مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٤، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲، ۲۰۳-۱۹۷

مقایسه توالی ژن DBAT، در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، در گونه‌های سرخدار و قارچ های اندوفیت

مقصود سیفی[۱]، سنبل ناظری .Ph.D [۲*]، جلال سلطانی .Ph.D [۳]، عبدالکریم چهرگانی راد .Ph.D [۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۲- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۳- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
۴- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
* پست الکترونیک نویسنده مسئول: snblnazeri@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۴

چکیده

هدف: هدف از این تحقیق، بررسی حضور ژن *DBAT*، یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول، در سرخدار (*Taxus baccata*) و قارچ اندوفیت مولد تاکسول آن و نیز بررسی میزان شباهت این توالی‌ها با توالی‌های موجود در بانک ژن بود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، قارچ‌های اندوفیت از پوست درخت سرخدار جداسازی و به روش نوک هیف خالص‌سازی شدند. DNA ژنومی درخت سرخدار و یکی از قارچ‌های مولد تاکسول (ایزوله T9) استخراج گردید. حضور ژن *DBAT* به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی گردید. پس از توالی‌یابی، میزان شباهت توالی‌های به‌دست آمده از سرخدار و ایزوله T9 با توالی‌های سایر گونه‌های سرخدار و قارچ‌های اندوفیت، موجود در پایگاه بانک ژن، مقایسه شدند.

نتایج: با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، یک قطعه ۱۲۵ bp از ژن *DBAT* سرخدار و ایزوله T9 تکثیر گردید. هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی قارچ و گیاه میزبان نشان داد که این توالی‌ها دارای شباهت بسیار بالایی (بیش از ۹۸درصد) بودند. نتایج هم‌ردیفی این توالی‌ها با توالی‌های گونه‌های دیگر سرخدار و قارچ‌های اندوفیت، نیز شباهت بسیار بالایی (۹۸ تا۱۰۰ درصد) را نشان داد. همچنین، شباهت نسبتا بالایی در توالی نوکلئوتیدی و آمینواسیدی آنزیم DBAT و سایر آنزیم‌های آسیل و آروئیل ترانسفراز درگیر در مسیر بیوسنتزی تاکسول مشاهده شد.

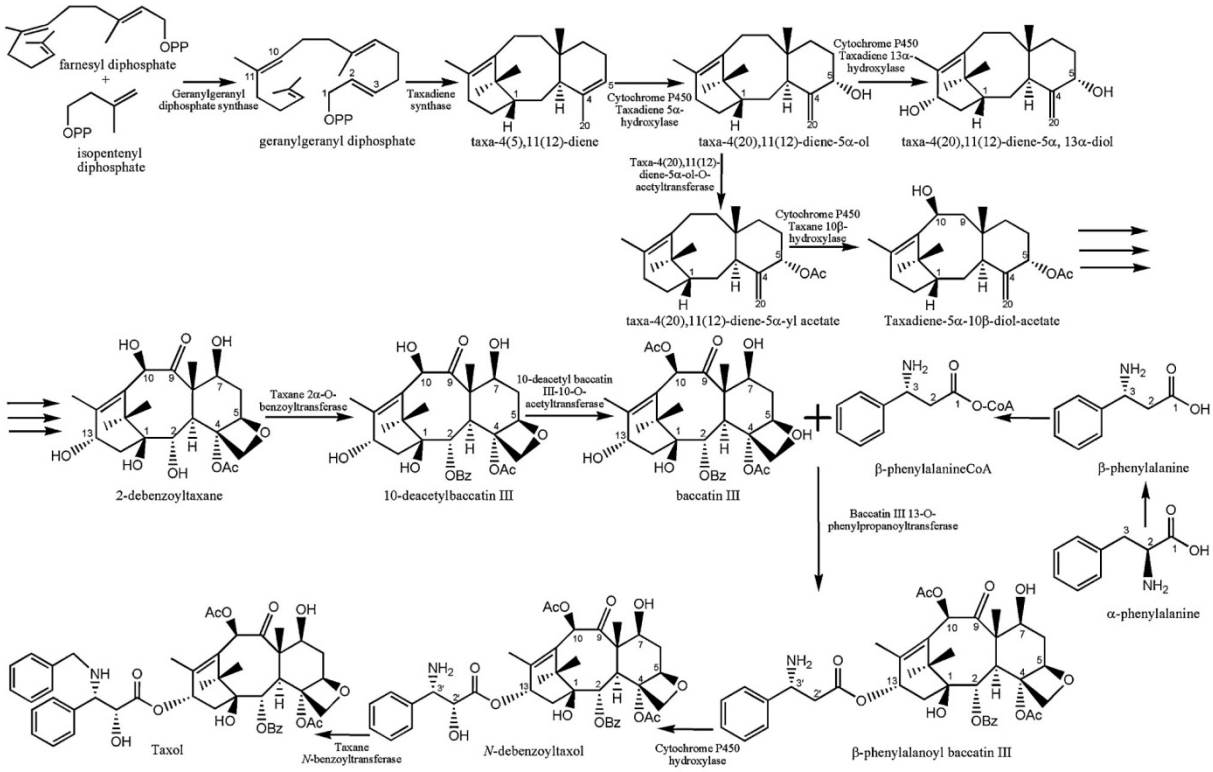
نتیجه‌گیری: براساس نتایج، حضور ژن *DBAT* در قارچ اندوفیت مولد تاکسول جداشده از سرخدار و همچنین شباهت بسیار بالا آن، در سطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی، با توالی بدست آمده از ژن *DBAT* میزبان (*Taxus baccata*) و توالی گونه‌های دیگر سرخدار و نیز قارچ‌های اندوفیت به اثبات رسید.

