

Taxol production by endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*

Rahimi N (MSc)¹, Nazeri S (PhD)^{1*}, Mirzaei S (PhD)²

1- Department of Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2- Department of Plant Pathology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received:, Accepted:

Abstract

Background: Taxol is a diterpenoid compound that was first isolated from yew tree (*Taxus brevifolia*) and later from other plants such as *Corylus avellana*. Studies have shown that some of the endophytic fungi isolated from these plants are also capable of producing taxol. DBAT gene is one of the key genes in taxol biosynthesis pathway that catalyzes the synthesis of Baccatin III, one of the main precursors in taxol biosynthesis. The aim of this study was to investigate taxol production by endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*.

Materials and Methods: In this case-control study, endophytic fungi were isolated from hazelnut trees in the Fandoghlo area, Ardabil province, and purified through hyphal tip method. Genomic DNA was extracted using CTAB method. The presence of DBAT gene was examined by polymerase chain reaction (PCR). Taxol production in fungal media was investigated via TLC (Thin Layer Chromatography) method.

Results: After purification, 60 fungi were isolated from different organs of hazelnut trees and the presence of DBAT genes in 12 isolates was proved by PCR with specific primers. Investigation of taxol production in culture of these isolates showed that 7 isolates were capable of producing taxol in laboratory conditions.

Conclusion: A group of endophytic fungi isolated from hazelnut, grown in the North West of Iran, had DBAT gene, encoding a key enzyme in the taxol biosynthesis pathway, and some were able to produce taxol in vitro.

Keywords: Baccatin III, *Corylus avellana*, taxol, endophytes

*Corresponding author:

Address: Department of Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Email: snblnazeri@yahoo.com

تولید داروی ضد سرطان تاکسول در قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از فندق (*Corylus avellana*)

نوشین رحیمی¹، سنبلی ناظری^{2*}، سهیلا میرزایی³

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

2- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

3- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: 91/10/11 تاریخ پذیرش: 92/2/4

چکیده

زمینه و هدف: تاکسول یک ترکیب دی‌ترپنوئیدی است که اولین بار از درخت سرخدار و سپس از درختان دیگر مانند فندق جداسازی شد. تحقیقات نشان داده است که برخی قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از این گیاهان نیز قادر به تولید تاکسول هستند. ژن *DBAT* یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است که تشکیل باکاتین III، یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول را کاتالیز می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی تولید تاکسول توسط قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه فندق بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، قارچ‌های اندوفیت از درختان فندق در منطقه فندق‌لو واقع در استان اردبیل، جداسازی و به روش نوک‌هیف خالص‌سازی شدند. DNA ژنومی قارچ‌های اندوفیت به روش CTAB، استخراج شد. حضور ژن *DBAT* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد آزمایش قرار گرفت. تولید تاکسول در محیط‌های کشت قارچی، به روش کروماتوگرافی لایه نازک بررسی گردید.

یافته‌ها: پس از خالص‌سازی، 60 قارچ از اندام‌های مختلف درختان فندق جداسازی گردید. حضور ژن *DBAT* در 12 ایزوله با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط PCR به اثبات رسید. بررسی تولید تاکسول در کشت این ایزوله‌ها، نشان داد که 7 ایزوله توانایی تولید تاکسول را در شرایط آزمایشگاهی داشتند.

نتیجه‌گیری: گروهی از قارچ‌های اندوفیت جدا شده از فندق، رویش یافته در شمال غرب ایران، حاوی ژن *DBAT*، ژن مولد آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی، بودند و از آن میان تعدادی در شرایط آزمایشگاهی قادر به تولید تاکسول بودند.

واژگان کلیدی: اندوفیت‌ها، باکاتین III، تاکسول، فندق، قارچ

*نویسنده مسئول: همدان، انتهای بلوار آزادگان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، گروه بیوتکنولوژی

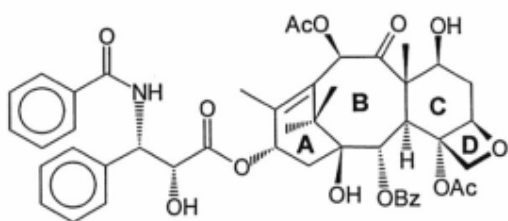
Email: snblnazeri@yahoo.com

مقدمه

ترکیبات طبیعی به خصوص ترکیبات گیاهی، صدها سال است که برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرطان یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین بیماری‌ها در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است (1). امروزه شیمی‌درمانی به عنوان یکی از روش‌های اصلی در درمان سرطان استفاده می‌شود. در این روش انواع داروهای ضد سرطان به تنهایی و یا به صورت ترکیب با عوامل دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند (2). تاکسول یک آلکالوئید گیاهی با ساختار شیمیایی بسیار پیچیده و یکی از موثرترین داروهای ضد سرطان است که امروزه به عنوان یکی از محبوب‌ترین داروها در شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (3). این ترکیب در برابر گستره وسیعی از انواع تومورها از جمله سرطان سینه، رحم، معده و سرطان سر و گردن موثر است. تاکسول هم‌چنین به عنوان یک عامل ضد میکروتوبولی در برابر سارکومای کاپوزیس وابسته به ایدز، فعال شناخته شده است (4). با وجود آن که بسیاری از داروهای ضد سرطان که امروزه در دسترس هستند، از عوارض جانبی بالایی برخوردار بوده و در عین حال در برابر تعداد زیادی از سرطان‌ها موثر نیستند، تاکسول در مقایسه با دیگر ترکیبات مشابه بر روی سلول‌های سرطانی اثر منحصر به فردی دارد. این دارو با اتصال به میکروتوبول‌ها، باعث افزایش تجمع و اتصال توبولین‌ها و به دنبال آن تشکیل میکروتوبول‌های پایدار می‌گردد. بر این اساس تاکسول به عنوان یک داروی آنتی‌میتوتیک، شناخته شده است (5).

این ترکیب آلکالوئیدی دی‌ترپنوییدی اولین بار در سال 1971 از پوست درخت سرخدار (Taxus brevifolia) جداسازی و استخراج شد و پس از آن در قارچ‌های اندوفیت هم زیست با آن نیز یافت شد (6). دی‌ترپنوییدها ترکیبات طبیعی هستند با اسکلت 20 کربنی که از ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات مشتق می‌شوند و تاکسول یکی از معروف‌ترین و شناخته شده‌ترین اعضای این گروه است (شکل 1) (7). مسیر بیوسنتزی این ماده شامل 20 مرحله‌ی آنزیمی است (8)، که از این میان ژن DBAT

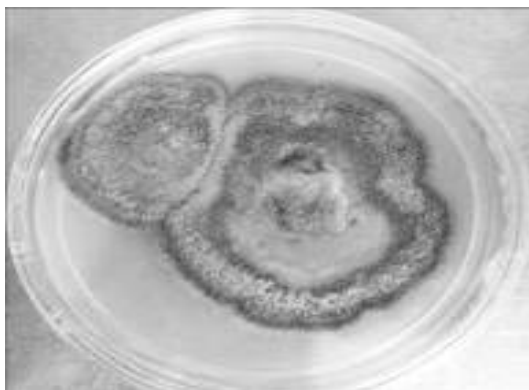
یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول، شناسایی و توالی‌یابی شده است. آنزیم DBAT (10- deacetylbaccatinIII - 10 - O - acetyl transferase) تولید باکاتین III را با استیله کردن گروه هیدروکسیل در موقعیت C10، کاتالیز می‌کند که این ماده یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است. امروزه تاکسول به صورت تجاری سنتز می‌شود. در صنعت از باکاتین III به عنوان پیش‌ماده‌ی اصلی در تولید این داروی با ارزش استفاده می‌شود (9).



شکل 1. ترکیب شیمیایی تاکسول

یکی از مشکلات اساسی در تولید تاکسول کند رشد بودن درخت سرخدار است و این که غلظت تاکسول در پوست آن پایین بوده و برای استخراج تاکسول به میزان کافی، گیاه باید به سن صد سالگی برسد (5). از طرف دیگر برای تامین تاکسول مورد نیاز برای هر بیمار سرطانی چندین کیلوگرم از پوست درخت سرخدار مورد نیاز است (10). به علت ارزش اقتصادی بالای تاکسول، کمبود درخت سرخدار، هزینه بالای سنتز آن و به دلیل تقاضای رو به رشد برای این دارو، منابع طبیعی دیگر جهت تولید این ترکیب مورد بررسی قرار گرفته‌اند (3). اولین بار لی و همکاران (11) گزارش کردند که علاوه بر سرخدار، گیاهان دیگر مانند سرو (Taxodium distichum) نیز این ترکیب تولید را می‌کنند. هافمن و همکاران (12) تاکسول و تاکسان‌های مربوط به آن را در شاخه، ساقه و برگ گیاه فندق (Corylus avellana) شناسایی و گزارش کردند. استیرل و همکاران (13)، تولید تاکسول را در محیط کشت قارچ اندوفیت Taxomyces andranae جداسازی شده از

Agar) انتقال داده شد. برای اطمینان از خالص سازی بیشتر این عمل حداقل سه بار تکرار شد.



