تیمارهای استفاده‌شده و برای بررسی وضعیت کالوس ازنظر وجود اندوفیت قارچی، مقداری کالوس در شرایط

کاملاً استریل به محیط PDA منتقل شد. به‌منظور ظهور اندوفیت‌های احتمالی، نمونه‌های کشت‌شده به انکوباتوری با دمای ۲۴ درجهٔ سانتی‌گراد منتقل و تا زمان ظهور اندوفیت در آن نگهداری شدند. بر اساس منابع، نمونه‌های قارچی که حداقل ۱۰ روز پس از کشت لزوماً از روی نمونه ظاهر می‌شوند، اندوفیت تلقی می‌شوند. پس‌از رشد مناسب نمونه‌های اندوفیت، نوک هیف قارچ‌های رشدیافته از کالوس جدا و به محیط‌کشت PDA منتقل شد و به‌منظور اطمینان‌یافتن از خلوص قارچ‌های اندوفیت به‌دست‌آمده، این عمل دو بار دیگر نیز تکرار شد (Zhang *et al*., 2008).

طراحی آغازگرها و بررسی بیوانفورماتیکی آغازگرهای استفاده‌شده: مطابق جدول ۱، سه آغازگر برای تکثیر سه ژن DAPT (10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase)، BAPT (Baccatin-aminophenylpropanoyl-13-O-transferase) و TS (Taxadiene synthase) استفاده شدند.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده‌شده برای ردیابی ژن‌های درگیر در بیوسنتز تاکسل در کالوس سرخدار و اندوفیت‌های جداسازی‌شده

Annealing temperature	Primer name	Sequence (5´-3´)	Product length (bp)
۵۷/۶۰	DAPT F:	GGGAGGGTGCTCTGTTTG	۱۵۳
۵۷/۵۳	DAPT R:	GTTACCTGAACCACCAGAGG	
۵۹/۷۵	BABT F:	CCTCTCTCCGCCATTGACAA	۶۳۱
۵۹/۸۸	BABT R:	TCGCCATCTCTGCCATACTT	
۵۸/۹۶	TS F:	AAACCCATGTCGAATTGAGAAG	۱۰۷۰
۵۹/۵۹	TS R:	CAAGTTTGCATACACTCTGGAATCT	

استخراج DNA ژنومی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): به‌منظور استخراج DNA قارچ‌های جداسازی‌شده، میسلیوم‌ها با نیتروژن مایع کاملاً پودر شدند و استخراج DNA به روش CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) انجام شد؛ DNA سرخدار برای شاهد مثبت در واکنش PCR استفاده شد. مقدار ۰/۵ گرم کالوس سرخدار با استفاده از نیتروژن مایع ساییده و استخراج DNA ژنومی به روش یادشده انجام شد. آغازگرهای اختصاصی که ناحیهٔ حفاظت‌شده‌ای از ژن‌های مدنظر را تکثیر می‌کنند (جدول ۱)، به‌منظور بررسی حضور ژن‌های *DBAT*، *BAPT* و *TS* در قارچ‌ها استفاده شدند. حجم نهایی هر واکنش ۲۰ میکرولیتر حاوی ۱۰ نانوگرم DNA، ۲ میکرولیتر بافر PCR x ۱۰، ۰/۷ میکرولیتر کلریدمنیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر از آغازگرها و ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA polymerase (سیناژن، ایران) بود. مخلوط حاضر پس‌از افزودن آب دوبار تقطیر استریل به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و در PCR با برنامهٔ زیر قرار داده شد: واسرشت‌شدن ابتدایی به‌مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد، سپس ۳۰ چرخهٔ واکنش در ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۵۲/۸ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه و درنهایت،گسترش نهایی در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه.

الکتروفورز نمونه‌ها: به‌منظور تفکیک قطعه‌های DNA و آگاهی از محصولات PCR و مشاهده‌پذیرکردن آنها، الکتروفورز محصول PCR نمونه‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه روی ژل آگارز (KIA GEN، ایران) انجام شد (Zhang *et al*., 2008). بافر TBE شامل EDTA ۰/۵ مولار، بوریک‌اسید و آب مقطر دیونیزه با اسیدیتهٔ ۸ برای ساخت ژل آگارز ۲ درصد و مادهٔ رنگی safe dye شرکت سیناژن برای رنگ‌آمیزی ژل استفاده شد.

عصاره‌گیری و تعیین میزان پاکلی‌تاکسل نمونه‌ها با استفاده از HPLC: به‌منظور استخراج و تعیین مقدار پاکلی‌تاکسل از روش پیشنهادی Ghassempour (۲۰۰۹) استفاده شد؛ به این منظور، ابتدا ۲ گرم کالوس تازه کاملاً ساییده و در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول خیسانده شد؛ سپس به‌منظور نفوذ کامل حلال، نمونه به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق روی شیکر قرار گرفت. پس‌از صاف‌کردن عصارهٔ متانولی، آب به مقداری برابر با حجم متانول به آن اضافه و سپس، ۲۰ میلی‌لیتر انهگزان در قیف دکانتور به نمونه افزوده شد. پس‌از حذف انهگزان، ۲۰ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به عصارهٔ متانولی در قیف دکانتور اضافه شد و پس از تبخیر حلال به کمک تبخیرکنندهٔ دوار، مادهٔ خشک به‌دست‌آمده در استونیتریل خالص حل و تا زمان تجزیه‌وتحلیل در فریزر نگهداری شد.