واژگان کلیدی: تاکسول، قارچ‌های اندوفیت، سرخدار، ژن *DBAT*

مقدمه

تاکسول، یک داروی ضدسرطان با سمیت کم و دامنه اثر گسترده برروی انواع مختلف سرطان‌ها است که اولین بار از سرخدار (*Taxus brevifolia*) جداسازی گردید (۱). تمام گونه‌ها و زیرگونه‌های سرخدار آلکالوئیدهای با سمیت بالایی به‌نام تاکسوئیدها را تولید می‌کنند (۲). تاکنون بیش از ۳۵۰ گونه از تاکسوئیدها شناخته شده است که تاکسول و باکاتین-III، پیش ساز تاکسول، از شناخته شده‌ترین تاکسوئیدها به شمار می‌آیند (۲ و ۳). تاکسول یک دی‌ترپنوئید ۴ حلقه‌ای با ساختاری پیچیده است. مسیر بیوسنتزی آن در سرخدار از ۱۹ مرحله آنزیمی تشکیل شده که تاکنون ۱۲ آنزیم و ژن کدکننده آن شناخته شده است (۴ و ۵).

در حال حاضر، مهم‌ترین منبع تاکسول روش نیمه سنتزی آن از پیش ماده‌های جداسازی شده از سرخدار است. مهم‌ترین پیش‌ماده‌های استفاده شده جهت تولید تاکسول به روش نیمه سنتز، ۱۰-د استیل باکاتین-III و باکاتین-III هستند (۶). باکاتین-III در مراحل انتهایی بیوسنتز تاکسول با اضافه شدن یک گروه استیل به کربن ۱۰ حلقه تاکسان به وجود می‌آید (شکل ۱). آنزیم 10-deacetylbaccatinIII-10-O-acetyltransferase، (*DBAT*) که این واکنش را کاتالیز می‌کند، یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول است (۵).



شکل ۱: مسیر بیوسنتزی تاکسول در سرخدار

استخراج و خالص سازی تاکسول از سرخدار، به‌دلیل عمل‌کرد پائین، بسیار سخت و هزینه بر است (۷ و ۸). در نتیجه برای حفاظت جهانی از درخت سرخدار و کم کردن فشار تاکسول بر روی منبع طبیعی آن، استفاده از روش‌های دیگری برای تولید صنعتی تاکسول ضروری به‌نظر می‌رسد. اولین بار در سال ۱۹۹۳ استیرل و همکاران (۹) به دنبال جستجوی منابع دیگری برای تامین نیاز روز افزون تاکسول توانستند یک سویه قارچ اندوفیت از سرخدار جداسازی کنند که قادر به تولید تاکسول در محیط کشت خود بود. این یافته منجر به آغاز تحقیقات بیشتر برای قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول در سراسر جهان گردید (۱۰، ۱۱ و ۱۲). تاکنون بیش از ۳۰ گونه قارچ اندوفیت مولد تاکسول شناسایی شده است (۱۳).

