اندوفیت های گیاهی منبعی جدید برای تولید ترکیبات دارویی

محمد حسین میرجلیلی[1*]

۱-استادیار فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی.

*نویسنده مسئول: m-mirjalili@sbu.ac.ir

چکیده

متابولیت‌های ثانویه (Secondary metabolites)، ترکیبات طبیعی شگفت انگیز با وزن مولکولی پایین هستند که تا کنون صدها نوع از آنها در گیاهان شناسایی شده و امروزه جهت تولید داروهای نوین مورد استفاده قرار می‌گیرند. بسیاری از این ترکیبات، ساختار پیچیده‌ای دارند که تولید تجاری آن‌ها از طریق سنتز شیمیایی، پر هزینه و در برخی از موارد غیرممکن بوده و همین دلیل، به صورت داروی توسعه نیافته باقی مانده‌اند. امروزه با استفاده از روش‌های نوین بیوتکنولوژی از جمله تکنیک‌های کشت درون شیشه‌ای، انتقال ژن، مهندسی متابولیت و زراعت مولکولی، تولید این ترکیبات دارویی در گیاهان بهبود یافته‌اند ولی هنوز چالش‌های زیادی از مرحله انتخاب مواد گیاهی تا ارزیابی هویت ژنتیکی، مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه، بهینه سازی شرایط کشت‌های کنترل شده و در نهایت تولید تجاری آنها وجود دارد. در میان منابع مختلف برای تولید این ترکیبات، میکروارگانیسم‌ها یک منبع مناسب و سهل‌الوصول هستند که اندوفیت (درون‌زی)ها، جزء پنهان این گروه از موجودات محسوب می‌شوند. اندوفیت‌ها پتانسیل شگفت انگیزی به عنوان یک منبع هدف‌دار دارویی دارند چرا که از ظرفیت سنتز ترکیبات آلی با ویژگی‌های ساختاری متنوع برخوردار می باشند. بررسی ترکیبات اندوفیتی، به ویژه اندوفیت‌های قارچی، منجر به کشف محصولات طبیعی با ساختاری نوین و فعالیت‌های بیولوژیکی جالب توجه شده است. اندوفیت‌ها سرعت رشد قابل توجهی دارند، کم هزینه هستند و از همه مهم‌تر متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی را کاملاً مشابه با میزبان خود تولید می‌کنند، بنابراین منابع ارزشمندی به حساب می‌آیند و مطالعات بیشتری جهت رفع مشکلات آن‌ها باید صورت پذیرد. این مقاله به پیشرفت‌های اخیر در جداسازی، معرفی و بهره‌برداری از اندوفیت‌های گیاهی به عنوان منابعی جدید در تولید متابولیت‌های ثانویه می‌پردازد.

کلمات کلیدی: گیاهان دارویی، میکروارگانیسم، اندوفیت، قارچ، باکتری، متابولیت‌های ثانویه

مقدمه

گیاهان طیف گسترده‌ای از مواد بیوشیمیایی را تولید می‌کنند که از دیرباز مورد استفاده بشریت قرار گرفته‌اند. گروهی از مواد شیمیایی تولید شده توسط گیاهان، آلکالوئیدها، آنتراکوئینون‌ها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، و ترپن‌ها هستند که استفاده قابل توجهی از آنها در صنایع داروسازی، آرایشی و بهداشتی، غذایی و همچنین تولید سموم بیولوژیک کشاورزی وجود دارد. اغلب متابولیت‌های ثانویه ارزشمند از فراوانی کمی در طبیعت برخوردار هستند و با توجه به دارا بودن مراکز کایرال (Zhou و همکاران، ۲۰۰۹)، سنتز شیمیایی آنها به سختی انجام می‌شود بطوریکه ساخت آنها به منظور تولید تجاری پر هزینه است. امروزه استخراج این ترکیبات از گیاهان چه انواع وحشی و خودرو و چه انواع زراعی و کاشته شده، از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد. به عنوان مثال برای استخراج یک کیلوگرم از ترکیب ضد سرطان تاکسول (پاکلی‌تاکسل)، در حدود ۱۰ تن ماده گیاهی از درخت سرخدار لازم است. بدلیل ارزش بالای محصولات گیاهی و عدم اطمینان برداشت آنها از منابع طبیعی برای برآوردِ نیازهای صنایع داروسازی، باید با طبیعت مهربان بود و بدنبال محصولات تجدید پذیر باشیم. محدودیت منابع آب و عرصه های زراعی برای تولید از یکسو و نیاز روزافزون جامعه جهانی به داروهایی با منشاء طبیعی و فاقد اثرات جانبی از سویی دیگر، ضرورت استفاده از روش های نوین از جمله اندوفیت‌های گیاهی در جهت افزایش راندمان تولید متابولیت های دارویی از منابع طبیعی را نمایان می سازد. اندوفیت‌ها به موجوداتی اطلاق می‌شود که بین سلول‌های گیاه زنده زندگی می‌کنند. رابطه‌ای که آن‌ها با گیاه

