

جداسازی قارچ های اندوفایت تولید کننده داروی ضد سرطان تاکسول از سرخدار بومی ایران

زیبا نصیری مدیسه*، دکتر محمدرضا مفید**، مرتضی ابراهیمی***، دکتر سید مجتبی خیام نکویی†، دکتر محمود

خسرو شاهلی††

*کارشناس پژوهشی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، **استادیار گروه متابولیت های ثانویه-پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، ***مربی گروه کشت بافت- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، اصفهان، †استادیار بیوتکنولوژی- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور، کرج، ††استاد گروه بیوتکنولوژی - دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۲۹ تاریخ تایید: ۸۷/۵/۱۲

چکیده:

زمینه و هدف: تاکسول یکی از مهمترین داروهای ضد سرطان و منبع اولیه تهیه آن گیاه سرخدار است و با توجه به محدود بودن تعداد این درختان جایگزینی روش های دیگر تولید به جای استخراج از پوست گیاه امری ضروری به نظر می رسد. با توجه به اینکه تاکنون تحقیقات گسترده و جامعی بر روی قارچ های تولید کننده تاکسول در داخل کشور انجام نشده، لذا این مطالعه با هدف بررسی روی فلور طبیعی ایران به منظور جداسازی قارچ های اندوفایت و بررسی تولید تاکسول در این قارچ ها انجام شده است.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی نمونه های ساقه گیاهان سرخدار مناطق جنگلی شمال کشور به منظور جداسازی قارچ های اندوفایت جمع آوری شد. پس از استریل کردن سطحی نمونه های گیاهی، نمونه های مورد نظر بر روی محیط Potato dextrose agar کشت داده شدند. پس از گذشت چند روز قارچ های رشد یافته جداسازی شده و برای اطمینان از خلوص هر کلنی، عمل ایزوله کردن قارچ های حاصل ۳ بار تکرار شد. بررسی حضور تاکسول در قارچ های اندوفایت جدا شده، بوسیله تکنیک کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و با استفاده از ستون کروماتیل C₁₈ انجام پذیرفت. داده ها با استفاده از آزمون آماری دانکن تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها: تعداد ۸۰ ایزوله قارچ اندوفایت از سرخدار بومی ایران جداسازی شد. بررسی های انجام شده تولید تاکسول را در ۵ ایزوله جدا شده نشان داد در میان قارچ های تولید کننده تاکسول، ایزوله TbPm4 با بیشترین میزان تولید، قادر به تولید متوسط ۲۱/۷۴ µg/L تاکسول بود.

نتیجه گیری: جداسازی ۸۰ ایزوله قارچ اندوفایت در این پروژه از سرخدار بومی ایران و قابلیت تولید تاکسول در ۵ ایزوله جدا شده نشان داد که این ایزوله ها پتانسیل قابل قبولی جهت تولید تاکسول را دارا می باشند.

واژه های کلیدی: تاکسول، داروی ضد سرطان، سرخدار، قارچ اندوفایت.

مقدمه:

و رزین ها می باشند که آنها را به شدت سمی می سازد. این درخت، بومی اروپا و شمال آفریقا می باشد و در ایران از آستارا تا گرگان دیده می شود. درخت سرخدار منبع اولیه تولید داروی ضد سرطان تاکسول می باشد. تاکسول در تمامی بخش های گیاه سرخدار بجز میوه تازه آن وجود دارد و مقادیر آن در اندام های مختلف و

سرخدار (*Taxus breurfolia*) گیاهی است بازدانه و دوپایه، متعلق به خانواده تاگراسه، این گیاه همیشه سبز و دارای رشدی آرام است. تمامی اندام های گیاه بجز میوه تازه آن (که به آن اصطلاحاً آریل گفته می شود) شامل شاخ، برگ، پوست و بذور گیاه حاوی ترکیبی از آلکالوئیدها، دی ترپنوئیدها، لیگان ها، تانن ها

^۱ نویسنده مسئول: اصفهان- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور گروه متابولیت های ثانویه-تلفن: ۰۲۳۱-۲۳۴۶۹۴ E-mail: mrezamofid@yahoo.de