مقدار تاکسول تولید شده به وسیله اندوفیت‌ها در مقایسه با سرخدار نسبتا کم است. درنتیجه علاوه بر جستجو به دنبال

ایزوله‌های با عمل‌کرد بیشتر، دستکاری ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی تاکسول در سرخدار و قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از آن به‌عنوان یکی از روش‌های مناسب جهت افزایش میزان تولید تاکسول معرفی شده است (۱۴ و ۱۵). مسیر بیوسنتزی تاکسول در قارچ‌ها، برخلاف گیاهان، ناشناخته است. با شناسایی ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی تاکسول در قارچ‌های اندوفیت می‌توان نقاط مبهم این مسیر را روشن ساخت (۱۶) و از آن‌ها به‌عنوان نشانگر مولکولی برای غربال قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول استفاده کرد (۱۳). هم‌چنین با شناسایی این ژن‌ها می‌توان آن‌ها را در میکروارگانیسم‌های ساده‌تر و شناخته شده‌تر مانند باکتری *E. coli* یا مخمر *Saccharomyces cerevisiae* کلون کرد که هم مطالعه مسیر بیوسنتزی تاکسول را آسان نموده و هم راه را برای کارهای بیوتکنولوژیک بیشتر بر روی این ژن‌ها جهت افزایش عمل‌کرد این متابولیت باارزش هموارتر می‌کند (۱۳ و ۱۴).

در این پژوهش، یک ناحیه حفاظت شده از ژن *DBAT* سرخدار و قارچ اندوفیت مولد تاکسول (T9) جداسازی شده از آن‌به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شده و توالی یابی گردید. توالی به‌دست آمده از سرخدار و قارچ اندوفیت با یکدیگر و با سایر توالی‌های موجود در GenBank در سطح نوکلئوتید و اسیدآمینه مقایسه گردیده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی: نمونه برداری از درختان سرخدار جنگل‌های استان مازندران صورت گرفت. نمونه‌ها از نواحی سالم و فاقد نشانه‌های بیماری از پوست تنه اصلی و شاخه‌های جانبی درختان انتخاب و در پاکت‌های کاغذی سربسته به آزمایشگاه منتقل گردید.

جداسازی اندوفیت‌ها: پوست رویی نمونه‌ها با استفاده از تیغ اسکالپل حذف شده و پوست زیرین با استفاده از اتانول ۷۰ درصد (به مدت ۱/۵ دقیقه) و هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد (به مدت ۱۰ دقیقه)، جهت از بین بردن قارچ‌های اپی‌فیت و ساپروفیت، استریل گردید (۱۷). نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو و به قطعات کوچک‌تر تقسیم شدند. قطعات فوق برروی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar)، (Merck)، قرار داده شدند تا امکان رشد برای قارچ‌های اندوفیت فراهم گردد. قارچ‌های رشد کرده برروی محیط، با استفاده از روش نوک هیف به محیط PDA جدید منتقل و خالص سازی شدند (۱۸). در این مدت هر کدام از قارچ‌ها از نظر خلوص چک شده و درصورت مشاهده ناخالصی به محیط جدید منتقل گردیدند.

استخراج DNA ژنومی: جهت استخراج DNA ژنومی ابتدا دو قطعه حدودا ۱ × ۱ سانتی‌متر مربعی از کشت جامد قارچ جدا گردیده و در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB (Potato dextrose broth)، (Scharlau) قرار داده شد. ارلن کشت شده به مدت یک هفته برروی شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰ rpm نگه‌داری گردید. پس از گذشت این مدت، محیط مایع با استفاده از کاغذ صافی ۴ لایه فیلتر شده و میسیلیوم قارچی به‌دست آمده دو بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. ۰/۵ تا ۱ گرم از میسیلیوم با استفاده از نیتروژن مایع کاملا پودر گردید. جهت استخراج DNA ژنومی سرخدار ۰/۵ تا ۱ گرم از برگ تازه با استفاده از نیتروژن مایع پودر گردید. استخراج DNA ژنومی قارچ و گیاه به روش CTAB (۱۹) تغییریافته انجام گرفت.

PCR و الکتروفورز: جهت بررسی حضور ژن *DBAT* در نمونه‌ها از پرایمرهای اختصاصی استفاده گردید (۱۳). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با ۱ واحد آنزیم ExPrime (Genet Bio) انجام گرفت. مخلوط PCR به مدت ۶ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۵ سیکل در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۴۸، ۵۰ و ۵۲ درجه سانتی‌گراد (شیب دمایی) به مدت ۵۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه انکوبه شد. آنالیز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد و دستگاه الکتروفورز (Bio Rad) صورت گرفت. توالی یابی محصولات PCR توسط شرکت Bioneer (کره جنوبی) انجام گرفت.