شکل 2. رشد قارچ در محیط جامد PDA

جهت بررسی حضور ژن DBAT ابتدا از کلونی های قارچی سوسپانسیون تهیه شد. برای این منظور قطعات $0/5 \times 0/5$ سانتی متر مربع از کلونی های قارچی، داخل ارلن های 100 میلی لیتری که حاوی 50 میلی لیتر محیط PDA بود، قرار داده شدند. ارلن های حاوی نمونه بر روی شیکر با 120 دور بر دقیقه و در دمای 25 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میسلیوم ها توسط کاغذ صافی دو لایه از محیط فیلتر شده و DNA ژنومی آنها به روش CTAB جداسازی شد. در مرحله ی بعد حضور ژن DBAT توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز بررسی گردید. تکثیر PCR توسط پرایمرهای dbat-F و dbat-R بر اساس توالی حفاظت شده ی ژن DBAT (GenBank No. EF028093)،

به صورت dbat-F (5-
GGGAGGGTGCTCTGTTTG-3) و dbat-R (5-
GTTACCTGAACCACCAGAGG-3)، صورت
گرفت (16). یک واحد آنزیم DNA پلیمرز Taq (GeNet Bio)، به مخلوط واکنش (با حجم نهایی 25 میکرولیتر) اضافه گردید. مخلوط PCR به مدت 6 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی گراد و سپس 35 سیکل در 94 درجه سانتی گراد به مدت 60 ثانیه، 50 درجه سانتی گراد به مدت 50 ثانیه و 72 درجه سانتی گراد به مدت 80 ثانیه و در نهایت

گیاه T. breifolia گزارش کردند. اولین بار هافمن در سال 1998 تولید تاکسول را در قارچ های هم زیست گیاه فندق را گزارش کرد (12).

از آنجا که میکروارگانسیم ها به عنوان یکی از منابع اصلی تولید تاکسول محسوب می شوند و دارای ظرفیت بیولوژیکی بالایی برای تولید این داروی با ارزش ضد سرطان هستند (14)، در این تحقیق، جداسازی قارچ های اندوفیت مولد تاکسول از گیاه فندق (Corylus avellana)، فندق رویش یافته در منطقه ی فندقلو مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه در شهریور ماه 1391، با جمع آوری نمونه های گیاهی فندق (Corylus avellana) بومی منطقه ی غرب، جنگل فندقلو واقع در استان اردبیل، به روش مورد-شاهدی صورت گرفت و نمونه گیری از اندام های سالم (ساقه و برگ) و بدون شانه بیماری انجام شد. نمونه گیاهی پس از شستشو با آب جاری (جهت زدودن برخی از آلودگی های سطحی)، در زیر هود لامینار، در قطعات 1×1 سانتی متر مربع بریده شدند. قطعات فوق با استفاده از الکل 70 درصد (3 دقیقه)، به دنبال سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هیپوکلریت سدیم $1/5$ درصد (1 دقیقه) استریل شدند. پوست رویی نمونه ها توسط تیغ استریل جدا شده و پوست داخلی بر روی پتری های حاوی محیط عمومی قارچ ها PDA (Potato Dextrose Agar، شرکت مرک) قرار داده شد. پتری های حاوی نمونه گیاهی در شرایط تاریکی و در دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد تا زمان رشد قارچ نگهداری شدند (شکل 2). قارچ های رشد یافته در سطح نمونه ی گیاهی، توسط روش نوک هیف خالص سازی شدند (15)، به این صورت که یک هیف منفرد از کلونی قارچی جدا و به روی پتری حاوی PDA و WA (Water

آنالیز TLC بر روی عصاره‌های متانولی قارچ انجام گرفته و از تاکسول محلول در متانول به عنوان استاندارد استفاده گردید. از معرف وانیلین یک درصد برای شناسایی لکه تاکسول استفاده گردید.

یافته‌ها

از سطوح استریل قطعات شاخه و برگ فندق در محیط PDA، میسلیوم‌های قارچی ظاهر شدند که در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد به سرعت رشد کردند (شکل 4).



شکل 4. ظهور میسلیوم از سطح قطعات استریل سرشاخه درخت *Corylus avellana* در محیط کشت PDA.

در مرحله بعد DNA ژنومی به روش CTAB استخراج شد و خلوص آن توسط اسپکتروفوتومتری تایید گردید، در طول موج 260/280 نانومتر جذب آن نزدیک به 1/8 بود.

حضور ژن DBAT نیز با الکتروفورز DNA ایزوله‌های قارچی گیاه فندق، توسط پرابهای ژن DBAT، تشکیل یک قطعه 150 جفت بازی را نشان داد. از میان 60 ایزوله‌ی جداسازی شده، حضور این ژن در 12 ایزوله به اثبات رسید (شکل 5).



شکل 5. حضور قطعات 150 جفت باز ژن DBAT در PCR ایزوله‌های قارچی گیاه فندق

72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه انکوبه شد. با استفاده از دستگاه الکتروفورز (Bio Rad)، DNA در ژل آگارز یک درصد ران شده و باندها در زیر نور UV ظاهر گردیدند.

تهیه محیط عصاره‌گیری

برای عصاره‌گیری از قارچ‌ها از محیط PDB (Potato Dextrose Broth) استفاده شد. نمونه‌ها در ارزن‌های 250 میلی‌لیتر حاوی 150 میلی‌لیتر محیط عصاره‌گیری کشت و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی و تخمیری نگهداری شدند (شکل 3). پس از 21 روز، میسلیوم‌های قارچ از دو لایه کاغذ صافی عبور داده شدند. به محیط کشت، در حجم برابر، حلال دی‌کلرومتان اضافه گردید. سپس فاز آلی جدا و تحت فشار در محیط تاریکی در دمای 35 درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. باقیمانده در متانول حل شد و در دمای -20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل 3. رشد قارچ پس از 21 روز در محیط مایع PDB

کروماتوگرافی عصاره‌ها

آنالیز TLC بر روی پلیت‌های 20×20 سانتی‌متر مربع پوشیده از سیلیکاژل با قطر 0/25 میلی‌متر (شرکت مرک) انجام شد. در این آزمایش از پنج حلال کلروفرم، متانول، استونیتریل، اتیل استات و ایزوپروپانول استفاده شد (17).

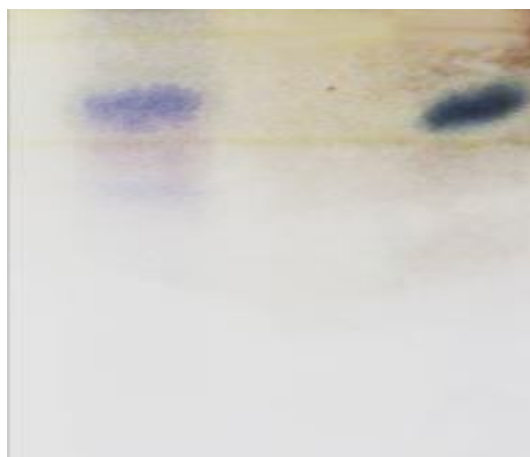
بیوسنتزی تاکسول، باکاتین III، را کاتالیز می‌کند، از ژن DBAT برای غربال‌گری قارچ‌های مولد تاکسول استفاده شد. ژانگ و همکاران جهت غربال‌گری قارچ‌های مولد تاکسول در ایزوله‌های اندوفیت گونه‌های سرخدار از این ژن به عنوان مارکر مولکولی استفاده کردند. این گروه از میان 90 ایزوله جداسازی شده، حضور ژن DBAT را در 15 ایزوله شناسایی کردند، که از میان آنها 3 ایزوله تاکسول تولید کردند (16).