اندوفایت تولید کننده تاکسول با نام *Taxomyces andeanae* از گیاه *Taxus brevifolia* راه جدیدی پیش روی بشر برای تولید این داروی مهم باز نمود (۳). قارچ های اندوفایت تمام و یا بخشی از سیکل زندگی خود را درون سلول و یا بین سلول در بافت زنده گیاه میزبان به سر برده، بدون اینکه باعث ایجاد بیماری و یا آلودگی در گیاه میزبان شوند (۵). تعداد زیادی از قارچ های اندوفایت سرخدار از سراسر جهان جداسازی شده است و تولید تاکسول توسط آنها به اثبات رسیده است. از آن جمله می توان قارچ *Pestalotiopsis microspora* جدا شده از *T. wallichiana* را ذکر کرد. میزان تاکسول تولید شده در این قارچ، $60-70 \mu\text{g/L}$ می باشد (۶). *Fusarium solani* از دیگر قارچ های تولید کننده تاکسول است، این قارچ از گونه *T. celebica* جدا شده است و میزان تولید تاکسول در این قارچ $1/6 \mu\text{g/L}$ می باشد (۷). قارچ های اندوفایت سرخدار با توانایی تولید تاکسول به عنوان یک منبع تجدید شونده برای تولید این داروی با ارزش و گران قیمت، از اهمیت زیادی برخوردارند (۶). با توجه به این مساله که در ایران تحقیق بر روی قارچ های تولید کننده تاکسول صورت نگرفته است، لذا انجام تحقیق از مناطق مختلف ایران ضروری است. در این پژوهش قارچ های اندوفایت سرخدار ایران از جنگل پونه آرام در استان گلستان جداسازی شده و توانایی تولید تاکسول در آنها مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی نمونه های گیاهی سرخدار بومی ایران *T. baccata* از جنگل پونه آرام در استان گلستان جمع آوری شد. نمونه گیری از اندام های سالم و بدون نشانه بیماری صورت گرفت. نمونه ساقه و شاخه مورد نظر در قطعات ۵ سانتی متری بریده شده و برای جدا شدن خاک و خزه و سایر ذرات خارجی، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند. عمل استریل سطحی نمونه ها به وسیله الکل ۷۰

گونه های متفاوت نوسان دارد (۰/۰۱ تا ۰/۰۳ وزن خشک) (۱). تاکسول یک آلکالوئید دی ترینوئید طبیعی است که اولین بار توسط Wani و همکاران از پوست درخت سرخدار *Taxus brevifolia* جدا شد (۲). تاکسول یک داروی ضد سرطان با اثر ویژه و خاص در درمان سرطان های سینه، رحم، ریه و مثانه می باشد (۳). فرمول شیمیایی آن به صورت C₄₇H₅₁NO₁₄ و وزن مولکولی آن حدود ۸۵۳/۹۲ دالتون می باشد. ساختمان شیمیایی این ماده دارویی دارای دو بخش است که شامل هسته باکاتین و یک زنجیره جانبی مشتق شده از فنیل آلانین که به کربن ۱۳ باکاتین متصل شده است (۴). مکانیسم عمل تاکسول منحصر بفرد است زیرا بر خلاف اکثر داروهای ضد سرطان که در مرحله G1-S عمل می کند، این دارو در مراحل G2-M اثر می گذارد. این ماده پس از اتصال به توبولین، تجمع میکروتوبول ها را تحریک می کند. همچنین با تغییر موازنه پلیمر-مونومر در توبولین به سمت حالت پلیمریک، باعث تحریک پلیمریزاسیون توبولین شده و از دپلیمریزه شدن آن جلوگیری می کند. در این حالت با مهار تقسیم میتوزی باعث مرگ سلول های سرطانی می شوند (۴). تولید ۱ کیلوگرم تاکسول از گیاه مستلزم قطع ۲۵۰۰-۲۰۰۰ درخت سرخدار ۲۰۰ ساله می باشد و یک بیمار سرطانی در طول درمان خود به ۶ درخت بین ۱۰۰-۶۰ سال نیاز دارد. بنابراین تولید تاکسول از این منبع طبیعی، قطع بی رویه و انقراض درختان سرخدار را به دنبال خواهد داشت. در دهه اخیر محققان در زمینه تولید تاکسول، به دنبال راه های جدید جهت بهتر کردن شرایط تولید و کاهش قیمت این داروی با ارزش به منظور پاسخگویی به نیاز بیماران سرطانی و کلینیک های تخصصی بودند (۴). این محققان دریافته اند که درخت سرخدار با میکروارگانیزم هایی همزیستی دارد که برخی از آنها توانایی تولید تاکسول را دارا می باشند. تلاش ها در این زمینه منجر به کشف قارچ های تولید کننده تاکسول شد (۱). کشف قارچ