مقایسه توالی‌ها: توالی‌های به‌دست آمده از ژن *DBAT* سرخدار و ایزوله T9 با استفاده از نرم افزار MegAlign از مجموعه DNASTAR V.7 مقایسه شد. توالی‌های مذکور با توالی‌های ثبت شده در GenBank نیز مقایسه گردید. برای این منظور توالی مربوط به *DBAT* سرخدار و ایزوله T9 با استفاده از BLASTN با توالی‌های ثبت شده هم‌ردیف گردیدند. از بین نتایج هم‌ردیفی، برخی از توالی‌های مربوط به گونه‌های مختلف سرخدار و قارچ‌های اندوفیت، انتخاب و ذخیره شدند. این توالی‌ها

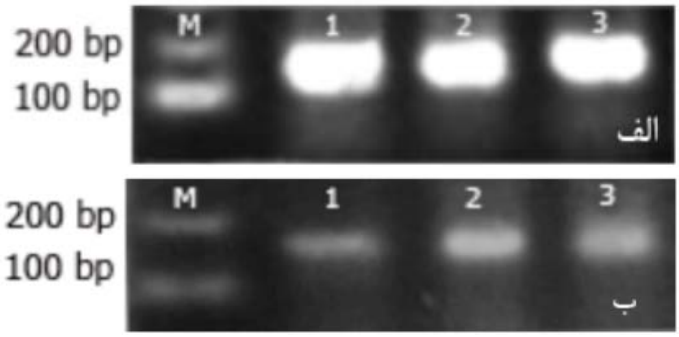
با استفاده از نرم افزار MegAlign مورد هم‌ردیفی چندگانه قرار گرفتند. با داشتن توالی نوکلئوتیدی *DBAT* در سرخدار و ایزوله T9، توالی آمینواسیدی با استفاده از نرم‌افزار BLASTX مورد بررسی قرار گرفت. از بین نتایج هم‌ردیفی، توالی‌های پروتئینی برخی گونه‌های سرخدار و قارچ اندوفیت ثبت شده در GenBank انتخاب شده و برای بررسی‌های بیشتر به‌وسیله نرم افزار MegAlign، ذخیره گردید. در نهایت هم‌ردیفی چندگانه بین توالی‌های آمینواسیدی با استفاده از نرم افزار MegAlign انجام شد.

نتایج

ایزوله T9، از قارچ‌های اندوفیت مولد تاکسول، جهت بررسی حضور ژن *DBAT* مورد استفاده قرار گرفت (۲۰). DNA ژنومی استخراج شده از سرخدار و ایزوله T9 با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرارگرفت (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج اسپکتروفتومتری DNA ژنومی استخراج شده از برگ سرخدار و ایزوله T9 به روش CTAB تغییر یافته

نمونه	۲۶۰/۲۸۰	۲۶۰/۲۳۰	کمیت(ng/µl)
برگ سرخدار	۲/۰۴	۱/۹۶	۸۷۰
میسیلیوم ایزوله قارچ اندوفیت T9	۱/۸۴	۱/۶۷	۲۷۴۰



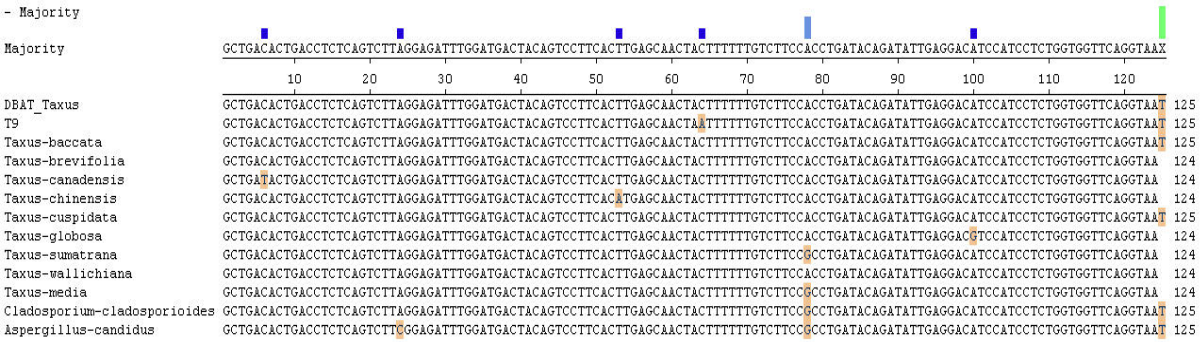
شکل ۲: نتایج PCR بررسی حضور ژن DBAT در ژنوم درخت سرخدار (الف) و ایزوله اندوفیت مولد تاکسول T9 (ب). چاهک M، مارکر. چاهک ۱، ۲ و ۳ به ترتیب شیب دمایی ۴۸، ۵۰ و ۵۲ درجه سانتی‌گراد برای دمای اتصال.