اندازه‌گیری میزان پاکلی‌تاکسل نمونه‌های ساقه و برگ گونهٔ *T. brevifolia* و ساقهٔ گونهٔ *T. baccata* با استفاده از HPLC (مدل Merck-Hitachi، آلمان) مجهز به ستون C18 با ابعاد ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر انجام شد. فاز متحرک شامل متانول، استونیتریل و آب به نسبت ۴۰: ۴: ۲۰ میلی‌لیتر بود که با شدت جریان ۱ میلی‌لیتربردقیقه در طول موج ۲۳۰ نانومتر انجام شد. نمونه پیش از تزریق، دو مرتبه با فیلتر ۰/۴۲ میکرون صاف شد. غلظت‌های مختلف پاکلی‌تاکسل خالص برای به‌دست‌آوردن منحنی کالیبراسیون استفاده شدند و سپس با قراردادن عدد سطح زیر پیک هر نمونه، میزان پاکلی‌تاکسل محاسبه و مقدار آن بر حسب میکروگرم‌درگرم گزارش شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها: پژوهش حاضر با آرایش فاکتوریل بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی و در شش تیمار و سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل سه سطح 2,4-D (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم‌درلیتر) و دو سطح کینتین (۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر) بودند. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS نسخهٔ ۱۶ انجام و آزمون LSD در سطح ۵ درصد برای مقایسهٔ میانگین داده‌ها استفاده شد. نرم‌افزار Excel نسخهٔ ۲۰۱۰ برای رسم نمودار استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی صفت‌های ریخت‌شناختی کالوس ساقه و برگ دو گونهٔ سرخدار: کالوس ازنظر رنگ تا چهار هفتهٔ اول پس‌از کالوس‌دهی سبزرنگ بود و پس‌از این مدت، نمونه‌های کالوس زیرکشت شدند و به‌منظور جلوگیری از قهوه‌ای‌شدن، زغال فعال (۲۰۰ میلی‌گرم‌درلیتر) به محیط جدید با شرایط هورمونی قبلی اضافه شد. رنگ اغلب کالوس‌ها در تمام سطوح تیماری تقریباً قهوه‌ای مایل به نارنجی بود.

ازنظر سفتی بافت، کالوس‌های حاصل در تمام سطوح تیماری دارای بافت نرم بودند. ازآنجاکه کیفیت کالوس به نوع و مقدار عناصر (ماکرو، میکرو، ویتامین‌ها و ...) موجود در محیط‌کشت وابسته است، محیط‌کشت و تنظیم‌کننده‌های مختلف رشد بر این متغیر تأثیر می‌گذارند. گزارش شده است

کالوس در محیط‌کشت‌های حاوی غلظت اندک کینتین و غلظت زیاد 2,4-D رشد سریعی دارد و ساختار کالوس نرم و سست است (Karimian *et al.*, 2015)؛ نکته‌ای که در پژوهش حاضر نیز مشاهده شد. به‌طورکلی، ریزنمونهٔ گونهٔ *T. baccata* قابلیت بیشتری برای تشکیل کالوس از خود نشان می‌دهد و ازجمله دلایل این اختلاف عبارتند از: متفاوت‌بودن رویشگاه و شرایط جغرافیایی و محیطی رویشگاه گونه‌های استفاده‌شدهٔ *Taxus*.

جداسازی قارچ‌های اندوفیت از کالوس ساقهٔ دو گونهٔ سرخدار: اغلب گیاهانی که تاکنون در اکوسیستم‌های طبیعی مطالعه شده‌اند، با گروهی از قارچ‌ها کلونیزه می‌شوند که نشانه‌های ظاهری مشخصی را در گیاهان ایجاد نمی‌کنند و به آنها اندوفیت گفته می‌شود (Schulz and Boyle, 2006; Hyde and Soytong, 2008). پس‌از گذشت بیش از سه هفته از کشت کالوس ساقه و برگ دو گونهٔ مطالعه‌شده، قارچ اندوفیت از روی کالوس در محیط‌کشت PDA ظاهر شد. تعداد ۹ کلنی قارچ اندوفیت از هر دو گونه جداسازی شد که ازنظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی ازجمله شکل کلنی، رنگ، حاشیهٔ کلنی، شکل هاگ‌های غیرجنسی مانند ساختار کنیدی و کنیدیفور و سرعت رشد کاملاً باهم متفاوت بودند (شکل‌های ۱ تا ۶).

قارچ‌های رشدکرده از کالوس: ظهور اندوفیت از کالوس‌های یک‌ماهه، دوماهه و سه‌ماهه در محیط B5 و همچنین در محیط PDA مشاهده شد. همان‌طور که در جدول ۲ و شکل ۱ آمده است، تمام قارچ‌ها بدون استثنا از کالوس ظاهر شدند و رشد آنها کند بود که از مشخصه‌های مهم قارچ‌های اندوفیت است. از ۹ کلنی قارچی مشاهده‌شده، ۴ کلنی از ساقهٔ *T. baccata*، ۱ کلنی از برگ *T. baccata* و ۴ کلنی از ساقهٔ *T. brevifoli* جداسازی شدند.