گردید. فاز آلی بدست آمده در دمای ۵۱ درجه به وسیله دستگاه روتاری خشک گردید. ماده خشک حاصل در ۱ میلی لیتر متانول حل شده و در تاریکی و دمای ۲۰- درجه در فریزر نگهداری شده و جهت بررسی حضور تاکسول مورد استفاده قرار گرفت (۹،۷،۲).

ارزیابی حضور تاکسول در نمونه های استخراجی به وسیله تکنیک HPLC (ساخت شرکت sykam آلمان) انجام پذیرفت. ستون HPLC از نوع Kromasil C18 (Vydac آمریکا) در ابعاد (۲۵۰×۴/۶mm) و فاز متحرک به کار رفته متانول/آب (۷۰:۳۰v/v) بود. سرعت جریان فاز متحرک ۱ mL/min تنظیم گردید و شناساگر UV دستگاه در طول موج ۲۲۷ nm تاکسول را شناسایی کرد. در این روش میزان ۱۰ μL از نمونه های استخراج شده را درون ستون تزریق کرده، برای اطمینان از حضور پیک تاکسول و مقایسه پیک های حاصل از نمونه های قارچی با تاکسول استاندارد مقدار ۱۰ μL از تاکسول استاندارد نیز در ستون تزریق گردید (۱۱،۳). (حلال های مورد استفاده در استخراج تاکسول و روش HPLC ساخت شرکت ROMI می باشد). تمام آزمایشات به صورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام پذیرفت. مقایسه میانگین ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد محاسبه گردید. تجزیه داده ها توسط نرم افزار SAS 6.8 انجام گرفت.

یافته ها:

با انجام عمل ایزولاسیون و اطمینان از خالص بودن کلنی های بدست آمده، تعداد ۸۰ کلنی قارچ اندوفایت از سرخدار بومی ایران *Taxus baccata* جدا شد. این قارچ ها از نظر خصوصیات مورفولوژیکی از جمله شکل کلنی، رنگ، حاشیه کلنی و سرعت رشد کاملاً با هم متفاوت بودند. مقایسه وزن خشک در قارچ های مورد بررسی نشان داد که این قارچ ها از

درصد به مدت ۳ دقیقه و هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به همراه یک قطره توئین به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت. در پایان عمل استریل کردن، نمونه ها در زیر لامینار، به وسیله آب مقطر استریل در ۳ مرحله شستشو داده شدند. به منظور فراهم آوردن شرایط لازم برای رشد قارچ ها و جداسازی آنها، پوست روی نمونه ها به وسیله تیغ استریل جدا و پوست داخلی بر روی پتری های حاوی محیط عمومی قارچ ها PDA (Potato dextrose agar) (ساخت شرکت Scharlau) قرار داده شد. پتری های کشت داده شده در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه به مدت چند روز نگهداری شدند. قارچ های رشد کرده بر روی سطح نمونه های گیاهی، به وسیله روش نوک هیف خالص سازی شدند (۹-۱۳). در این روش از هر کلنی قارچ مورد نظر در زیر بینوکولر، به وسیله پنس باریک یک هیف منفرد جدا شده سپس نوک هیف بریده و بر روی پتری حاوی محیط PDA جدید قرار داده شدند (۹،۸،۶).

برای اطمینان از خالص بودن کلنی ها، عمل ایزوله کردن قارچ ها به روش نوک هیف، ۳ بار تکرار شد. در مرحله بعد این کلنی های خالص برای تهیه سوسپانسیون مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه سوسپانسیون از قارچ های اندوفایت حاصل، قطعاتی از قارچ در ابعاد ۵×۵×۰/۵ سانتی متر جدا گردید و در ارلن های ۱۰۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰۰ میلی لیتر محیط کشت PDB (Potato dextrose broth) (ساخت شرکت Scharlau) قرار داده شد. ارلن های آماده شده درون شیکر، در شرایط تاریکی، دمای ۲۳ درجه و دور ۱۲۰ rpm برای مدت زمان ۲۱ روز نگهداری شدند. بعد از گذشت این زمان تاکسول موجود در محیط کشت قارچ استخراج گردید. بدین منظور ابتدا میسلیم های قارچی به وسیله ۳ بار غربال از قسمت مایع جدا شد، سپس محلول حاصل با حجم برابر از مخلوط کلروفورم/متانول (۱۰: ۱v/v) مخلوط و به خوبی تکان داده شد و به وسیله قیف جدا کننده فاز آلی حاصل جدا