یک ناحیه از ژن *DBAT* سرخدار و ایزوله T9 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی تکثیر شد. نتایج الکتروفورز حضور تک باند حدودا ۱۵۰ bp را در نتایج PCR نمونه‌های DNA سرخدار و ایزوله T9 نشان داد (شکل ۲). وضوح باندها و عدم وجود اسمیر و چندباندی نشان دهنده شرایط تکثیر مناسب بود.

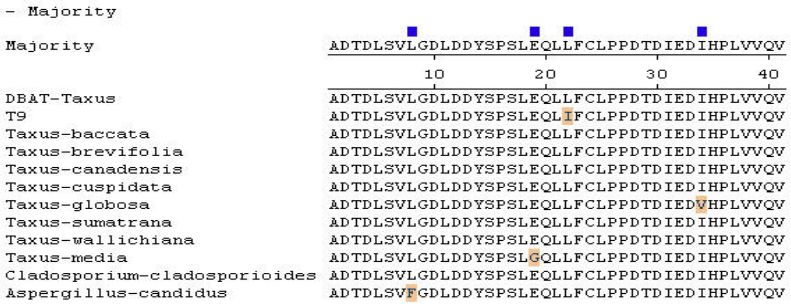
پس از توالی یابی محصول PCR نمونه‌های سرخدار و ایزوله T9 و حذف چند نوکلئوتید ابتدایی و انتهایی، قطعه‌ای به طول ۱۲۵ نوکلئوتید برای هردو نمونه بدست آمد. نتایج همردیفی توالی مربوط به سرخدار و ایزوله T9 نشان داد که نوکلئوتید ۶۴ در دو توالی متفاوت است. با انجام همردیفی چندگانه مشخص شد که توالی مربوط به *T. baccata*، *T. cuspidata*، *T. wallichiana* و *T. brevifolia* با توالی ژن *DBAT* سرخدار دارای شباهت ۱۰۰ درصدی و با توالی مربوط به ایزوله T9 شباهت ۹۹ درصدی است. همچنین گونه‌های *T. media*، *T. chinensis*، *T. Canadensis*، *T. sumatrana* و *T. globosa*، ۹۹ درصد با توالی سرخدار و ۹۸ درصد با توالی ایزوله T9 شباهت داشتند. در پایگاه GenBank دو توالی ژن *DBAT* مربوط به قارچ‌های اندوفیت نیز یافت شد، توالی مربوط به قارچ *Cladosporium cladosporioides* که دارای شباهت ۹۹ درصدی با توالی مربوط به سرخدار و ۹۸ درصدی با ایزوله T9 و نیز توالی مربوط به *Aspergillus candidus* که دارای شباهت ۹۸ درصد با هردو توالی مورد بررسی بود ($E\ Value < 10^{-55}$) (شکل ۳).

نتایج BLASTX نشان داد که توالی پروتئینی کدشده به وسیله توالی DNA بدست آمده از سرخدار و ایزوله T9 در اسیدآمینه موقعیت ۲۲ با هم متفاوت هستند ($E\ Value < 10^{-18}$). همچنین مشخص شد که توالی اسیدآمینه‌ای مربوط به سرخدار

بـا تـوالی گونـه‌هـای *T. baccata*، *T. cuspidata*، *T. wallichiana*، *T. Canadensis*، *T. sumatrana* و *T. brevifolia* و نیز با توالی پروتئینی قارچ *C. cladosporioides* کاملا مشابه است. اما با توالی مربوط به گونه‌های *T. globosa* و *T. media* و نیز توالی قارچ *A. candidus* در یک اسـید آمینـه اختلاف دارد (شکل ۴).



شکل ۳: هم‌ردیفی چندگانه توالی نوکلئوتیدی ژن DBAT سرخدار و ایزوله مولد تاکسول T9 با توالی‌های ثبت شـده در بانـک ژن. شـماره دسـت‌یـابی تـوالی‌هـای هـم‌ردیـف شـده بـه صـورت زیـر اسـت: (JQ611238) Taxus baccata، (EU107143) Taxus brevifolia، (EU107134) Taxus canadensis، (AY544993) Taxus chinensis، (JQ611268) Taxus cuspidata، (EU107145) Taxus globosa، (EU107144) Taxus sumatrana، (EU107142) Taxus wallichiana، (AY452666) Taxus x media، (EU375527) Cladosporium cladosporioides، (EU883596.3) Aspergillus candidus



شکل ۴: هم‌ردیفی چندگانه توالی اسیدآمینه‌ای ژن DBAT سرخدار و ایزوله مولد تاکسول T9 با توالی‌های ثبت شـده در بانـک ژن. شـماره دسـت‌یـابی تـوالی‌هـای هـم‌ردیـف شـده بـه صـورت زیـر اسـت: (AAL57617) Taxus baccata، (ABW84244) Taxus brevifolia، (ABW84235) Taxus canadensis، (AFJ04857) Taxus cuspidata، (ABW84246) Taxus globosa، (ABW84245) Taxus sumatrana، (ABW84243) Taxus wallichiana، (ABK41194) Taxus x media، (ACA48517) Cladosporium cladosporioides، (ACI47063) Aspergillus candidus

بحث

با توجه به نتایج الکتروفورز و اسپکتروفتومتری، مشخص شد کـه استخراج DNA ژنومی از برگ‌های سرخدار و میسـیلیوم ایزولـه قارچی از کمیت و کیفیت بالایی برخوردار بود. کمتر بودن میزان DNA استخراج شده از برگ‌های سرخدار را می‌تـوان بـه وجـود متابولیت‌های ثانویه و مواد موسیلاژی زیاد در بافت برگ و ایجـاد اختلال در فرایند استخراج DNA مرتبط دانسـت (۲ و۳). نتـایج الکتروفورز نشان داد که ۵۰ درجه سانتی‌گراد بهترین دما جهـت اتصال پرایمرها بود. زانگ و همکاران (۱۳) نیز در پـژوهش خـود ۵۰ درجه سانتی‌گـراد را به‌عنـوان دمـای اتصـال پرایمرها معرفی کردند.

ژن *DBAT*، کد کننده یکی از آنزیم‌های مهم و کلیدی در مسـیر بیوسنتزی تاکسول است که تشکیل باکاتین-III، آخرین واسـطه دی‌ترپن در مسیر بیوسنتزی سـرخدار، را کاتـالیز مـی‌کنـد (۵). توالی ژنومی کامل این ژن تاکنون تنها برای یک گونـه از جـنس سـرخدار (*T. media*) شناسـایی و تـوالی یـابی شـده اسـت. پرایمرهای طراحی شده بر اساس ایـن ژن یـک ناحیـه حفاظـت شـده از نـواحی ابتـدایی آن‌را تکثیـر مـی‌کنـد. بنـابراین از ایـن پرایمرها در این تحقیق نیز استفاده شـد. PCR انجـام شـده بـه وسیله این پرایمرها یک قطعه حدودا ۱۵۰ bp را تکثیر کردند که

پس از توالی یابی و حذف چند نوکلئوتید ابتدایی و انتهایی (به دلیل وجود خطا در ابتدا و انتهای قطعه در فرایند توالی یابی) یک قطعه به طول ۱۲۵ نوکلئوتید از هرکدام از نمونه‌های مورد بررسی بدست آمد. زانگ و همکاران (۱۳) با استفاده از این پرایمرها یک قطعه از ژن *DBAT* را (بدون مشخص کردن توالی) در قارچ‌های اندوفیت تکثیر کردند. والکر و کروتائو (۲۱) اولین بار توالی mRNA ژن *DBAT* را از *T. cuspidata* جداسازی و توالی آن را مشخص کردند.

نتایج بررسی‌های هم‌ردیفی مشخص کرد که این قطعه نوکلئوتیدهای ۳۱۶ تا ۴۴۰ ژن *DBAT* را شامل می‌شود و نیز مشخص شد که آخرین نوکلئوتید از این قطعه، اولین نوکلئوتید تنها اینترون ژن *DBAT* است (۴۴۰ تا ۶۶۳). شباهت بین توالی به‌دست آمده از سرخدار با توالی به‌دست آمده از ایزوله مولد تاکسول T9 بسیار بالا (۹۹ درصد) بود. زانگ و همکاران (۱۶) شباهت بالای توالی ژن *DBAT* به‌دست آمده از قارچ اندوفیت مولد تاکسول (*A. candidus*) را با میزبان آن گزارش کردند. با انجام هم‌ردیفی چندگانه مشخص گردید که شباهت توالی به‌دست آمده از سرخدار با توالی گونه‌های دیگر نیز بسیار بالا است (۹۹ تا ۱۰۰ درصد). شباهت توالی سرخدار و ایزوله T9 با دو قارچ اندوفیت بررسی شده نیز بسیار بالا بود.

بررسی‌های بیشتر به وسیله BLASTX انجام گرفت که این امکان را فراهم می‌کند که با استفاده از توالی نوکلئوتیدی، توالی‌های اسیدآمینه‌ای مشابه جستجو گردد. با این کار تاثیر یا عدم تاثیر اختلافات موجود در توالی نوکلئوتیدی بر توالی پروتئینی مشخص می‌گردد. نتایج نشان داد که این قطعه ۴۱ اسیدآمینه در چهارچوب خوانش ۱+، از ۱۰۶ تا ۱۴۶، کد می‌کند. شباهت بین توالی آمینواسیدی سرخدار با ایزوله T9 بسیار بالا بوده و تنها اختلاف آن‌ها در آمینواسید موقعیت ۲۲ مشاهده شد، که در اثر جایگزینی یک نوکلئوتید A به جای C در موقعیت ۶۴ توالی نوکلئوتیدی و تغییر کدون از CTT (L) به ATT (I) به وجود آمده بود. البته تبدیل شدن آمینواسید لوسین به ایزولوسین به‌دلیل شباهت ساختاری و خصوصیات بیوشیمیایی این دو اسیدآمینه، احتمالا نمی‌تواند تغییر عمده‌ای در ساختار و عمل پروتئین حاصله بوجود آورد. همچنین مشخص شد که اختلافات موجود در توالی نوکلئوتیدی گونه‌های *T. Canadensis*، *T. sumatrana* و *C. cladosporioides* بر توالی آمینواسیدی آن‌ها تاثیری نداشته است که دلیل این امر، کد شدن یک اسیدآمینه به وسیله چند کد ژنتیکی متفاوت است.

بررسی‌ها نشان داد که ژن *DBAT* شباهت بالایی (۶۵ تا ۸۰ درصد) هم در سطح نوکلئوتیدی و هم در سطح آمینواسیدی با توالی ژن‌های مربوط به سایر آسیل و آروئیل ترانسفرازهای درگیر در مسیر بیوسنتزی تاکسول دارد. والکر و کروتائو (۲۱) و والکر و همکاران (۲۲) وجود شباهت درسطح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های اسیل و آروئیل ترانسفراز درگیر در مسیر بیوسنتزی تاکسول را گزارش کردند. از این شباهت بالا می‌توان در طراحی پرایمر و پروب جهت غربال کتابخانه cDNA در شناسایی آسیل و آروئیل ترانسفرازها استفاده کردند.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش حضور ژن *DBAT* در قارچ اندوفیت تولید کننده تاکسول (T9) و *Taxus baccata* را به اثبات رسانده و مشخص کرد که شباهت بسیار بالایی، هم درسطح نوکلئوتیدی و هم در سطح آمینواسیدی، بین توالی بدست آمده از سرخدار و ایزوله T9 وجود دارد. بررسی‌های بیشتر نشان داد که این توالی‌ها و توالی‌های مربوط به ژن *DBAT* گونه‌های مختلف سرخدار و قارچ‌های اندوفیت تولید کننده تاکسول که در بانک ژن ثبت گردیده‌اند دارای شباهت بسیار زیادی هستند. همچنین شباهت بالایی بین ژن *DBAT* و سایر آسیل و آروئیل ترانسفرازهای درگیر در مسیر بیوسنتزی تاکسول دیده شد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاری متخصصین اداره کل منابع طبیعی شهرستان نوشهر بویژه آقای مهندس خدابخش و نیز از خانم مهندس یوسفی پور که در نمونه برداری از گیاهان سرخدار با این گروه همکاری کردند صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند. شایان ذکر است که این مقاله قسمتی از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده و بودجه پژوهشی آن از طرف دانشگاه بوعلی سینا تامین شده است.

منابع

1. Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, et al. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc. 1971; 93(9): 2325-2327.

2. Itokawa, H. Taxoids occuring in the genus *Taxus* In: Itokawa, H. & Lee, K.H. (eds) Taxus – The Genus Taxus. London: Taylor & Francis; 2003; 35-78.

3. Baloglu E, Kingston DG. The taxane diterpenoids. J Nat Prod. 1999; 62(10): 1448-1472.

4. Jennewein S, Wildung MR, Chau M, Walker K, et al. Random sequencing of an induced *Taxus* cell cDNA library for identification of clones involved in taxol biosynthesis. Proc Natl Acad Sci. 2004; 101(24): 9149-9154.

5. Croteau R, Ketchum RB, Long RM, Kaspera R, et al. Taxol biosynthesis and molecular genetics. Phytochem Rev. 2006; 5(1): 75-97.

6. Guo BH, Kai GY, Jin HB, Tang KX. Taxol synthesis. Afr J Biotechnol. 2006; 5(1): 15-20.

7. Muthumary J, Sashirekha S. Detection of taxol, an anticancer drug, from selected coelomycetous fungi. Indian J Sci Technol. 2007; 1(1): 1-10.

8. Heinig U, Jennewein S. Taxol: A complex diterpenoid natural product with an evolutionary obscure origin. Afr J Biotechnol. 2009; 8(8): 1370-1385.

9. Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. Science. 1993; 260: 214-216.

10. Strobel G, Yang X, Sears J, Kramer R, et al. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. Microbiology. 1996; 142(1): 435-440.

11. Ge J, Ping W, Zhou D. Characterization of a new species of taxol-producing fungus. Nat Sci. 2004; 2(1): 85-88.

12. Kumaran RS, Choi YK, Lee S, Jeon HJ, et al. Isolation of taxol, an anticancer drug produced by the endophytic fungus, *Phoma betae*. Afr J Biotechnol. 2012; 11(4): 950-960.

13. Zhang P, Zhou P, Jiang C, Yu H, et al. Screening of taxol-producing fungi based on PCR amplification from *Taxus*. Biotechnol Lett. 2008; 30(12): 2119-2123.

14. DeJong J, Liu Y, Bollon A, Long R, et al. Genetic engineering of taxol biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng. 2005; 93(2): 212-224.

15. Ajikumar PK, Xiao WH, Tyo KE, Wang Y, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. Science. 2010; 330(6000): 70-74.

16. Zhang P, Zhou P, Yu L. An endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. Curr Microbiol. 2009; 59(3): 227-232.

17. Caruso M, Colombo AL, Fedeli L, Pavesi A, et al. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. Ann Microbiol. 2000; 50(1): 3-14.

18. Miao Z, Wang Y, Yu X, Guo B, et al. A new endophytic taxane production fungus from *Taxus chinensis*. Appl Biochem Microbiol. 2009; 45(1): 81-86.

19. Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 1987; 19: 11-15.

20. Seifi M, Nazeri S, Soltani J. Presence of the DBAT gene and in vitro production of Taxol in endophytic fungi isolated from Iranian yew (*Taxus baccata*). KAUMS J. (FEYZ). 2013; 17 (3): 255-260.

21. Walker K, Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetylbaccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci. 2000; 97(2): 583-587.

22. Walker KD, Fujisaki S, Long RM, Croteau R. Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in taxol biosynthesis. Proc Natl Acad Sci. 2002; 99(20): 12715-12720.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Summer 2013; 4(2): 197-203

Original Article

Comparison of DBAT Gene Sequence, in Nucleotide and Amino Acid Level, in Yew Species and Fungal Endophytes

Seifi M.[1], Nazeri S. Ph.D.[2*], Soltani J. Ph.D.[3], Chehregani Rad A. Ph.D.[4]

1. M.Sc. Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
2. Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan
4. Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan

* Email corresponding author: snblnazeri@yahoo.com

Received: 20 Nov. 2012 Accepted: 12 Feb. 2013

Abstract

Aim: The aim of this study was investigation of the presence *DBAT* gene, a key gene in the biosynthetic pathway of taxol, in yew (*Taxus baccata*) and its taxol producing endophytic fungus and also assessment the similarity of these sequences with sequences available in GenBank.

Material and Methods: In this study, endophytic fungi were isolated from the bark of *Taxus baccata* and purified, using hyphal tip method. Genomic DNA of yew tree and a taxol producing fungus (T9 isolate) was extracted. Using polymerase chain reaction, presence of *DBAT* gene was investigated. After sequencing, similarity of sequences obtained from yew and T9 isolate with other taxus species and endophyticn fungi sequences, available in GenBank, were compared.

Results: Using specific primers, a 125 bp fragment of *DBAT* gene from *Taxus baccata* and T9 isolate was amplified. Nucleotide and amino acid sequences alignment showed that theses sequences had a high similarity (over 98%) in fungus and host plant. Alignment results of these sequences with other species of yew trees and endophytic fungi sequences also showed very high similarity (98-100%). Besides, relatively high similarity between the nucleotides and amino acid sequences of *DBAT* and other acyl/aroyltransferases enzymes involved in taxol biosynthesis were observed.

Conclusion: Based on the results, the presence of *DBAT* gene in taxol producing endophytic fungus and also very high homology of its sequence, in nucleotide and amino acid levels, with host plant (*Taxus baccata*) and other yew species and fungal endophytes were proved.

Keywords: Taxol, Fungi, *Taxus baccata*, *DBAT* gene