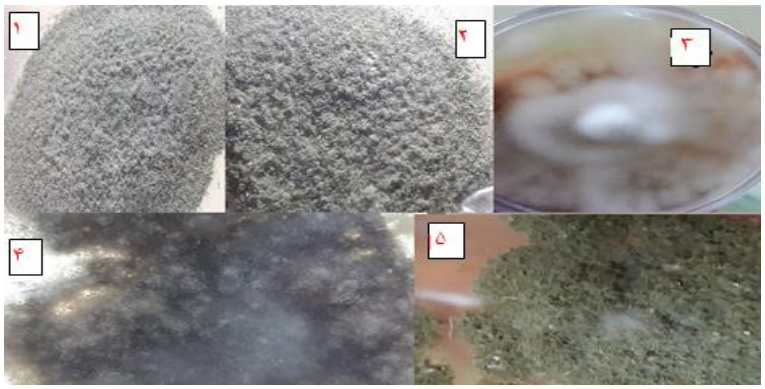
جدول ۲- قارچ‌های شناسایی‌شده از کالوس ساقه و برگ هر دو گونهٔ سرخدار

Aspergillus flavus	این کلنی در ۴ کالوس با تیمارهای هورمونی مختلف از ساقهٔ گونهٔ *T.baccata* مشاهده شد.
میسیلیوم عقیم	از برگ گونهٔ *T.baccata*
Paraphoma sp	این کلنی در ۴ کالوس با تیمارهای هورمونی مختلف از ساقهٔ گونهٔ *T. brevifolia* به‌شکل پیکنیدیوم مشاهده شد.

شکل ۱- ظهور اندوفیت قارچی از کالوس دو گونهٔ سرخدار در شرایط *درون‌شیشه‌ای*؛ شمارهٔ ۱. قارچ رشدکرده از کالوس برگ *T. baccata*، شماره‌های ۲ و ۳. قارچ رشدکرده از کالوس ساقهٔ *T. baccata* با تیمارهای هورمونی مختلف، شماره‌های ۴، ۵ و ۶. قارچ رشدکرده از کالوس ساقهٔ *T. brevifolia* با تیمارهای هورمونی مختلف

قارچ‌های جداسازی‌شده از کالوس گونهٔ *T. baccata* در محیط PDA: قارچ‌های اندوفیت رشدکرده از کالوس *T. baccata* طی سه مرحله به روش نوک هیف روی محیط PDA خالص‌سازی شدند. در شکل ۲، تصاویر ماکروسکوپی نمونه‌های قارچی جداسازی‌شده از *T. baccata* آمده است.

شناسایی نمونه بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناختی و تطبیق با کلید Ellis (۱۹۷۱) انجام شد. در شناسایی اولیهٔ این قارچ‌ها که باتوجه‌به ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تصاویر ماکروسکوپی آنها انجام شد، بخش اعظمی از آنها به *Aspergillus flavus* تعلق یافتند.



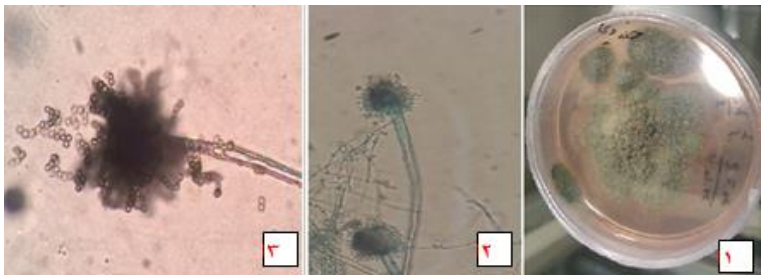
شکل ۲- قارچ‌های خالص‌سازی‌شده از ساقه و برگ گونهٔ *T. baccata*؛ ۱. قارچ رشدکرده در تیمار ۱ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین از ریزنمونهٔ ساقه، ۲. قارچ رشدکرده در تیمار ۳ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین از ریزنمونهٔ ساقه، ۳. قارچ رشدکرده در تیمار ۲ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین از ریزنمونهٔ برگ، ۴. قارچ رشدکرده در تیمار ۳ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین از ریزنمونهٔ ساقه، ۵. قارچ رشدکرده در ۱ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین از ریزنمونهٔ ساقه

***Aspergillus flavus*:** کلنی *آسپرژیلوس* جداسازی‌شده از کالوس ساقهٔ *T. baccata* (شکل ۳) روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به رنگ سبز مشاهده شد. کنیدیفورها به‌طور عمودی منفرد از میسلیوم خارج شده بودند و در نزدیکی نوک انشعاب داشتند. کنیدیفورها به‌طور ماکرونماتوس و دارای سلول پایهٔ کنیدیفور با ابعاد ۱ تا ۱/۵ میلی‌متر بودند. کنیدیفورها صاف و بی‌رنگ بودند و گاهی اوقات در نوک قهوه‌ای‌رنگ، وزیکول‌های کروی یا گرزی‌شکل به ابعاد ۲۰ تا ۵۰ میکرومتر داشتند. کنیدیوم‌ها تک‌سلولی، گرد، آکروژن و به‌شکل توده‌های رنگی متفاوت در زنجیره‌های پاسیپتال و صاف تا زبر مشاهده شدند.