در تحقیق حاضر از میان 12 ایزوله حاوی ژن DBAT، هفت ایزوله در محیط کشت خود تاکسول تولید کردند. روش‌های کروماتوگرافی از روش‌های معمول و قابل اعتماد در شناسایی حضور تاکسول است. اولین بار هافمن با استفاده از این روش تولید تاکسول را در قارچ‌های جدا شده از فندق شناسایی کرد (12). این روش در شناسایی اندوفیت‌های سایر درختان نیز مورد استفاده قرار گرفته است. ژانگ و همکاران تولید تاکسول در قارچ‌های ایزوله شده از گیاه Taxus را توسط روش‌های کروماتوگرافی به اثبات رساندند (16). چاکراواری و همکاران با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک حضور تاکسول را در محیط کشت قارچ *Fusarium solani* جدا شده از *Taxus celebica* نشان دادند (18). گانگادوی و موتوماری نیز از روش کروماتوگرافی برای شناسایی قارچ اندوفیت مولد تاکسول گیاه *Terminalia arjuna* استفاده کردند (10). عدم تشخیص تاکسول در محیط کشت پنج ایزوله دیگر می‌تواند به این علت باشد که در کشت 5 ایزوله دیگر، میزان تولید تاکسول به اندازه‌ای نبوده است که روش TLC آن را شناسایی کند، یا شرایط مورد آزمایش برای تولید تاکسول مناسب نبوده و یا این که ژن DABT در این ایزوله‌ها در مسیر بیوسنتزی دیگری شرکت داشته و در نتیجه ماده نهایی، ترکیبی غیر از تاکسول بوده است (16).

نتیجه‌گیری

از میان 60 ایزوله قارچی جداسازی شده از گیاه فندق منطقه شمال غربی ایران، 12 ایزوله دارای ژن DBAT

از آنجا که حضور این آنزیم در مسیر بیوسنتزی تاکسول ضروری می‌باشد، بنابر این احتمال تولید تاکسول در ایزوله‌هایی که به وسیله PCR ژن DBAT غربال شدند بیشتر بود. به همین علت، با استفاده از روش کروماتوگرافی، تولید تاکسول در محیط کشت این 12 ایزوله بررسی گردید. در پایان، پس از رنگ آمیزی، تولید تاکسول به صورت لکه‌های آبی رنگ بر روی صفحات کروماتوگرافی در عصاره هفت نمونه قارچی مشخص گردید، که پس از 24 ساعت به رنگ خاکستری تیره تغییر رنگ داد. این ترکیب همان ویژگی‌های مشخص کروماتوگرافی تاکسول استاندارد را داشت. در شکل 6 آنالیز TLC بر روی یکی از عصاره قارچی و تاکسول استاندارد نشان داده شده است که لکه تاکسول در نمونه قارچی و استاندارد دارای R_f های مشابه بودند.



شکل 6. عصاره متانولی حاصل از قارچ (خط 2) که شامل ترکیبی است که این ترکیب دارای R_f مشابه با محلول متانولی تاکسول استاندارد (خط 1) است

بحث

در تحقیق حاضر از میان 60 ایزوله، 12 ایزوله حاوی ژن DBAT بودند. روش PCR روشی سریع و اقتصادی برای شناسایی حضور ژن‌ها است (16)، به همین علت در این تحقیق از این روش جهت غربال‌گری اولیه ایزوله‌های مولد تاکسول استفاده گردید. با توجه به این که آنزیم DBAT سنتز یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر

8. Guo B, Kai G, Jin H, Tang K. Taxol synthesis. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5 (1): 015-20.

9. Walker KD, Klettke K, Akiyama T, Croteau R. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in Taxol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(52):53947-54.

10. Gangadevi V, Muthumary J. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2009;52(1):9-15.

11. Li J-y, Strobel G, Sidhu R, Hess W, Ford EJ. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*. 1996;142(8):2223-6.

12. Hoffman A, Khan W, Worapong J, Strobel G, Griffin D, Arbogast B, et al. Bioprospecting for Taxol in Angiosperm Plant Extracts-Using High Performance Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry to Detect the Anticancer Agent and its Related Metabolites in. *Spectroscopy-Eugene*. 1998;13(6):22-32.

13. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 1993;260(5105):214-6.

14. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal diversity*. 2010;41(1):1-16.

15. Miao Z, Wang Y, Yu X, Guo B, Tang K. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009;45(1):81-6.

16. Zhang P, Zhou P-p, Jiang C, Yu H, Yu L-j. Screening of Taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*. *Biotechnology letters*. 2008;30(12):2119-23.

17. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess W. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*. 1996;142(2):435-40.

Chakravarthi B, Das P, Surendranath K, Karande AA, Jayabaskaran C. Production of

و هفت ایزوله در شرایط آزمایشگاهی مولد تاکسول بودند. به دلیل ارزش بالای دارویی تاکسول و هزینه بالای تهیه آن برای بیماران سرطانی، شناسایی منابع جدید امری ضروری به نظر می‌رسد. نشان داده شده است که میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی بالقوه و بالایی برای تولید ترکیبات دارویی هستند (14). قارچ‌های اندوفیت همزیست فندق با توانایی تولید تاکسول می‌توانند به عنوان یک منبع جایگزین مناسب جهت تولید این داروی با ارزش به حساب آیند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان‌نامه با عنوان "تولید تاکسول و عوامل موثر در تولید آن در قارچ‌های اندوفیت گیاه فندق (*Corylus avellana*)" بوده و با حمایت مالی دانشگاه بو علی سینا انجام شده است.

منابع

1. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh journal of pharmacology*. 2006;1(2):35-41.

2. Siegel R, Jemal A. *Cancer Facts & Figures*. American Cancer Society. 2012; 404: 1-64.

3. Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili M, Cusido R, et al. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2009;9(1):109-21.

4. Sinha R, Vidyarthi AS. A molecular docking study of anticancer drug paclitaxel and its analogues. 2011; 48: 101-5.

5. Baloglu E, Kingston DG. The taxane diterpenoids. *Journal of natural products*. 1999;62(10):1448-72.

6. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 1971;93(9):2325-7.

7. Nguyen T. Paclitaxel; The Billion Dollar Natural Product. *Chemistry*. 2008.

2008;33(2):259-67

paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. Journal of biosciences.

Taxol production by endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*

Rahimi N (MSc)¹, Nazeri S (PhD)^{1*}, Mirzaei S (PhD)²

1- Department of Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2- Department of Plant Pathology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received:, Accepted:

Abstract

Background: Taxol is a diterpenoid compound that was first isolated from yew tree (*Taxus brevifolia*) and later from other plants such as *Corylus avellana*. Studies have shown that some of the endophytic fungi isolated from these plants are also capable of producing taxol. DBAT gene is one of the key genes in taxol biosynthesis pathway that catalyzes the synthesis of Baccatin III, one of the main precursors in taxol biosynthesis. The aim of this study was to investigate taxol production by endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*.

Materials and Methods: In this case-control study, endophytic fungi were isolated from hazelnut trees in the Fandoghlo area, Ardabil province, and purified through hyphal tip method. Genomic DNA was extracted using CTAB method. The presence of DBAT gene was examined by polymerase chain reaction (PCR). Taxol production in fungal media was investigated via TLC (Thin Layer Chromatography) method.

Results: After purification, 60 fungi were isolated from different organs of hazelnut trees and the presence of DBAT genes in 12 isolates was proved by PCR with specific primers. Investigation of taxol production in culture of these isolates showed that 7 isolates were capable of producing taxol in laboratory conditions.

Conclusion: A group of endophytic fungi isolated from hazelnut, grown in the North West of Iran, had DBAT gene, encoding a key enzyme in the taxol biosynthesis pathway, and some were able to produce taxol in vitro.

Keywords: Baccatin III, *Corylus avellana*, taxol, endophytes

*Corresponding author:

Address: Department of Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Email: snblnazeri@yahoo.com

تولید داروی ضد سرطان تاکسول در قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از فندق (*Corylus avellana*)

نوشین رحیمی¹، سنبلی ناظری^{2*}، سهیلا میرزایی³

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

2- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

3- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: 91/10/11 تاریخ پذیرش: 92/2/4

چکیده

زمینه و هدف: تاکسول یک ترکیب دی‌ترپنوئیدی است که اولین بار از درخت سرخدار و سپس از درختان دیگر مانند فندق جداسازی شد. تحقیقات نشان داده است که برخی قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از این گیاهان نیز قادر به تولید تاکسول هستند. ژن *DBAT* یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است که تشکیل باکاتین III، یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول را کاتالیز می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی تولید تاکسول توسط قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه فندق بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، قارچ‌های اندوفیت از درختان فندق در منطقه فندق‌لو واقع در استان اردبیل، جداسازی و به روش نوک‌هیف خالص‌سازی شدند. DNA ژنومی قارچ‌های اندوفیت به روش CTAB، استخراج شد. حضور ژن *DBAT* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد آزمایش قرار گرفت. تولید تاکسول در محیط‌های کشت قارچی، به روش کروماتوگرافی لایه نازک بررسی گردید.

یافته‌ها: پس از خالص‌سازی، 60 قارچ از اندام‌های مختلف درختان فندق جداسازی گردید. حضور ژن *DBAT* در 12 ایزوله با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط PCR به اثبات رسید. بررسی تولید تاکسول در کشت این ایزوله‌ها، نشان داد که 7 ایزوله توانایی تولید تاکسول را در شرایط آزمایشگاهی داشتند.