برقرار می‌کنند از همزیستی تا مرز بیماری‌زایی متفاوت است. انـدوفیت (Endophyte) بـه معنـای " درون گیـاه " (endon = درون، phyton = گیاه) می‌باشد. استفاده از این واژه طیف وسیعی از موجودات نظیر باکتری، قارچ ، گیاهان و حشرات درون گیاهان را در بر می‌گیرد. آن‌ها در هر ارگانی از میزبان می‌توانند ساکن شوند. اندوفیت واژه‌ای اسـت، کـه بـه عنـوان مثـال، مـورد اسـتفاده بـرای جلبک‌ها و گیاهان اندوفیتی انگلی، همزیستی باکتری اندوفیتی و قارچی و باکتری‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا در فاز رشدی نهفته است اما همچنین برای میکروارگانیسم‌های همزیست نیز استفاده می‌شـود. برخـی از نویسـندگان نیـز اثـر متقابـل قـارچ‌هـای میکـوریزا بـا ریشه‌های میزبان خود را به عنوان اندوفیت معرفی می‌کنند (Sieber, 2002). امـروزه از واژه انـدوفیت بـرای توصـیف بـاکتری‌هـا و قارچ‌هایی به کار می‌رود که می‌توانند در یک زمان خاص در بافت میزبان گیاهی به ظاهر سالم زنـدگی کننـد (Schulz & Boyle, 2005). معمولاً رشد اندوفیت‌ها در مقایسه با بافت های گیاهی بیشتر بوده و کشـت آنهـا آسـان تـر اسـت. توانـایی تولیـد برخـی از متابولیت‌های ثانویه گیاهی توسط اندوفیت‌ها شناسایی و تایید شده است. آلکالوئیـدها، اسـتروئیدها، ترپنوئیـدها، ایزوکومـارین‌هـا، کوئینون‌ها، فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئیدها، لیگنان‌ها، پپتیدها، فنولیک‌ها، آلیفاتیک‌ها و ترکیبات آلی فرار متابولیت‌های ارزشمندی هستندکه تولید آنها توسط اندوفیت‌های گیاهی می‌تواند بسیار مورد توجـه قـرار گیـرد (Tan & Zou, 2001, Gunatilaka, 2006, Zhang *et al*., 2006). جالب است که بسیاری از این ترکیبات، همان ترکیباتی است که توسط گیاهان تولید مـی‌شـوند، ایـن نشـان می‌دهد که، ممکن است بحث تقابل ژنتیکی بین میزبان و اندوفیت‌ها شکل گرفته باشد.

جدول ۱- برخی از ترکیبات بسیار جالب تولید شده توسط اندوفیت‌های گیاهی (Kumara *et al*., 2014)

ترکیب تولید شده توسط موجودات درون‌زی گیاهی (اندوفیت‌ها)	کاربرد
Taxol	اولین و پرفروشترین داروی ضد سرطان در جهان
Cryptocin	داروی ضد قارچ
Cryptocandin	یک مولکول با خواص ضد قارچی قوی
Jesterone	داروی ضد قارچ
Oocydin	داروی ضد قارچ
Isopestacin	آنتی اکسیدان
Munumbicins	طیف گسترده‌ای از آنتی بیوتیک‌ها
Kakadumycin	آنتی بیوتیک
Pseudomycins	عوامل ضد قارچ جهت استفاده‌ی انسان
Ambuic acid	داروی ضد قارچ