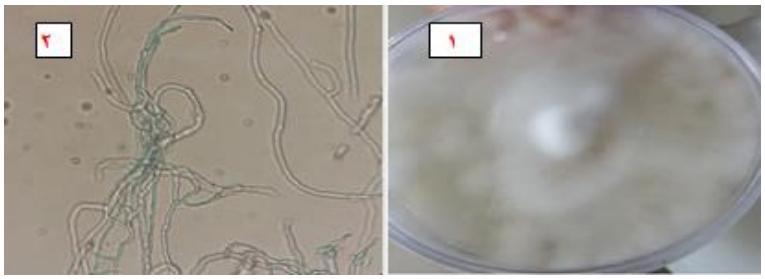
میسیلیوم عقیم: میسیلیوم عقیم جداشده از کالوس برگ گونهٔ *T. baccata* (شکل ۴) روی محیط‌کشت PDA به رنگ سفید و پنبه‌ای، دارای رشد سریع، در برخی مناطق نازک، شفاف و سفید مشاهده شد. میسیلیوم دارای دیوارهٔ نازک، شفاف، منشعب و به قطر ۲ تا ۴/۸ میکرومتر بود و اسپوری روی محیط‌کشت مشاهده نشد.

قارچ‌های جداسازی‌شده از کالوس گونهٔ *T. brevifolia* در محیط PDA: قارچ‌های اندوفیت رشدکرده از کالوس گونهٔ *T. brevifolia* طی سه

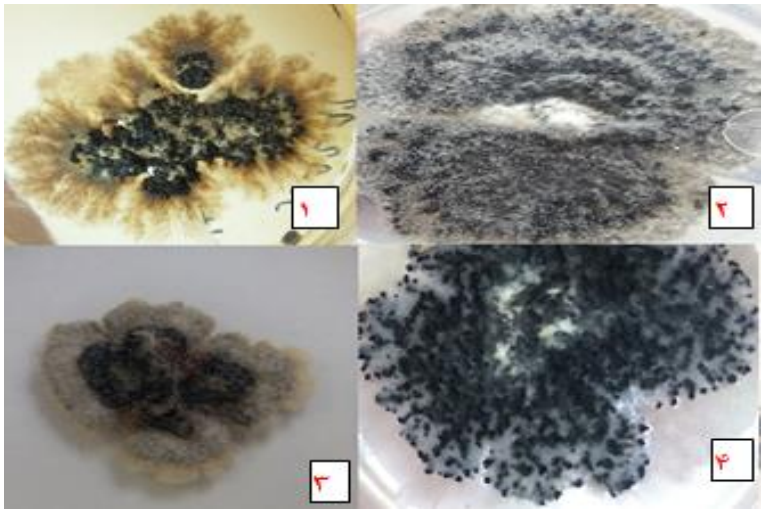
مرحله به روش نوک هیف روی محیط PDA خالص‌سازی شدند. در شکل ۵، تصاویر ماکروسکوپی نمونه‌های قارچی جداسازی‌شده از گونهٔ *T. brevifolia* آمده است. شناسایی نمونه بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناختی و تطبیق با کلید Ellis (۱۹۷۱) انجام شد. در شناسایی اولیهٔ این قارچ‌ها که باتوجه‌به ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تصاویر ماکروسکوپی آنها انجام شد، همهٔ قارچ‌های جداسازی‌شده از این گونهٔ سرخدار حالت پیکنیدیوم داشتند.



شکل ۳- ۱. کلنی قارچ *Aspergillus flavus* روی محیط کشت PDA، **۲.** مشاهدهٔ کنیدیفور، **۳.** کنیدیوم با بزرگ‌نمایی ۴۰۰×

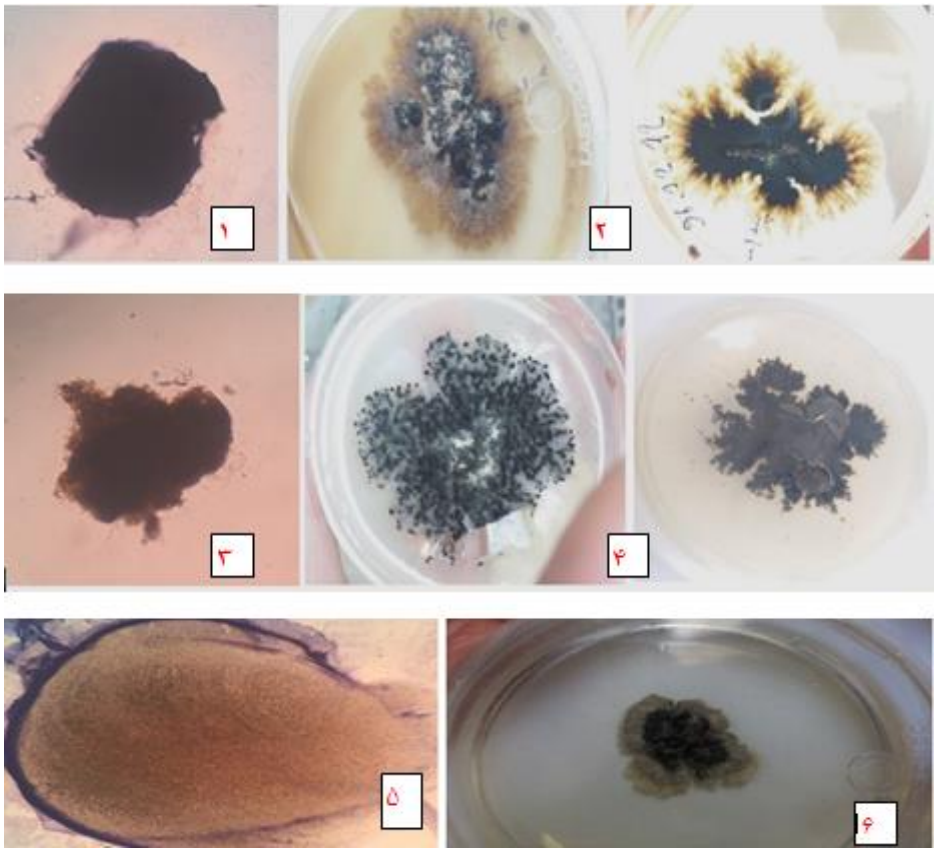


شکل ۴- ۱. کلنی قارچ روی محیط کشت PDA، ۲. هیف



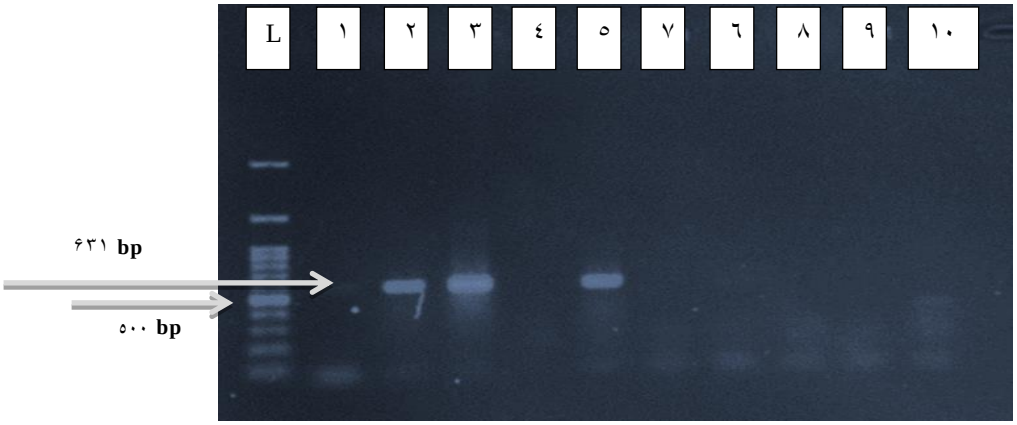
شکل ۵- قارچ‌های جداسازی‌شده از کالوس ساقهٔ گونهٔ *T. brevifolia*؛ ۱. قارچ رشدکرده در تیمار ۲ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین از ریزنمونهٔ ساقه، ۲. قارچ رشدکرده در تیمار ۱ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین از ریزنمونهٔ ساقه، ۳: قارچ رشدکرده در تیمار ۲ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۲ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین از ریزنمونهٔ ساقه، ۴. قارچ رشدکرده در تیمار ۳ میلی‌گرم‌درلیتر 2,4-D و ۰/۵ میلی‌گرم‌درلیتر کینتین از ریزنمونهٔ ساقه

***Paraphoma* sp.:** جمعیت غالب قارچی جداسازی‌شده از کالوس گونهٔ *T. brevifolia* از نوع پیکنیدیوم بود. اندوفیت جداسازی‌شده از کالوس ساقهٔ گونهٔ *T. brevifolia* در محیط‌کشت PDA پس‌از گذشت ۱۴ روز به رنگ طوسی خاکستری با کنیدیوم‌های شفاف و به رنگ روشن، تک‌سلولی، استوانه‌ای‌شکل و به طول ۴/۵ تا ۵/۵ میکرومتر و عرض ۱/۵ تا ۲ میکرومتر مشاهده شد. پیکنیدیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای تیره، گلابی‌شکل، دارای دیوارهٔ سودوپارانشیمی و به عرض ۱۵۰ تا ۳۵۰ و طول ۱۵۷ تا ۳۵۵ میکرومتر بودند (Boerema *et al*., 2004).

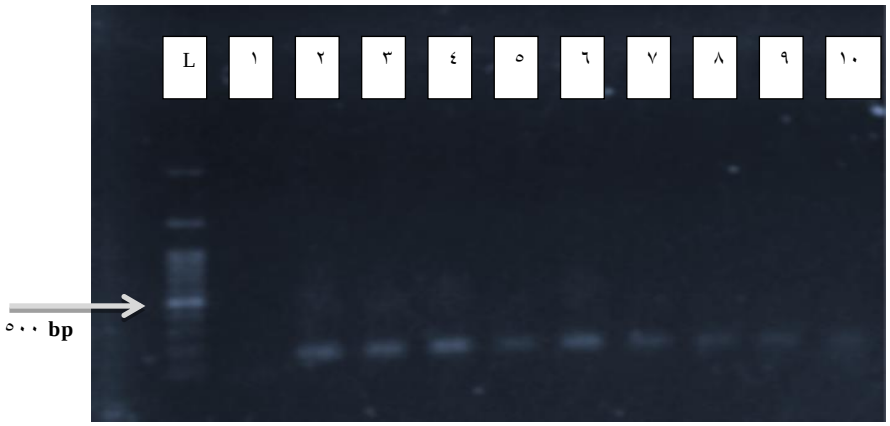


شکل ۶- ۲، ۴ و ۶. کلنی قارچ اندوفیت روی محیط PDA، ۱ و ۳. پیکنیدیوم بالغ، ۵. پیکنیدیوم نارس