نتیجه‌گیری: گروهی از قارچ‌های اندوفیت جدا شده از فندق، رویش یافته در شمال غرب ایران، حاوی ژن *DBAT*، ژن مولد آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی، بودند و از آن میان تعدادی در شرایط آزمایشگاهی قادر به تولید تاکسول بودند.

واژگان کلیدی: اندوفیت‌ها، باکاتین III، تاکسول، فندق، قارچ

*نویسنده مسئول: همدان، انتهای بلوار آزادگان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، گروه بیوتکنولوژی

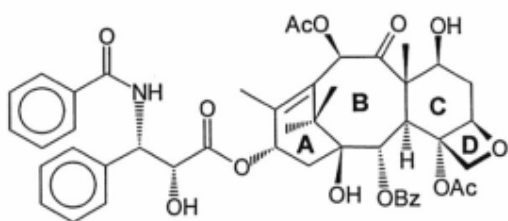
Email: snblnazeri@yahoo.com

مقدمه

ترکیبات طبیعی به خصوص ترکیبات گیاهی، صدها سال است که برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرطان یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین بیماری‌ها در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است (1). امروزه شیمی‌درمانی به عنوان یکی از روش‌های اصلی در درمان سرطان استفاده می‌شود. در این روش انواع داروهای ضد سرطان به تنهایی و یا به صورت ترکیب با عوامل دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند (2). تاکسول یک آلکالوئید گیاهی با ساختار شیمیایی بسیار پیچیده و یکی از موثرترین داروهای ضد سرطان است که امروزه به عنوان یکی از محبوب‌ترین داروها در شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (3). این ترکیب در برابر گستره وسیعی از انواع تومورها از جمله سرطان سینه، رحم، معده و سرطان سر و گردن موثر است. تاکسول هم‌چنین به عنوان یک عامل ضد میکروتوبولی در برابر سارکومای کاپوزیس وابسته به ایدز، فعال شناخته شده است (4). با وجود آن که بسیاری از داروهای ضد سرطان که امروزه در دسترس هستند، از عوارض جانبی بالایی برخوردار بوده و در عین حال در برابر تعداد زیادی از سرطان‌ها موثر نیستند، تاکسول در مقایسه با دیگر ترکیبات مشابه بر روی سلول‌های سرطانی اثر منحصر به فردی دارد. این دارو با اتصال به میکروتوبول‌ها، باعث افزایش تجمع و اتصال توبولین‌ها و به دنبال آن تشکیل میکروتوبول‌های پایدار می‌گردد. بر این اساس تاکسول به عنوان یک داروی آنتی‌میتوتیک، شناخته شده است (5).

این ترکیب آلکالوئیدی دی‌ترپنوییدی اولین بار در سال 1971 از پوست درخت سرخدار (Taxus brevifolia) جداسازی و استخراج شد و پس از آن در قارچ‌های اندوفیت هم زیست با آن نیز یافت شد (6). دی‌ترپنوییدها ترکیبات طبیعی هستند با اسکلت 20 کربنی که از ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات مشتق می‌شوند و تاکسول یکی از معروف‌ترین و شناخته شده‌ترین اعضای این گروه است (شکل 1) (7). مسیر بیوسنتزی این ماده شامل 20 مرحله‌ی آنزیمی است (8)، که از این میان ژن DBAT

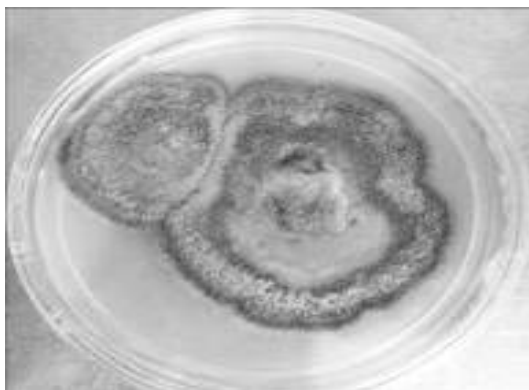
یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول، شناسایی و توالی‌یابی شده است. آنزیم DBAT (10- deacetylbaaccatinIII - 10 - O - acetyl transferase) تولید باکاتین III را با استیله کردن گروه هیدروکسیل در موقعیت C10، کاتالیز می‌کند که این ماده یکی از پیش سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است. امروزه تاکسول به صورت تجاری سنتز می‌شود. در صنعت از باکاتین III به عنوان پیش ماده‌ی اصلی در تولید این داروی با ارزش استفاده می‌شود (9).



شکل 1. ترکیب شیمیایی تاکسول

یکی از مشکلات اساسی در تولید تاکسول کند رشد بودن درخت سرخدار است و این که غلظت تاکسول در پوست آن پایین بوده و برای استخراج تاکسول به میزان کافی، گیاه باید به سن صد سالگی برسد (5). از طرف دیگر برای تامین تاکسول مورد نیاز برای هر بیمار سرطانی چندین کیلوگرم از پوست درخت سرخدار مورد نیاز است (10). به علت ارزش اقتصادی بالای تاکسول، کمبود درخت سرخدار، هزینه بالای سنتز آن و به دلیل تقاضای رو به رشد برای این دارو، منابع طبیعی دیگر جهت تولید این ترکیب مورد بررسی قرار گرفته‌اند (3). اولین بار لی و همکاران (11) گزارش کردند که علاوه بر سرخدار، گیاهان دیگر مانند سرو (Taxodium distichum) نیز این ترکیب تولید را می‌کنند. هافمن و همکاران (12) تاکسول و تاکسان‌های مربوط به آن را در شاخه، ساقه و برگ گیاه فندق (Corylus avellana) شناسایی و گزارش کردند. استیرل و همکاران (13)، تولید تاکسول را در محیط کشت قارچ اندوفیت Taxomyces andranae جداسازی شده از

Agar) انتقال داده شد. برای اطمینان از خالص سازی بیشتر این عمل حداقل سه بار تکرار شد.



شکل 2. رشد قارچ در محیط جامد PDA

جهت بررسی حضور ژن DBAT ابتدا از کلونی های قارچی سوسپانسیون تهیه شد. برای این منظور قطعات $0/5 \times 0/5$ سانتی متر مربع از کلونی های قارچی، داخل ارلن های 100 میلی لیتری که حاوی 50 میلی لیتر محیط PDA بود، قرار داده شدند. ارلن های حاوی نمونه بر روی شیکر با 120 دور بر دقیقه و در دمای 25 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میسلیوم ها توسط کاغذ صافی دو لایه از محیط فیلتر شده و DNA ژنومی آنها به روش CTAB جداسازی شد. در مرحله ی بعد حضور ژن DBAT توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز بررسی گردید. تکثیر PCR توسط پرایمرهای dbat-F و dbat-R بر اساس توالی حفاظت شده ی ژن DBAT (GenBank No. EF028093)،

به صورت dbat-F (5-
GGGAGGGTGCTCTGTTTG-3) و dbat-R (5-
GTTACCTGAACCACCAGAGG-3)، صورت
گرفت (16). یک واحد آنزیم DNA پلیمرز Taq
(GeNet Bio)، به مخلوط واکنش (با حجم نهایی 25
میکرولیتر) اضافه گردید. مخلوط PCR به مدت 6 دقیقه در
دمای 94 درجه سانتی گراد و سپس 35 سیکل در 94 درجه
سانتی گراد به مدت 60 ثانیه، 50 درجه سانتی گراد به مدت
50 ثانیه و 72 درجه سانتی گراد به مدت 80 ثانیه و در نهایت

گیاه T.breifolia گزارش کردند. اولین بار هافمن در سال 1998 تولید تاکسول را در قارچ های هم زیست گیاه فندق را گزارش کرد (12).

از آنجا که میکروارگانسیم ها به عنوان یکی از منابع اصلی تولید تاکسول محسوب می شوند و دارای ظرفیت بیولوژیکی بالایی برای تولید این داروی با ارزش ضد سرطان هستند (14)، در این تحقیق، جداسازی قارچ های اندوفیت مولد تاکسول از گیاه فندق (Corylus avellana)، فندق رویش یافته در منطقه ی فندقلو مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه در شهریور ماه 1391، با جمع آوری نمونه های گیاهی فندق (Corylus avellana) بومی منطقه ی غرب، جنگل فندقلو واقع در استان اردبیل، به روش مورد-شاهدی صورت گرفت و نمونه گیری از اندام های سالم (ساقه و برگ) و بدون شانه بیماری انجام شد. نمونه گیاهی پس از شستشو با آب جاری (جهت زدودن برخی از آلودگی های سطحی)، در زیر هود لامینار، در قطعات 1×1 سانتی متر مربع بریده شدند. قطعات فوق با استفاده از الکل 70 درصد (3 دقیقه)، به دنبال سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هیپوکلریت سدیم $1/5$ درصد (1 دقیقه) استریل شدند. پوست رویی نمونه ها توسط تیغ استریل جدا شده و پوست داخلی بر روی پتری های حاوی محیط عمومی قارچ ها PDA (Potato Dextrose Agar، شرکت مرک) قرار داده شد. پتری های حاوی نمونه گیاهی در شرایط تاریکی و در دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد تا زمان رشد قارچ نگهداری شدند (شکل 2). قارچ های رشد یافته در سطح نمونه ی گیاهی، توسط روش نوک هیف خالص سازی شدند (15)، به این صورت که یک هیف منفرد از کلونی قارچی جدا و به روی پتری حاوی PDA و WA (Water

آنالیز TLC بر روی عصاره‌های متانولی قارچ انجام گرفته و از تاکسول محلول در متانول به عنوان استاندارد استفاده گردید. از معرف وانیلین یک درصد برای شناسایی لکه تاکسول استفاده گردید.

یافته‌ها

از سطوح استریل قطعات شاخه و برگ فندق در محیط PDA، میسلیوم‌های قارچی ظاهر شدند که در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد به سرعت رشد کردند (شکل 4).



شکل 4. ظهور میسلیوم از سطح قطعات استریل سرشاخه درخت *Corylus avellana* در محیط کشت PDA.

در مرحله بعد DNA ژنومی به روش CTAB استخراج شد و خلوص آن توسط اسپکتروفوتومتری تایید گردید، در طول موج 260/280 نانومتر جذب آن نزدیک به 1/8 بود.

حضور ژن DBAT نیز با الکتروفورز DNA ایزوله‌های قارچی گیاه فندق، توسط پرابهای ژن DBAT، تشکیل یک قطعه 150 جفت بازی را نشان داد. از میان 60 ایزوله‌ی جداسازی شده، حضور این ژن در 12 ایزوله به اثبات رسید (شکل 5).



شکل 5. حضور قطعات 150 جفت باز ژن DBAT در PCR ایزوله‌های قارچی گیاه فندق

72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه انکوبه شد. با استفاده از دستگاه الکتروفورز (Bio Rad)، DNA در ژل آگارز یک درصد ران شده و باندها در زیر نور UV ظاهر گردیدند.

تهیه محیط عصاره‌گیری

برای عصاره‌گیری از قارچ‌ها از محیط PDB (Potato Dextrose Broth) استفاده شد. نمونه‌ها در ارزن‌های 250 میلی‌لیتر حاوی 150 میلی‌لیتر محیط عصاره‌گیری کشت و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی و تخمیری نگهداری شدند (شکل 3). پس از 21 روز، میسلیوم‌های قارچ از دو لایه کاغذ صافی عبور داده شدند. به محیط کشت، در حجم برابر، حلال دی‌کلرومتان اضافه گردید. سپس فاز آلی جدا و تحت فشار در محیط تاریکی در دمای 35 درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. باقیمانده در متانول حل شد و در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل 3. رشد قارچ پس از 21 روز در محیط مایع PDB

کروماتوگرافی عصاره‌ها

آنالیز TLC بر روی پلیت‌های 20×20 سانتی‌متر مربع پوشیده از سیلیکاژل با قطر 0/25 میلی‌متر (شرکت مرک) انجام شد. در این آزمایش از پنج حلال کلروفرم، متانول، استونیتریل، اتیل‌استات و ایزوپروپانول استفاده شد (17).

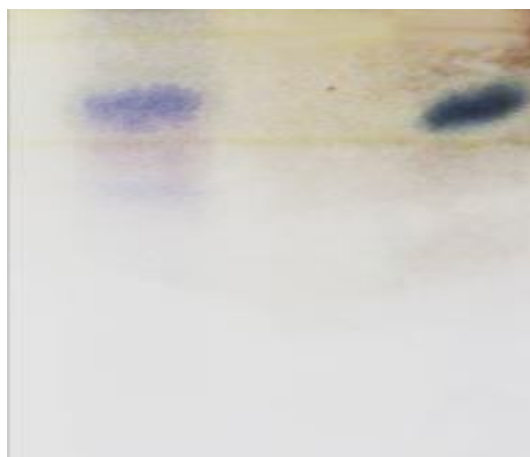
بیوسنتزی تاکسول، باکاتین III، را کاتالیز می‌کند، از ژن DBAT برای غربال‌گری قارچ‌های مولد تاکسول استفاده شد. ژانگ و همکاران جهت غربال‌گری قارچ‌های مولد تاکسول در ایزوله‌های اندوفیت گونه‌های سرخدار از این ژن به عنوان مارکر مولکولی استفاده کردند. این گروه از میان 90 ایزوله جداسازی شده، حضور ژن DBAT را در 15 ایزوله شناسایی کردند، که از میان آنها 3 ایزوله تاکسول تولید کردند(16).

در تحقیق حاضر از میان 12 ایزوله حاوی ژن DBAT، هفت ایزوله در محیط کشت خود تاکسول تولید کردند. روش‌های کروماتوگرافی از روش‌های معمول و قابل اعتماد در شناسایی حضور تاکسول است. اولین بار هافمن با استفاده از این روش تولید تاکسول را در قارچ‌های جدا شده از فندق شناسایی کرد(12). این روش در شناسایی اندوفیت‌های سایر درختان نیز مورد استفاده قرار گرفته است. ژانگ و همکاران تولید تاکسول در قارچ‌های ایزوله شده از گیاه Taxus را توسط روش‌های کروماتوگرافی به اثبات رساندند(16). چاکراواری و همکاران با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک حضور تاکسول را در محیط کشت قارچ Fusarium solani جدا شده از Taxus celebica نشان دادند(18). گانگادوی و موتوماری نیز از روش کروماتوگرافی برای شناسایی قارچ اندوفیت مولد تاکسول گیاه Terminalia arjuna استفاده کردند(10). عدم تشخیص تاکسول در محیط کشت پنج ایزوله دیگر می‌تواند به این علت باشد که در کشت 5 ایزوله دیگر، میزان تولید تاکسول به اندازه‌ای نبوده است که روش TLC آن را شناسایی کند، یا شرایط مورد آزمایش برای تولید تاکسول مناسب نبوده و یا این که ژن DBAT در این ایزوله‌ها در مسیر بیوسنتزی دیگری شرکت داشته و در نتیجه ماده نهایی، ترکیبی غیر از تاکسول بوده است(16).

نتیجه‌گیری

از میان 60 ایزوله قارچی جداسازی شده از گیاه فندق منطقه شمال غربی ایران، 12 ایزوله دارای ژن DBAT

از آنجا که حضور این آنزیم در مسیر بیوسنتزی تاکسول ضروری می‌باشد، بنابر این احتمال تولید تاکسول در ایزوله‌هایی که به وسیله PCR ژن DBAT غربال شدند بیشتر بود. به همین علت، با استفاده از روش کروماتوگرافی، تولید تاکسول در محیط کشت این 12 ایزوله بررسی گردید. در پایان، پس از رنگ آمیزی، تولید تاکسول به صورت لکه‌های آبی رنگ بر روی صفحات کروماتوگرافی در عصاره هفت نمونه قارچی مشخص گردید، که پس از 24 ساعت به رنگ خاکستری تیره تغییر رنگ داد. این ترکیب همان ویژگی‌های مشخص کروماتوگرافی تاکسول استاندارد را داشت. در شکل 6 آنالیز TLC بر روی یکی از عصاره قارچی و تاکسول استاندارد نشان داده شده است که لکه تاکسول در نمونه قارچی و استاندارد دارای Rf های مشابه بودند.



شکل 6. عصاره متانولی حاصل از قارچ (خط 2) که شامل ترکیبی است که این ترکیب دارای Rf مشابه با محلول متانولی تاکسول استاندارد (خط 1) است

بحث

در تحقیق حاضر از میان 60 ایزوله، 12 ایزوله حاوی ژن DBAT بودند. روش PCR روشی سریع و اقتصادی برای شناسایی حضور ژن‌ها است(16)، به همین علت در این تحقیق از این روش جهت غربال‌گری اولیه ایزوله‌های مولد تاکسول استفاده گردید. با توجه به این که آنزیم DBAT سنتز یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر

8. Guo B, Kai G, Jin H, Tang K. Taxol synthesis. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5 (1): 015-20.

9. Walker KD, Klettke K, Akiyama T, Croteau R. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in Taxol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(52):53947-54.

10. Gangadevi V, Muthumary J. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2009;52(1):9-15.

11. Li J-y, Strobel G, Sidhu R, Hess W, Ford EJ. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*. 1996;142(8):2223-6.