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین تولید تاکسول در قارچ های

اندوفایت		
وزن خشک	تاکسول مترشحه به محیط کشت ($\mu\text{g/l}$)	نوع سوش
۲/۰۶۶ ^b	۲۱/۷۵۳ ^a	TbPm4
۱/۰۷۶ ^c	۰/۲۵۶ ^d	TbPm 6
۰/۹۲۲ ^c	۴/۸۸ ^b	TbPm 13
۳/۷۱۳ ^a	۲/۶۹۶ ^c	TbPm 21
۳/۶۱۸ ^a	۲/۴۲۶ ^c	TbPm 22

d, c, b, a بر اساس مقایسات چند گانه ارایه شده است. اعدادی که در هر ستون دارای حروف مشابه هستند اختلاف معنی داری ندارند. مقایسه میانگین با آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵٪ محاسبه شد.

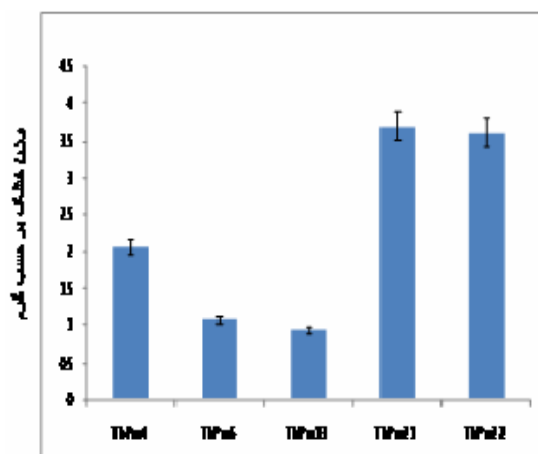
میانگین تولید تاکسول در ۴ ایزوله دیگر بین ۰/۲۵-۴/۹ $\mu\text{g/L}$ اندازه گیری شده است (جدول شماره ۱).

بحث:

برای اطمینان از جداسازی قارچ های اندوفایت 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 اندوفایت گردید. همچنین قرار دادن نمونه های پوست داخلی 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 اندوفایت جدا شده بر روی محیط PDA به سرعت رشد کردند، بنابراین محیط غذایی برای رشد قارچ های اندوفایت مناسب ارزیابی شد (۹).

Strobel و همکاران نشان دادند که از میان ۳۳

قارچ اندوفایت جدا شده از *T wallachiana* یک ایزوله



سوش قارچ

نمودار شماره ۱: مقایسه وزن خشک در قارچ های تولید کننده تاکسول (بر حسب گرم)

این آزمایش در سطح خطای ۰/۰۵ درصد معنی دار بود. سرعت رشد متفاوتی برخوردار بودند، بطوری که بعضی از آنها رشد سریع تری داشته و در مدت زمان ۲۱ روز بعد از کشت در محیط PDB به سرعت رشد کرده و توده مترامی را تشکیل می دهند (نمودار شماره ۱).

بررسی نمونه های استخراجی و تاکسول استاندارد بوسیله تکنیک HPLC نشان داد که پیک حاصل از تاکسول استاندارد در زمان ۷ دقیقه بعد از تزریق نمونه بداخل ستون، ظاهر شد. بررسی نمونه های قارچی حاکی از آن است که برخی از این نمونه ها دارای یک پیک مشخص در زمان ظهور پیک متعلق به تاکسول استاندارد می باشند، که نشان می دهد تاکسول در این نمونه های استخراج شده از قارچ ها وجود داشته است.