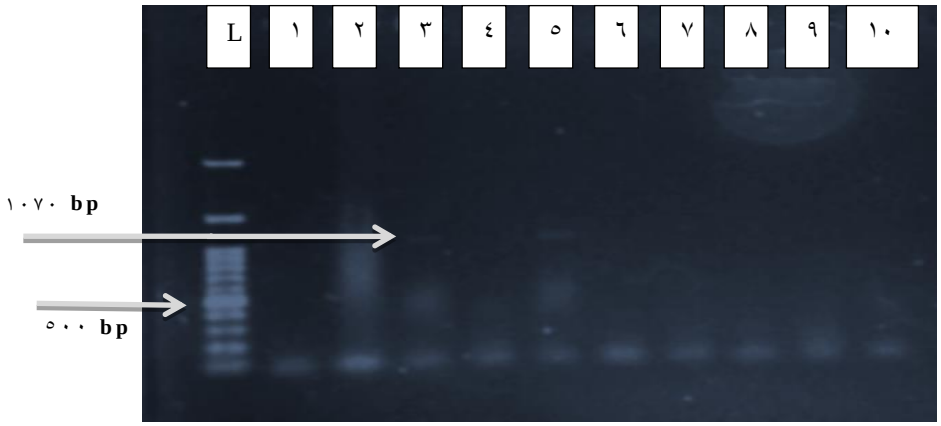
ردیابی ژن‌های مرتبط با بیوسنتز پاکلی‌تاکسل در قارچ‌های اندوفیت جداسازی‌شده: همان‌طور که در شکل ۷ دیده می‌شود، قارچ‌های اندوفیت جداسازی‌شده از کالوس دارای ژن‌های دخیل در بیوسنتز پاکلی‌تاکسل نبودند. نبود امکان ردیابی تاکسل در نمونه‌های اندوفیتی جداسازی‌شده در پژوهش حاضر بیان‌کنندهٔ غیرمولدبودن اندوفیت‌های جداسازی‌شده است؛ هرچند اندوفیت‌ها بر حسب وظایف متفاوتی که در گیاه میزبان دارند، تقسیم‌بندی می‌شوند و صِرف اندوفیت‌بودن، دلیلی بر مولدبودن آنها نیست؛ نکته‌ای که در بررسی‌های قبلی نیز به آن اشاره شده است (Zhang *et al*., 2008).



شکل ۷- ژن *bapt*؛ L. خط‌کش زیستی، ۱ و ۲. DNA استخراج‌شده از نمونهٔ گیاهی، ۳ و ۴. DNA استخراج‌شده از کالوس برگ گونهٔ *T. baccata*، ۵. DNA استخراج‌شده از کالوس برگ گونهٔ *T. brevifolia*، ۶ تا ۱۰. DNA استخراج‌شده از قارچ‌های اندوفیت حاصل از کالوس



شکل ۸- ژن *bapt*؛ L. خط‌کش زیستی، ۱ و ۲. DNA استخراج‌شده از نمونهٔ گیاهی، ۳ و ۴. DNA استخراج‌شده از کالوس برگ گونهٔ *T. baccata*، ۵. DNA استخراج‌شده از کالوس برگ گونهٔ *T. brevifolia*، ۶ تا ۱۰. DNA استخراج‌شده از قارچ‌های اندوفیت حاصل از کالوس

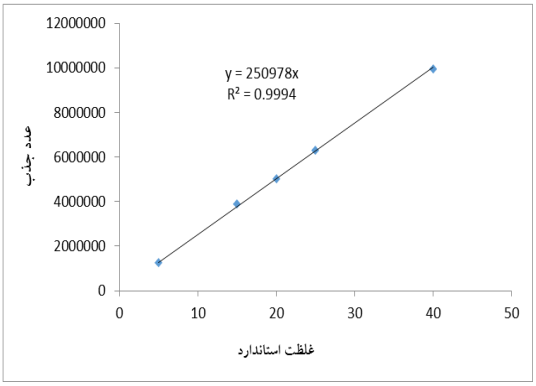


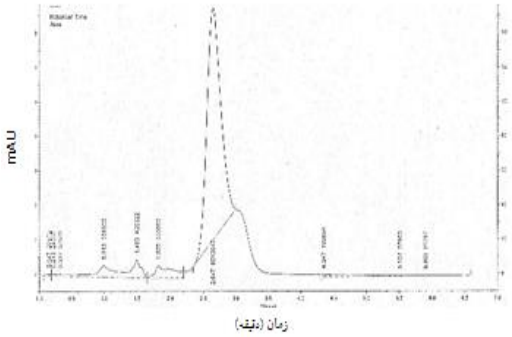
شکل ۹- ژن *TS*؛ L. خط‌کش زیستی، ۱ و ۲. DNA استخراج‌شده از نمونهٔ گیاهی، ۳. DNA استخراج‌شده از کالوس برگ گونهٔ *T. baccata*، ۴. DNA استخراج‌شده از کالوس ساقهٔ گونهٔ *T. baccata*. ۵، DNA استخراج‌شده از کالوس برگ گونهٔ *T. brevifolia*، ۶ تا ۱۰. DNA استخراج‌شده از قارچ‌های اندوفیت حاصل از کالوس

اندازه‌گیری پاکلی‌تاکسل: با تجزیه‌وتحلیل کروماتوگرام حاصل از HPLC، کالوس ساقهٔ گونه‌های *T. baccata* و *T. brevifolia* و محاسبهٔ داده‌های مرتبط، اختلاف معناداری بین ساقه و برگ گونهٔ *T. brevifolia* مشاهده نشد. میزان پاکلی‌تاکسل ساقه ۶/۹ و میزان آن در برگ ۱۰/۱ میکروگرم‌برگرم بود. میزان پاکلی‌تاکسل موجود در کالوس گونهٔ *T. baccata* ۳۳/۴ میکروگرم‌برگرم و بیشتر از ساقه و برگ گونهٔ *T. brevifolia* بود (شکل ۱۱). Ahadi و همکاران (۲۰۱۳) بیان کردند گونهٔ *T. baccata* توانایی بیشتری در تولید پاکلی‌تاکسل نسبت به گونهٔ *T. brevifolia* دارد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

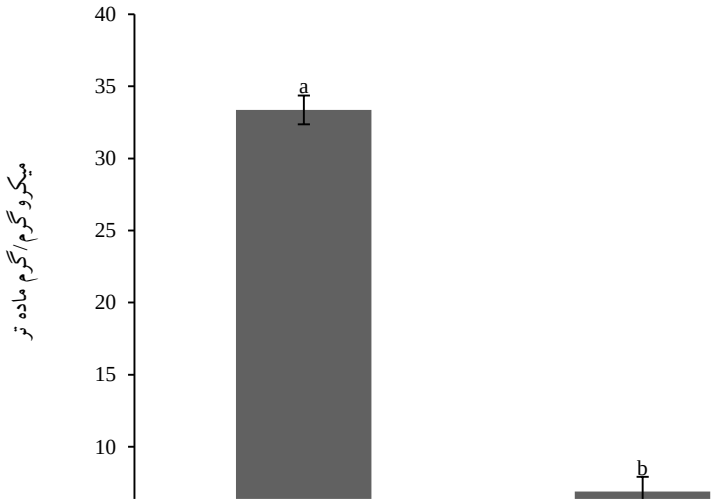
باتوجه‌به اینکه سرعت تولید متابولیت‌های ثانویه در طبیعت تحت‌تأثیر عوامل مختلفی قرار دارد، استفاده از روش‌های زیست‌فناوری در شرایط *درون‌شیشه‌ای* موقعیتی را فراهم می‌کند تا تولید در شرایط کنترل‌شده و زمان کمتر انجام شود (Shirazi *et al.*, 2013)؛ در این زمینه، توسعهٔ سیستم‌های سریع کشت و تکثیر *درون‌شیشه‌ای* فرصت بی‌نظیری برای تولید محصولات مختلف متابولیت ثانویه در آزمایشگاه و بدون نیاز به محدودیت زمانی، زمین قابل‌کشت و عرصه‌های جنگل‌کاری است. اصولاً ساده‌ترین روش دستیابی به پاکلی‌تاکسل، استخراج آن از منابع گیاهی است (Khosroushahi *et al.*, 2006).

درختان چندساله برای استخراج پاکلی‌تاکسل مناسبند، اما محدودبودن تعداد درختان و کم‌بودن عملکرد این روش به‌علت مقدار اندک پاکلی‌تاکسل موجود در آنها به نابودی این منابع گیاهی منجر می‌شود (Khosroushahi *et al.*, 2006)؛ ازاین‌رو، کشت بافت و سلول سرخدار و اندوفیت‌های مولد پاکلی‌تاکسل آن از مهم‌ترین روش‌های تولید پاکلی‌تاکسل به شمار می‌آید (Abasi *et al.*, 2011)؛ زیرا جداسازی پاکلی‌تاکسل و دیگر تاکسوئیدهای مفید از کشت سلولی گیاه سرخدار نسبت به جداسازی آنها از بافت‌های طبیعی به مراحل کمتری نیاز دارد و میزان ترکیبات تداخل‌کننده در سلول‌های حاصل از کشت سلولی کمتر است (Ketchum and Croteau., 1998).





شکل ۱۰- منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق استاندارد تاکسل (راست)، کروماتوگرام حاصل از تزریق استاندارد پاکلی‌تاکسل (چپ)



شکل ۱۱- نتایج مقایسه میانگین میزان پاکلی‌تاکسل در کالوس نمونه‌های برگ گونهٔ *T. brevifolia* و ساقهٔ گونه‌های *T. baccata* و *T. brevifolia* در سه تکرار. حرف‌های مشابه، وجودنداشتن تفاوت معنادار بین سطوح تیماری را در سطح ۵ درصد نشان می‌دهند.

جمع‌بندی

از ۹ اندوفیت یافت‌شده، تنها *A. flavus* با ویژگی‌های شاخص کنیدی، سلول فیالید و کنیدیفور شناسایی شد و سایر نمونه‌های قارچی مشاهده‌شده اسپور نداشتند یا حالت پیکنیدیوم داشتند. ردیابی اندوفیت در کالوس سرخدار که برای نخستین‌بار گزارش می‌شود، نقطهٔ عطفی در درک بهتر جایگاه میزبان و اندوفیت در تولید متابولیت ارزشمند پاکلی‌تاکسل است. باتوجه‌به ارزش دارویی زیاد پاکلی‌تاکسل و هزینهٔ زیاد تهیهٔ آن برای بیماران سرطانی، شناسایی منابع جدید ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای فراهم‌کردن امکانات لازم برای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

Abasi, A., Mofid, M. and Otreshi, M. (2011) Study of the effect of base culture medium on the production of *Taxus baccata* L. anticancer drug in culture of yeast cell suspension. Journal of Plant Breeding 12(4): 83-88 (in Persian).

Ahadi, H., Mirjalili, M. H., Farzaneh, M., shirshekan, M. and Ghassempour, A. (2013) Quantification of taxol in wild mature and in vitro cell suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus berevifolia*. 2th National Congress on Medicinal Plants, Tehran, Iran (in Persian).

Baloglu, E. and Kingston, D. G. (1999) The taxane diterpenoids. Journal of Natural Products 62(10): 74-1448.

Boerema, G. H., de Gruyter, J., Noordeloos, M. E. and Hamers, M. E. C. (2004) Phoma identification manual differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI Pub.

Bourgaud, F., Gravot, A. and Goniter, E. (2002) Production of plant secondary metabolites. Plant Science 161: 839-851.

Ellis, M. B. (1971) Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

Evans, W. C. (2002) Trease and evans pharmacognosy. W. B. Saunders, Edinburgh, London, New York.

Expósito, O., Bonfill, M., Moyano, E., Onrubia, M., Mirjalili, M., Cusido, R. and Palazon, J. (2009) (2009) Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. Anticancer Agents in Medicinal Chemistry- Anti Cancer Agents 9(1): 109-121.

Ghassempour, A., Rezadoost, H., Ahmadi, M. and Aboul-Enein, H. Y. (2009) Seasons study of four important taxanes and purification of 10-deacetylbaccatin III from the needles of *Taxus baccata* L. by two-dimensional liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 32(10): 1434-144

Hyde, K. D. and Soytong, K. (2008) The fungal endophyte dilemma. Fungal Diversity 33: 163-173.

Itokawa, H. and Lee, K. H. (2002) Taxus: the genus *Taxus*. Taylor and Francis, London and New York.

Jennewein, S. and Croteau, R. (2001) Taxol biosynthesis, molecular genetics and biotechnological applications. Applied Microbiology and Biotechnology 57(1-2): 9-13.

Karimian, R., Lahouti, M. and Davarpanah, S. J. (2015) Effects of different concentrations of 2,4-D and kinetin on callogenesis of *Taxus brevifolia* Nutt. Journal of Applied Biotechnology Reports 1(4): 167-170.

Ketchum, R. B. E. and Croteau, R. (1998) Recent progress toward an understanding of taxol biosynthesis in plant cell cultures. Elsevier Science, Amsterdam.

Khosroushahi, A. Y., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M. R. and Omidi, Y. (2006) Improved taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. Cell Biology International 30(3): 262-269.

Lesani, M. R. (1999) Yew. Mministry of Jahad-e-Sazandegi Pub, Tehran (in Persian).

Miller, R. W. and Brief, A. (1980) Survy of taxus alkaloids and other taxane derivatives. Journal of Natural Products 43: 425-437.

Mossadegh, A. (1993) Yew tree. Research Report of University of California, Berkeley.

Rao, R. S. and Ravishankar, G. A. (2002) Plant tissue cultures, chemical factories of secondary metabolites. Biochemistry and Pharmacology 20: 101-153.

Schulz, B. and Boyle, C. (2006) What are endophytes. In: Microbial root endophytes (Eds. Schulz, B., Boyle, C. and Seiber, T.) 1-13. Springer, Berlin.

Shirazi, Z., Piri, Kh., Mirzaiy asl, A., Hasanlo, T. and Ghiasond, T. (2013) The effect of salicylic acid and methyl jasmonate acid on the productivity of glycyrrhizin and isolucoetiline in *Glycyrrhiza glabra* L. Root. Journal of Plant Breeding (Iranian Journal of Biology) 27(3): 449-440 (in Persian).

Sinha, R. and Vidyarthi, A. S. (2011) A molecular docking study of anticancer drug paclitaxel and its analogues. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics 48(2): 101-105.

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

Wang, J. F., Li, G. L., Lu, H. Y., Zheng, Z. H., Huang, Y. J. and Su, W. J. (2000) Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5 an endophytic fungus of *Taxus mairei*. FEMS Microbiology Letters 193(2):

249-253,

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P. and McPhail, A. T. (1971) Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxo. a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. Journal of the American Chemical Society 93(9): 2325-2327.

Weber, D. (2009) Endophytic fungi, occurrence and metabolites. In: The Mycota, Vol. XV, Physiology and genetics selected basic and applied aspects (Eds. Anke, T. and Weber, D.). 153-195. Springer-Verlag, Berlin.

Woods, M. C., Nakanishi, K. and Bhacca, N. S. (1996) The NMR Spectra of taxinine and its derivatives. Tetrahedron 22: 243-260.

Yarikhosroshahi, A. (2004) Investigating the response to tissue culture in the yew and the amount of taxol produced in *in vitro* conditions. MSc thesis, Tabriz University, Tabriz, Iran (in Persian).

Zhang, P., Zhou, P-p., Jiang, C., Yu, H. and Yu, L-j. (2008) Screening of taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*. Biotechnology Letters 30(12): 2119-2123.