12. Hoffman A, Khan W, Worapong J, Strobel G, Griffin D, Arbogast B, et al. Bioprospecting for Taxol in Angiosperm Plant Extracts-Using High Performance Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry to Detect the Anticancer Agent and its Related Metabolites in. *Spectroscopy-Eugene*. 1998;13(6):22-32.

13. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 1993;260(5105):214-6.

14. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal diversity*. 2010;41(1):1-16.

15. Miao Z, Wang Y, Yu X, Guo B, Tang K. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009;45(1):81-6.

16. Zhang P, Zhou P-p, Jiang C, Yu H, Yu L-j. Screening of Taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*. *Biotechnology letters*. 2008;30(12):2119-23.

17. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess W. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*. 1996;142(2):435-40.

Chakravarthi B, Das P, Surendranath K, Karande AA, Jayabaskaran C. Production of

و هفت ایزوله در شرایط آزمایشگاهی مولد تاکسول بودند. به دلیل ارزش بالای دارویی تاکسول و هزینه بالای تهیه آن برای بیماران سرطانی، شناسایی منابع جدید امری ضروری به نظر می‌رسد. نشان داده شده است که میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی بالقوه و بالایی برای تولید ترکیبات دارویی هستند (14). قارچ‌های اندوفیت همزیست فندق با توانایی تولید تاکسول می‌توانند به عنوان یک منبع جایگزین مناسب جهت تولید این داروی با ارزش به حساب آیند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان‌نامه با عنوان "تولید تاکسول و عوامل موثر در تولید آن در قارچ‌های اندوفیت گیاه فندق (*Corylus avellana*)" بوده و با حمایت مالی دانشگاه بو علی سینا انجام شده است.

منابع

1. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh journal of pharmacology*. 2006;1(2):35-41.

2. Siegel R, Jemal A. *Cancer Facts & Figures*. American Cancer Society. 2012; 404: 1-64.

3. Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili M, Cusido R, et al. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2009;9(1):109-21.

4. Sinha R, Vidyarthi AS. A molecular docking study of anticancer drug paclitaxel and its analogues. 2011; 48: 101-5.

5. Baloglu E, Kingston DG. The taxane diterpenoids. *Journal of natural products*. 1999;62(10):1448-72.

6. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 1971;93(9):2325-7.

7. Nguyen T. Paclitaxel; The Billion Dollar Natural Product. *Chemistry*. 2008.

2008;33(2):259-67

paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from
Taxus celebica. Journal of biosciences.

Taxol production by endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*

Rahimi N (MSc)¹, Nazeri S (PhD)^{1*}, Mirzaei S (PhD)²

1- Department of Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2- Department of Plant Pathology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received:, Accepted:

Abstract

Background: Taxol is a diterpenoid compound that was first isolated from yew tree (*Taxus brevifolia*) and later from other plants such as *Corylus avellana*. Studies have shown that some of the endophytic fungi isolated from these plants are also capable of producing taxol. DBAT gene is one of the key genes in taxol biosynthesis pathway that catalyzes the synthesis of Baccatin III, one of the main precursors in taxol biosynthesis. The aim of this study was to investigate taxol production by endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*.

Materials and Methods: In this case-control study, endophytic fungi were isolated from hazelnut trees in the Fandoghlo area, Ardabil province, and purified through hyphal tip method. Genomic DNA was extracted using CTAB method. The presence of DBAT gene was examined by polymerase chain reaction (PCR). Taxol production in fungal media was investigated via TLC (Thin Layer Chromatography) method.

Results: After purification, 60 fungi were isolated from different organs of hazelnut trees and the presence of DBAT genes in 12 isolates was proved by PCR with specific primers. Investigation of taxol production in culture of these isolates showed that 7 isolates were capable of producing taxol in laboratory conditions.

Conclusion: A group of endophytic fungi isolated from hazelnut, grown in the North West of Iran, had DBAT gene, encoding a key enzyme in the taxol biosynthesis pathway, and some were able to produce taxol in vitro.

Keywords: Baccatin III, *Corylus avellana*, taxol, endophytes

*Corresponding author:

Address: Department of Biotechnology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Email: snblnazeri@yahoo.com

تولید داروی ضد سرطان تاکسول در قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از فندق (*Corylus avellana*)

نوشین رحیمی¹، سنبلی ناظری^{2*}، سهیلا میرزایی³

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

2- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

3- استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: 91/10/11 تاریخ پذیرش: 92/2/4

چکیده

زمینه و هدف: تاکسول یک ترکیب دی‌ترپنوئیدی است که اولین بار از درخت سرخدار و سپس از درختان دیگر مانند فندق جداسازی شد. تحقیقات نشان داده است که برخی قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از این گیاهان نیز قادر به تولید تاکسول هستند. ژن *DBAT* یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است که تشکیل باکاتین III، یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول را کاتالیز می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی تولید تاکسول توسط قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه فندق بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، قارچ‌های اندوفیت از درختان فندق در منطقه فندق‌لو واقع در استان اردبیل، جداسازی و به روش نوک‌هیف خالص‌سازی شدند. DNA ژنومی قارچ‌های اندوفیت به روش CTAB، استخراج شد. حضور ژن *DBAT* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد آزمایش قرار گرفت. تولید تاکسول در محیط‌های کشت قارچی، به روش کروماتوگرافی لایه نازک بررسی گردید.

یافته‌ها: پس از خالص‌سازی، 60 قارچ از اندام‌های مختلف درختان فندق جداسازی گردید. حضور ژن *DBAT* در 12 ایزوله با استفاده از پرایمرهای اختصاصی توسط PCR به اثبات رسید. بررسی تولید تاکسول در کشت این ایزوله‌ها، نشان داد که 7 ایزوله توانایی تولید تاکسول را در شرایط آزمایشگاهی داشتند.

نتیجه‌گیری: گروهی از قارچ‌های اندوفیت جدا شده از فندق، رویش یافته در شمال غرب ایران، حاوی ژن *DBAT*، ژن مولد آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتزی، بودند و از آن میان تعدادی در شرایط آزمایشگاهی قادر به تولید تاکسول بودند.

واژگان کلیدی: اندوفیت‌ها، باکاتین III، تاکسول، فندق، قارچ

*نویسنده مسئول: همدان، انتهای بلوار آزادگان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، گروه بیوتکنولوژی

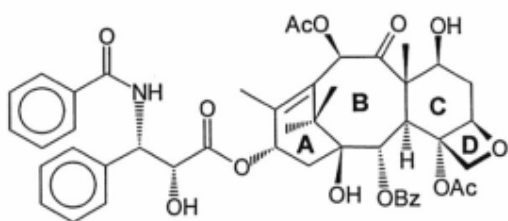
Email: snblnazeri@yahoo.com

مقدمه

ترکیبات طبیعی به خصوص ترکیبات گیاهی، صدها سال است که برای درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرطان یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین بیماری‌ها در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه است (1). امروزه شیمی‌درمانی به عنوان یکی از روش‌های اصلی در درمان سرطان استفاده می‌شود. در این روش انواع داروهای ضد سرطان به تنهایی و یا به صورت ترکیب با عوامل دیگر مورد استفاده قرار می‌گیرند (2). تاکسول یک آلکالوئید گیاهی با ساختار شیمیایی بسیار پیچیده و یکی از موثرترین داروهای ضد سرطان است که امروزه به عنوان یکی از محبوب‌ترین داروها در شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد (3). این ترکیب در برابر گستره وسیعی از انواع تومورها از جمله سرطان سینه، رحم، معده و سرطان سر و گردن موثر است. تاکسول هم‌چنین به عنوان یک عامل ضد میکروتوبولی در برابر سارکوما کاپوزیس وابسته به ایدز، فعال شناخته شده است (4). با وجود آن که بسیاری از داروهای ضد سرطان که امروزه در دسترس هستند، از عوارض جانبی بالایی برخوردار بوده و در عین حال در برابر تعداد زیادی از سرطان‌ها موثر نیستند، تاکسول در مقایسه با دیگر ترکیبات مشابه بر روی سلول‌های سرطانی اثر منحصر به فردی دارد. این دارو با اتصال به میکروتوبول‌ها، باعث افزایش تجمع و اتصال توبولین‌ها و به دنبال آن تشکیل میکروتوبول‌های پایدار می‌گردد. بر این اساس تاکسول به عنوان یک داروی آنتی‌میتوتیک، شناخته شده است (5).