بررسی ۸۰ ایزوله قارچ اندوفایت جدا شده نشان داد که از میان آنها ۵ ایزوله قادر به تولید تاکسول می باشند. مقایسه میانگین تولید تاکسول تفاوت معنی داری را در میزان تولید تاکسول نشان می دهد. در میان قارچ های اندوفایت تولید کننده تاکسول، ایزوله TbPm4 با تولید ۲۱/۷۵ $\mu\text{g/L}$ بیشترین میزان تولید تاکسول را دارا بوده است.

به نام *Pestalotiopsis microspora* قادر به تولید $60-70 \mu\text{g/L}$ تاکسول می باشد (۶).

Caruso و همکاران تعداد ۱۵۰ ایزوله قارچی را از درخت *T. baccata* جدا کردند. مقدار تولید تاکسول در این نمونه های قارچی بسیار کم و تنها در برخی از نمونه ها این میزان به حدود $50-100 \text{ ng/L}$ می رسد (۳).

Wang و همکاران ۲۱ ایزوله قارچی را از سرخدار گونه *T. chinensis* جداسازی نمودند که از میان آنها، استرین BT2 توانایی تولید تاکسول را به میزان $12-18 \mu\text{g/L}$ دارا بود (۱۰).

جداسازی ۸۰ ایزوله قارچ اندوفایت در این پروژه از سرخدار بومی ایران و قابلیت تولید تاکسول در ۵ ایزوله جدا شده نشان می دهد که فراوانی و تنوع قارچ های اندوفایت تولید کننده تاکسول در نمونه های مورد بررسی با سایر مطالعات انجام شده در نقاط دیگر جهان متفاوت می باشد. میزان تولید در قارچ های مورد بررسی در این تحقیق در مقایسه با قارچ های جدا شده از گونه های دیگر سرخدار نشان داد که این ایزوله ها از پتانسیل قابل قبولی جهت تولید تاکسول دارا می باشند. Strobel و همکاران نشان دادند که بیشترین میزان تولید تاکسول در پایان هفته سوم به دست می آید و بعد از هفته پنجم به سرعت کاهش می یابد. نتایج بررسی های ما، حاکی از آن است که بالاترین میزان تولید تاکسول در روز ۲۱ به دست می آید و با گذشت زمان کاهش می یابد (۶).

در این پروژه تاکسول ترشح شده در محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت زیرا اکثر تاکسول تولید شده بوسیله قارچ در محیط کشت ترشح می شود و استخراج تاکسول از محیط کشت آسان تر و سریع تر و مقرون به صرفه تر است و این امکان را فراهم می کند تا بتوان در سطح وسیع و با استفاده از فرماتور تولید آن را به سطح اقتصادی و تجاری رساند.

از جمله بزرگترین مشکلات استفاده از قارچ ها در تولید تاکسول میزان تولید کم و ناپایدار توسط

آنهاست. اما ارزان تر بودن محیط کشت مورد استفاده برای رشد قارچ ها در مقایسه با کشت بافت گیاهی و کوتاه تر بودن پروسه جداسازی و استخراج از قارچ موجب افزایش توجه به آنها به عنوان یک منبع تولید تاکسول در مقیاس صنعتی و تجاری شده است.

در این تحقیق نمونه های گیاهی مورد استفاده جهت جداسازی قارچ های اندوفایت از جنگل پونه آرام استان گلستان انتخاب شده است، بنابراین به نظر می رسد مطالعه و بررسی سایر جنگل های سرخدار در شمال کشور به منظور جداسازی قارچ های اندوفایت موجود در آن ناحیه ضروری باشد.

افزودن برخی پیش ماده ها و الیستورها ممکن است موجب افزایش تولید تاکسول در قارچ های اندوفایت سرخدار شود. از آن جمله می توان بنزوئیک اسید را نام برد که در غلظت های بسیار پایین در حدود 0.1 mM موجب بالا رفتن تولید تاکسول در حدود ۸ برابر شده است (۷). بنابراین بررسی انواع مختلف و غلظت های متفاوت از الیستورها و پیش ماده ها به منظور افزایش تولید تاکسول از اهمیت زیادی برخوردار است. بررسی الیستورها و پیش ماده های مختلف در ادامه این پژوهش در حال انجام می باشد.

نتیجه گیری:

جداسازی ۸۰ ایزوله قارچ اندوفایت در این پروژه از سرخدار بومی ایران و قابلیت تولید تاکسول در ۵ ایزوله جدا شده نشان داد که این ایزوله ها پتانسیل قابل قبولی جهت تولید تاکسول دارا می باشند.