اندوفیت‌های باکتریایی

به طور کلی باکتری اندوفیت به عنوان باکتری توصیف شده است که قادر است بدون آن‌که به گیاه ضرر برساند، در بافت‌های گیاهان زنده سکونت کند (Kado, 1992). تا کنون بیش از ۱۲۹ گونه، از بیش از ۵۴ جنس باکتری به همراه *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, و *Agrobacterium* از بافت‌های داخلی گیاهان سالم جداسازی و این چهار جنس بیشترین جنس باکتری‌هایی هستند که تاکنون جدا شده است. باکتری اندوفیتی معمولاً از ریزوسفر، دانه‌ها یا مواد گیاهی (برگ، شاخه و سایر بخش‌های گیاه) جدا می‌شود (Hallmann *et al*., 1997). یک قسمت از ریزوباکتریا ممکن است به وسیله فرایند هیدرولیز سلولز دیواره سلولی، از طریق غده‌ها، همراه جریان آب از طریق خراش‌ها یا از طریق انشعابات جانبی به درون بخش‌های داخلی ریشه وارد شود (Siciliano *et al*., 1998). در نتیجه‌ی ارتباط بین باکتری و گیاه، این احتمال وجود دارد که بعضی از باکتری‌های اندوفیتی، سیستم‌های ژنتیکی‌شان را به نحوی شکل داده‌اند که به انتقال اطلاعات بین آن‌ها و گیاهان عالی و بر عکس اجازه می‌دهد (Stierle *et al*., 1993). مشخص شده است که باکتری اندوفیتی به وسیله تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به رشد و توسعه گیاه

میزبان کمک می‌کند. باکتری‌های اندوفیتی مقاومت گیاه میزبان را در برابر عوامل بیماری‌زا زیاد می‌کند و به صورت بیولوژیکی میگررگانیسم‌های افزایش دهنده‌ی تثبیت نیتروژن را زیاد و همچنین آنتی‌بیوتیک‌ها را تولید می‌کنند (Rathod *et al*., 2013). محدوده‌ی گونه‌های باکتریایی جدا شده از کشت بافت گیاهی، وسیع است و*Paenibacillus*، *Bacillus*، *Pseudomonas*، و *Methylobacterium* رایج‌ترین جنس‌ها گزارش شده از این کشت‌ها می-باشند (Ulrich *et al*., 2008). اخیراً باکتری اندوفیتی در بافت آوندی نهنج و در سلول‌های فندقه‌های توت فرنگی نارس شناسایی شده است که بیوسنتز ترکیبات عطری را انجام می‌دهد.

۳- اندوفیت‌های قارچی

قارچ‌های اندوفیتی، اغلب به عنوان قارچ‌های بدون علامت که در همه‌ی گیاهان می‌توانند باشند، اطلاق می‌شوند. آن‌ها در فضای درون سلولی ساقه‌ها، گوشوارک‌ها، ریشه‌ها و برگ‌های گیاهان بدون ایجاد هیچ گونه اثرات منفی آشکار، سکونت می‌کنند (Bacon & White, 2000). تقریباً بدون استثنا، اندوفیت‌ها از تمام گیاهان و بخش‌هایی از گیاهانی که مورد بررسی قرار گرفته شده، گزارش شده است. گیاهان چوبی و یا درختان اغلب اندوفیت‌های متنوع‌تری در مقایسه با گیاهان علفی دارند (Arnold *et al*., 2000). اندوفیت‌ها ممکن است، به صورت افقی از طریق اسپورهای موجود در هوا یا به صورت عمودی از طریق بذور منتقل شوند (Hartley & Gange, 2009). همانند دیگر قارچ‌ها، قارچ‌های اندوفیتی هتروتروف‌اند و سوخت و سازشان را از گیاهان میزبان تأمین می‌کنند. Petrini و همکاران، (1992). گزارش کردند که ممکن است بیش از یک نوع قارچ اندوفیت درون یک گیاه منفرد یافت شود (Petrini *et al*., 1992). به طور مثال، ۱۳ تاکسا قارچ اندوفیت از برگ، ساقه و ریشه بافت‌های گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) جدا شد. در مطالعه‌ای دیگر، ۴۹ قارچ اندوفیت از گیاه *Saussurea involucrate* جمع‌آوری و با استفاده از تکنیک‌های مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی و گزارش شده است. در بین این قارچ‌ها، *Cylindrocarpon* sp. ، غالب‌ترین گونه و به دنبال آن گونه‌های *Phoma* sp. و *Fusarium* species بودند (Lv *et al*., 2010). Stierle و همکاران (1993) برای اولین بار نشان دادند که قارچ اندوفیتی، *Taxomyces andreanae*، جدا شده از گیاه *Taxus brevifolia*، تاکسول نیز تولید می‌کنند (Stierle *et al*., 1993). تاکسول یک ترکیب ضد سرطان با ارزش است، که فقط توسط گیاه سرخدار تولید می‌شود، این مسیر علاقه‌ی بی‌سابقه‌ای نسبت به قارچ‌های اندوفیتی را به وجود آورد به ویژه که این که احتمال وجود دارد بتوان اندوفیت‌ها را به عنوان منابع جایگزین متابولیت‌های گیاهی قرار داد (Rubini *et al*., 2005 , Mirjalili et al., 2012). در جدول ۲ به برخی از قارچ‌های اندوفیت تولید کننده تاکسول اشاره شده است. گزارشات موجود نشان می‌دهد که متابولیت‌های ثانویه‌ی تولید شده توسط اندوفیت‌ها به تقلید از میزبانشان است و عیناً همان متابولیت تولید شده در آن گیاه خاص را تولید می‌کنند. این متابولیت‌ها علاوه بر تاکسول شامل، کامپتوتسین، پودوفیلوتوکسین، وینبلاستین، هیپریسین، دیوسگنین، آزادیراختین و روهیتوکین می‌باشد. ۱۹ جنس از قارچ‌های اندوفیتی (*Alternaria*، *Aspergillus*، *Botryodiplodia*، *Botrytis*، *Cladosporium*، *Ectostroma*، *Fusarium*، *Metarhizium*، *Monochaetia* ، *Mucor*، *Ozonium*، *Papulaspora*، *Periconia*، *Pestalotia*، *Pestalotiopsis*، *Phyllosticta*، *Pithomyces*، *Taxomyces* و *Tubercularia*) جدا شده از گیاهان تولید کننده تاکسول برای تولید تاکسول و آنالوگ‌های آن گزارش شده است (Zhao *et al*., 2010). در حال حاضر، توسعه و استفاده از قارچ های درون زی تولید کننده تاکسول در سراسر جهان به طور قابل توجهی افزایش یافته است. در جدول ۲ به برخی از این قارچ‌ها اشاره شده است. پیش بینی می‌شود در صورتیکه با روش‌های بیوتکنولوژیکی بتوان تولید یک متابولیت ثانویه (به عنوان مثال تاکسول) توسط قارچ-های اندوفیت را بهبود بخشید، می‌توان به تولید تجاری و مقرون به صرفه آنها امیدوار بود. علاوه بر این، بهینه سازی شرایط فرمنتاسیون می تواند تولید متابولیت ثانویه توسط اندوفیت‌ها را افزایش دهد.

٤- چالش‌های پیش رو در بهره‌برداری از اندوفیت‌های گیاهی

اندوفیت‌ها گروه متنوعی از موجودات پروکاریوتی (باکتری یا سیانوباکتری‌ها) و یا یوکاریوتی (قارچ یا گیاهان آوندی انگلی) هستند که به صورت گروه مادام العمر در بافت گیاهان زندگی می‌کنند. بوم شناختی، این انجمن‌ها به صورت یک ارتباط دوطرفه است. حال سؤال است که چگونه اندوفیت‌ها با میزبانان ارتباط دارند و خودشان را در میزبان قسمت‌بندی می‌کنند، چگونه این موجودات از مواد مغذی، تغذیه‌های زیستی به دست می‌آورند، و آیا اثرات نهایی دیده شده، حاصل جمع‌آوری مواد غذایی خاص است؟ علاوه بر این، آیا تفاوت اساسی بین اندوفیت‌های باکتریایی و اندوفیت‌های قارچی وجود دارد؟ اثرات مطلوب تعاملات میزبان با اندوفیت تحت تاثیر چه چیزی است و چگونه ثبات سیستم را تحت تاثیر قرار می‌دهد؟ بنابراین، چالش‌های آینده وابسته به شناسایی کردن، مشخص کردن، تشریح کردن، و تعیین مکانیسم‌هایی است که به موجب آن میزبان و همزیست‌های خود به این شیوه‌ی زندگی نادر می‌رسند. تعریف این مکانیسم‌های بیولوژیکی، برنامه‌های کاربردی فناورانه‌ی موفق حال و آینده‌ی اندوفیت‌های گیاهی را تضمین خواهد کرد. اهمیت در پایداری بیشتر و افزایش نگرانی عمومی برای خطرات مرتبط با آفت‌کش‌های شیمیایی ، باعث یک خیزش مجدد در استفاده از میکروارگانیسم‌های معرفی شده جهت کنترل بیولوژیکی پاتوژن گیاهی شده است. بسیاری از این میکروارگانیسم‌ها در ایفای عملکردشان جهت کنترل بیولوژیکی ضعیف‌اند و در نتیجه موجب کاهش توسعه‌ی تجاری و استفاده گسترده از آن‌ها شده است. بسیاری از میکروارگانیسم‌هایی که مناسب کنترل بیولوژیکی هستند، در خاک یا سطح خاک وجود دارند و شواهد و مدارک ثابت کرده‌اند که تمایل بسیار کمی به استعمار گیاهان تحت برنامه‌های کاربردی تکرار پذیر دارند . پاسخ به این سوال مبنایی برای تحرک در پژوهش و اعمال تحقیقات پایه‌ای است. فرض اصلی، ایجاد دستورالعملی پایه‌ای برای اندوفیت‌های گیاهی می‌باشد که قادر به تولید متابولیت‌هایی مشابه با متابولیت‌های میزبان خود هستند. بسیاری از تحقیقات در جهت جایگزین کردن سیستم‌های اندوفیتی و به منظور تامین مواد خاص برای مناطق خاص، انجام شده است. با این حال، این تحقیقات همیشه موفق نمی‌باشند زیرا برخی از اندوفیت‌ها مرموز هستند و تغییر در میزبان ایجاد می‌کنند و یا حتی به بدترین بیماری‌زا تبدیل می‌شوند. با توجه به مجموعه‌ی وسیعی از اکوسیستم‌ها و گروه‌های اندوفیتی، انتظار می‌رود استفاده‌ی موفقیت‌آمیز از اندوفیت‌های گیاهی به شدت وابسته به متغیرهای زیست محیطی که از آن‌ها استخراج شده‌اند، باشد. درحالی‌که شرایط محیطی پیچیده، ممکن است مشکلات و یا محدودیت‌هایی را پیش آورد. از چالش‌های پیش روی این مجموعه‌ی متنوع پیدا کردن یک رابطه مشترک فیزیولوژیکی و یا ژنتیکی موجود در سیستم‌های همزیستی است. آیا امکان استفاده از هر اندوفیتی وجود دارد و می‌توان عملکردش را پیش‌بینی کرد؟ علاوه بر این، آیا این رابطه در هر دو اندوفیت‌های باکتریایی و قارچی رایج خواهد بود؟

منابع

1. Li JY, Sidhu RS, Ford EJ, Long DM, Hess WM & Strobel GA (1998) The induction of taxol production in the endophytic fungus- *Periconia* sp from *Torreya grandifolia*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 20: 259.
2. Lin F, Liu X, Wang H & Zhang C (2003) Recent research and prospect on taxol and its producing fungi. *Microbiol Biotechnol* 43: 1701–1717.
3. Liu K, Ding X, Deng B & Chen W (2009) Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of Industrial Microbiology &*
4. Schulz B, Guske S, Dammann U & Boyle C (1998) Endophyte-host infractions. II. Defining symbiosis of the endophyte-host infraction. *Symbiosis* 25: 213–227.
5. Scott B & Schardl C (1993) Fungal symbionts of grasses: evolutionary insights and agricultural
6. Stierle A, Strobel G & Stierle D (1993) Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science (New York, NY)* 260: 214-216.
7. Zhang HW, Song YC & Tan RX (2006) Biology and chemistry of endophytes. *Natural product reports* 23: 753-771.
8. Zhao J, Zhou L, Wang J, Shan T, Zhong L, Liu X & Gao X (2010) Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Current research, technology and education in*

tropics in applied microbiology and microbial biotechnology Microbiology book series – Number 2, Vol. 2 (Mendez-Vilas A, ed.) p.^pp. 567-576.

9. Zhu D, Wang J, Zeng Q, Zhang Z & Yan R (2010) A novel endophytic Huperzine A-producing fungus, Shiraia sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata*. *Journal of applied microbiology* 109: 1469-1478.

Plant endophytes as a new source for the production of medicinal compounds

M. H. Mirjalili[1*]

1-Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G. C., Evin, Tehran, Iran

*Corresponding author: m-mirjalili@sbu.ac.ir

Abstract

Secondary metabolites are phenomenally natural compounds with low molecular weight. So far, more than hundred natural compounds has been identified and used for the production of the novel medicine. Many secondary metabolites have complicated structure and for this reason, their chemical synthesis is difficult and high cost. Although there has been significant progress in the use of novel biotechnological methods such as in vitro culture techniques, genetic transformation, metabolic engineering and molecular farming to investigate and alter pathways for the biosynthesis of target metabolites, there are many challenges involved in from plant genotype selection, biosynthetic pathway evaluation, optimization of controlled cultures conditions to successful commercial production. Among of natural sources, microorganisms especially plant endophytes, found in virtually every higher plant, are suitable and easy for the production of valuable secondary metabolites. Endophytes have phenomenal potential as medicinal compound source because of their high capacity in biosynthesis of variable chemical structure organic compounds. These compounds, once isolated and characterized, have been used in modern medicine. This presentation is focused on recent advances in the isolation, introduction and usage of plant endophytes as new source of secondary metabolites.

Keywords: medicinal plants, microorganisms, endohytes, fungus, bacteria, secondary metabolites