این ترکیب آلکالوئیدی دی‌ترپنوییدی اولین بار در سال 1971 از پوست درخت سرخدار (Taxus brevifolia) جداسازی و استخراج شد و پس از آن در قارچ‌های اندوفیت هم زیست با آن نیز یافت شد (6). دی‌ترپنوییدها ترکیبات طبیعی هستند با اسکلت 20 کربنی که از ژرانیل ژرانیل دی‌فسفات مشتق می‌شوند و تاکسول یکی از معروف‌ترین و شناخته شده‌ترین اعضای این گروه است (شکل 1) (7). مسیر بیوسنتزی این ماده شامل 20 مرحله‌ی آنزیمی است (8)، که از این میان ژن DBAT

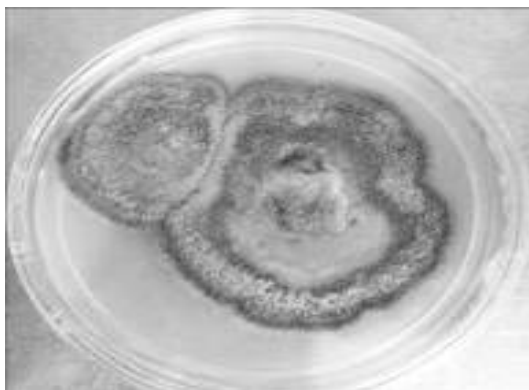
یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول، شناسایی و توالی‌یابی شده است. آنزیم DBAT (10- deacetylbaccatinIII - 10 - O - acetyl transferase) تولید باکاتین III را با استیله کردن گروه هیدروکسیل در موقعیت C10، کاتالیز می‌کند که این ماده یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است. امروزه تاکسول به صورت تجاری سنتز می‌شود. در صنعت از باکاتین III به عنوان پیش‌ماده‌ی اصلی در تولید این داروی با ارزش استفاده می‌شود (9).



شکل 1. ترکیب شیمیایی تاکسول

یکی از مشکلات اساسی در تولید تاکسول کند رشد بودن درخت سرخدار است و این که غلظت تاکسول در پوست آن پایین بوده و برای استخراج تاکسول به میزان کافی، گیاه باید به سن صد سالگی برسد (5). از طرف دیگر برای تامین تاکسول مورد نیاز برای هر بیمار سرطانی چندین کیلوگرم از پوست درخت سرخدار مورد نیاز است (10). به علت ارزش اقتصادی بالای تاکسول، کمبود درخت سرخدار، هزینه بالای سنتز آن و به دلیل تقاضای رو به رشد برای این دارو، منابع طبیعی دیگر جهت تولید این ترکیب مورد بررسی قرار گرفته‌اند (3). اولین بار لی و همکاران (11) گزارش کردند که علاوه بر سرخدار، گیاهان دیگر مانند سرو (Taxodium distichum) نیز این ترکیب تولید را می‌کنند. هافمن و همکاران (12) تاکسول و تاکسان‌های مربوط به آن را در شاخه، ساقه و برگ گیاه فندق (Corylus avellana) شناسایی و گزارش کردند. استیرل و همکاران (13)، تولید تاکسول را در محیط کشت قارچ اندوفیت Taxomyces andranae جداسازی شده از

Agar) انتقال داده شد. برای اطمینان از خالص سازی بیشتر این عمل حداقل سه بار تکرار شد.



شکل 2. رشد قارچ در محیط جامد PDA

جهت بررسی حضور ژن DBAT ابتدا از کلونی های قارچی سوسپانسیون تهیه شد. برای این منظور قطعات $0/5 \times 0/5$ سانتی متر مربع از کلونی های قارچی، داخل ارلن های 100 میلی لیتری که حاوی 50 میلی لیتر محیط PDA بود، قرار داده شدند. ارلن های حاوی نمونه بر روی شیکر با 120 دور بر دقیقه و در دمای 25 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. میسلیوم ها توسط کاغذ صافی دو لایه از محیط فیلتر شده و DNA ژنومی آنها به روش CTAB جداسازی شد. در مرحله ی بعد حضور ژن DBAT توسط واکنش زنجیره ای پلیمرز بررسی گردید. تکثیر PCR توسط پرایمرهای dbat-F و dbat-R بر اساس توالی حفاظت شده ی ژن DBAT (GenBank No. EF028093)،

به صورت dbat-F (5-
GGGAGGGTGCTCTGTTTG-3) و dbat-R (5-
GTTACCTGAACCACCAGAGG-3)، صورت
گرفت (16). یک واحد آنزیم DNA پلیمرز Taq (GeNet Bio)، به مخلوط واکنش (با حجم نهایی 25 میکرولیتر) اضافه گردید. مخلوط PCR به مدت 6 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی گراد و سپس 35 سیکل در 94 درجه سانتی گراد به مدت 60 ثانیه، 50 درجه سانتی گراد به مدت 50 ثانیه و 72 درجه سانتی گراد به مدت 80 ثانیه و در نهایت

گیاه T. breifolia گزارش کردند. اولین بار هافمن در سال 1998 تولید تاکسول را در قارچ های هم زیست گیاه فندق را گزارش کرد (12).

از آنجا که میکروارگانسیم ها به عنوان یکی از منابع اصلی تولید تاکسول محسوب می شوند و دارای ظرفیت بیولوژیکی بالایی برای تولید این داروی با ارزش ضد سرطان هستند (14)، در این تحقیق، جداسازی قارچ های اندوفیت مولد تاکسول از گیاه فندق (Corylus avellana)، فندق رویش یافته در منطقه ی فندقلو مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این مطالعه در شهریور ماه 1391، با جمع آوری نمونه های گیاهی فندق (Corylus avellana) بومی منطقه ی غرب، جنگل فندقلو واقع در استان اردبیل، به روش مورد-شاهدی صورت گرفت و نمونه گیری از اندام های سالم (ساقه و برگ) و بدون شانه بیماری انجام شد. نمونه گیاهی پس از شستشو با آب جاری (جهت زدودن برخی از آلودگی های سطحی)، در زیر هود لامینار، در قطعات 1×1 سانتی متر مربع بریده شدند. قطعات فوق با استفاده از الکل 70 درصد (3 دقیقه)، به دنبال سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هیپوکلریت سدیم $1/5$ درصد (1 دقیقه) استریل شدند. پوست رویی نمونه ها توسط تیغ استریل جدا شده و پوست داخلی بر روی پتری های حاوی محیط عمومی قارچ ها PDA (Potato Dextrose Agar، شرکت مرک) قرار داده شد. پتری های حاوی نمونه گیاهی در شرایط تاریکی و در دمای 25 ± 1 درجه سانتی گراد تا زمان رشد قارچ نگهداری شدند (شکل 2). قارچ های رشد یافته در سطح نمونه ی گیاهی، توسط روش نوک هیف خالص سازی شدند (15)، به این صورت که یک هیف منفرد از کلونی قارچی جدا و به روی پتری حاوی PDA و WA (Water

آنالیز TLC بر روی عصاره‌های متانولی قارچ انجام گرفته و از تاکسول محلول در متانول به عنوان استاندارد استفاده گردید. از معرف وانیلین یک درصد برای شناسایی لکه تاکسول استفاده گردید.

یافته‌ها

از سطوح استریل قطعات شاخه و برگ فندق در محیط PDA، میسلیوم‌های قارچی ظاهر شدند که در دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد به سرعت رشد کردند (شکل 4).



شکل 4. ظهور میسلیوم از سطح قطعات استریل سرشاخه درخت *Corylus avellana* در محیط کشت PDA.

در مرحله بعد DNA ژنومی به روش CTAB استخراج شد و خلوص آن توسط اسپکتروفوتومتری تایید گردید، در طول موج 260/280 نانومتر جذب آن نزدیک به 1/8 بود.

حضور ژن DBAT نیز با الکتروفورز DNA ایزوله‌های قارچی گیاه فندق، توسط پرابهای ژن DBAT، تشکیل یک قطعه 150 جفت بازی را نشان داد. از میان 60 ایزوله‌ی جداسازی شده، حضور این ژن در 12 ایزوله به اثبات رسید (شکل 5).



شکل 5. حضور قطعات 150 جفت باز ژن DBAT در PCR ایزوله‌های قارچی گیاه فندق

72 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه انکوبه شد. با استفاده از دستگاه الکتروفورز (Bio Rad)، DNA در ژل آگارز یک درصد ران شده و باندها در زیر نور UV ظاهر گردیدند.

تهیه محیط عصاره‌گیری

برای عصاره‌گیری از قارچ‌ها از محیط PDB (Potato Dextrose Broth) استفاده شد. نمونه‌ها در ارزن‌های 250 میلی‌لیتر حاوی 150 میلی‌لیتر محیط عصاره‌گیری کشت و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد در شرایط تاریکی و تخمیری نگهداری شدند (شکل 3). پس از 21 روز، میسلیوم‌های قارچ از دو لایه کاغذ صافی عبور داده شدند. به محیط کشت، در حجم برابر، حلال دی‌کلرومتان اضافه گردید. سپس فاز آلی جدا و تحت فشار در محیط تاریکی در دمای 35 درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. باقیمانده در متانول حل شد و در دمای -20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.



شکل 3. رشد قارچ پس از 21 روز در محیط مایع PDB

کروماتوگرافی عصاره‌ها

آنالیز TLC بر روی پلیت‌های 20×20 سانتی‌متر مربع پوشیده از سیلیکاژل با قطر 0/25 میلی‌متر (شرکت مرک) انجام شد. در این آزمایش از پنج حلال کلروفرم، متانول، استونیتریل، اتیل‌استات و ایزوپروپانول استفاده شد (17).

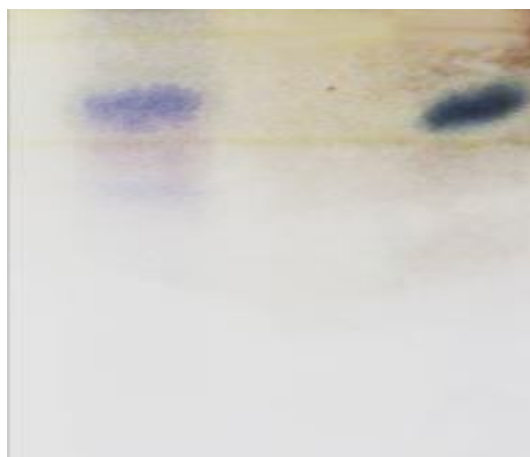
بیوسنتزی تاکسول، باکاتین III، را کاتالیز می‌کند، از ژن DBAT برای غربال‌گری قارچ‌های مولد تاکسول استفاده شد. ژانگ و همکاران جهت غربال‌گری قارچ‌های مولد تاکسول در ایزوله‌های اندوفیت گونه‌های سرخدار از این ژن به عنوان مارکر مولکولی استفاده کردند. این گروه از میان 90 ایزوله جداسازی شده، حضور ژن DBAT را در 15 ایزوله شناسایی کردند، که از میان آنها 3 ایزوله تاکسول تولید کردند (16).

در تحقیق حاضر از میان 12 ایزوله حاوی ژن DBAT، هفت ایزوله در محیط کشت خود تاکسول تولید کردند. روش‌های کروماتوگرافی از روش‌های معمول و قابل اعتماد در شناسایی حضور تاکسول است. اولین بار هافمن با استفاده از این روش تولید تاکسول را در قارچ‌های جدا شده از فندق شناسایی کرد (12). این روش در شناسایی اندوفیت‌های سایر درختان نیز مورد استفاده قرار گرفته است. ژانگ و همکاران تولید تاکسول در قارچ‌های ایزوله شده از گیاه Taxus را توسط روش‌های کروماتوگرافی به اثبات رساندند (16). چاکراواری و همکاران با استفاده از روش کروماتوگرافی لایه نازک حضور تاکسول را در محیط کشت قارچ *Fusarium solani* جدا شده از *Taxus celebica* نشان دادند (18). گانگادوی و موتوماری نیز از روش کروماتوگرافی برای شناسایی قارچ اندوفیت مولد تاکسول گیاه *Terminalia arjuna* استفاده کردند (10). عدم تشخیص تاکسول در محیط کشت پنج ایزوله دیگر می‌تواند به این علت باشد که در کشت 5 ایزوله دیگر، میزان تولید تاکسول به اندازه‌ای نبوده است که روش TLC آن را شناسایی کند، یا شرایط مورد آزمایش برای تولید تاکسول مناسب نبوده و یا این که ژن DABT در این ایزوله‌ها در مسیر بیوسنتزی دیگری شرکت داشته و در نتیجه ماده نهایی، ترکیبی غیر از تاکسول بوده است (16).

نتیجه‌گیری

از میان 60 ایزوله قارچی جداسازی شده از گیاه فندق منطقه شمال غربی ایران، 12 ایزوله دارای ژن DBAT

از آنجا که حضور این آنزیم در مسیر بیوسنتزی تاکسول ضروری می‌باشد، بنابر این احتمال تولید تاکسول در ایزوله‌هایی که به وسیله PCR ژن DBAT غربال شدند بیشتر بود. به همین علت، با استفاده از روش کروماتوگرافی، تولید تاکسول در محیط کشت این 12 ایزوله بررسی گردید. در پایان، پس از رنگ آمیزی، تولید تاکسول به صورت لکه‌های آبی رنگ بر روی صفحات کروماتوگرافی در عصاره هفت نمونه قارچی مشخص گردید، که پس از 24 ساعت به رنگ خاکستری تیره تغییر رنگ داد. این ترکیب همان ویژگی‌های مشخص کروماتوگرافی تاکسول استاندارد را داشت. در شکل 6 آنالیز TLC بر روی یکی از عصاره قارچی و تاکسول استاندارد نشان داده شده است که لکه تاکسول در نمونه قارچی و استاندارد دارای Rf های مشابه بودند.



شکل 6. عصاره متانولی حاصل از قارچ (خط 2) که شامل ترکیبی است که این ترکیب دارای Rf مشابه با محلول متانولی تاکسول استاندارد (خط 1) است

بحث

در تحقیق حاضر از میان 60 ایزوله، 12 ایزوله حاوی ژن DBAT بودند. روش PCR روشی سریع و اقتصادی برای شناسایی حضور ژن‌ها است (16)، به همین علت در این تحقیق از این روش جهت غربال‌گری اولیه ایزوله‌های مولد تاکسول استفاده گردید. با توجه به این که آنزیم DBAT سنتز یکی از پیش‌سازهای اصلی در مسیر

8. Guo B, Kai G, Jin H, Tang K. Taxol synthesis. *African Journal of Biotechnology*. 2006; 5 (1): 015-20.
9. Walker KD, Klettke K, Akiyama T, Croteau R. Cloning, heterologous expression, and characterization of a phenylalanine aminomutase involved in Taxol biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(52):53947-54.
10. Gangadevi V, Muthumary J. Taxol production by *Pestalotiopsis terminaliae*, an endophytic fungus of *Terminalia arjuna* (arjun tree). *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2009;52(1):9-15.
11. Li J-y, Strobel G, Sidhu R, Hess W, Ford EJ. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology*. 1996;142(8):2223-6.
12. Hoffman A, Khan W, Worapong J, Strobel G, Griffin D, Arbogast B, et al. Bioprospecting for Taxol in Angiosperm Plant Extracts-Using High Performance Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry to Detect the Anticancer Agent and its Related Metabolites in. *Spectroscopy-Eugene*. 1998;13(6):22-32.
13. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*. 1993;260(5105):214-6.
14. Aly AH, Debbab A, Kjer J, Proksch P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal diversity*. 2010;41(1):1-16.
15. Miao Z, Wang Y, Yu X, Guo B, Tang K. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2009;45(1):81-6.
16. Zhang P, Zhou P-p, Jiang C, Yu H, Yu L-j. Screening of Taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*. *Biotechnology letters*. 2008;30(12):2119-23.
17. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess W. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology*. 1996;142(2):435-40.
- Chakravarthi B, Das P, Surendranath K, Karande AA, Jayabaskaran C. Production of

و هفت ایزوله در شرایط آزمایشگاهی مولد تاکسول بودند. به دلیل ارزش بالای دارویی تاکسول و هزینه بالای تهیه آن برای بیماران سرطانی، شناسایی منابع جدید امری ضروری به نظر می‌رسد. نشان داده شده است که میکروارگانیسم‌ها دارای توانایی بالقوه و بالایی برای تولید ترکیبات دارویی هستند (14). قارچ‌های اندوفیت همزیست فندق با توانایی تولید تاکسول می‌توانند به عنوان یک منبع جایگزین مناسب جهت تولید این داروی با ارزش به حساب آیند.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر گرفته از پایان‌نامه با عنوان "تولید تاکسول و عوامل موثر در تولید آن در قارچ‌های اندوفیت گیاه فندق (*Corylus avellana*)" بوده و با حمایت مالی دانشگاه بو علی سینا انجام شده است.

منابع

1. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh journal of pharmacology*. 2006;1(2):35-41.
2. Siegel R, Jemal A. *Cancer Facts & Figures*. American Cancer Society. 2012; 404: 1-64.
3. Expósito O, Bonfill M, Moyano E, Onrubia M, Mirjalili M, Cusido R, et al. Biotechnological production of taxol and related taxoids: current state and prospects. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2009;9(1):109-21.
4. Sinha R, Vidyarthi AS. A molecular docking study of anticancer drug paclitaxel and its analogues. 2011; 48: 101-5.
5. Baloglu E, Kingston DG. The taxane diterpenoids. *Journal of natural products*. 1999;62(10):1448-72.
6. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*. 1971;93(9):2325-7.
7. Nguyen T. Paclitaxel; The Billion Dollar Natural Product. *Chemistry*. 2008.

2008;33(2):259-67

paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. Journal of biosciences.