تشکر و قدردانی:

از کلیه همکاران عزیزم در پژوهشکده بیوتکنولوژی منطقه مرکزی کشور، که در طول انجام این تحقیق مرا یاری نمودند تقدیر و تشکر می نمایم.

منابع:

1. Lesani MR. [Yew. Tehran: Mministry of Jihad-e-Sazandegi Pub.1999; p: 17-8.]Persian
2. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc.* 1971 May; 93(9): 2325-7.
3. Caruse 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.
4. Jennewein S, Croteau R. Taxol: biosynthesis, molecular genetics, and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001 Oct; 57(1-2): 13-9.
5. Bayman P. Fungal endophytes. In: Kubicek CP, Druzhinina IS. *Environmental and microbial relationship.* Berlin: Springer-Verlag-Berlin; 2007. p: 213-24.
6. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, Sidhu RS, Hess WM. Taxol from *pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *taxus wallachiana*. *Microbiology.* 1996 Feb; 142(P2): 435-40.
7. Chakravarthi BV, Das P, Surendranath K, Karande AA, Jayabaskaran C. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. *J Biosci.* 2008 Jun; 33(2): 259-67.
8. Li J, Sidhu R, Ford E, Long D, Hess W, Strobel G. The induction of taxol production in the endophytic fungus-*periconia* sp from *torreya grandifolia*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1998; 20(2): 259-64.
9. Wang J, Li G, Lu H, Zheng Z, Huang Y, Su W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiol Lett.* 2000 Dec; 193(2): 249-53.
10. Wang YT, Luo S, Wang PH. Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: First Report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an Endophyte of *Taxus mairei*. *Botanical Studies.* 2008; 49: 39-43.
11. Guo1 BH, Wang YC, Zhou XW, Hu K, Tan F, Miao1 AQ, et al. An endophytic Taxol-producing fungus BT2 isolated from *Taxus chinensis* var. *mairei*. *African J Biotechnol.* 2006; 5(10): 875-7.

Received: 17/Feb/2009

Accepted: 3/Aug/2009

Isolation of Taxol-producing endophytes fungi from Iranian yew (*Taxus baccata L.*)

Nasiri-Madiseh Z (MSc)*, Mofid MR (PhD)**¹, Ebrahimi M (MSc)***, Khayyam-Nekoei SM (PhD)†, Khosro-Shahli M (PhD)††.

**Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran,*

***Assistant professor, Secondary Metabolites Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute-Central region of Iran, Isfahan, Iran,*

****Lecturer, Tissue culture Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute, Central region of Iran, Isfahan, Iran,* †*Associate professor, Biotechnology., Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran,*

††*Professor, Biotechnology Dept., Azad University, Tehran, Iran.*

Background and aim: Taxol is an effective anticancer drug which is used widely for the treatment of a variety of cancers. Taxol is normally isolated from the bark of the yew trees. Since obtaining Taxol from this source requires destruction of yew trees, researchers were thinking to find other sources for producing this substance. Fortunately, Iranian yew consists of different species of endophytic fungi that are able to produce Taxol. The aim of this study was to find and isolate Taxol-producing endophytes fungi from Iranian yew.

Methods: To isolate endophytic fungi, stem and twig were collected from yew trees in north forests of Iran. After superficial sterilization, samples were placed on the surface of potato dextrose agar (PDA) medium in Petri plate. After some days, emerged fungi were isolated in the plates, some individual hyphal tips of the fungi were transferred to new PDA medium and this was repeated three times for fungus purity. The ability of fungus to make Taxol was substantiated by HPLC analyses. HPLC separation was performed using a kromasil C18 column. Data were analyzed using Duncan's test.

Results: From a total of 80 isolated fungi from Iranian yew, five fungi were observed to produce Taxol. Among these fungi, TbPm4 produced the highest amount of Taxol (21/74 $\mu\text{g/l}$).

Conclusion: The results of this study demonstrated that isolated endophytes fungi from Iranian yew tree have capability to produce Taxol.

Keywords: Anti-cancer drug, Endophyte fungus, Taxol, Yew.

Corresponding author:
Secondary Metabolites
Dept., Agricultural
Biotechnology Research
Institute-Central region of
Iran, Isfahan, Iran.

Tel:

0331-2234694

E-mail: