نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هفتم، شماره سوم، ۱۳۹۹
۲۳-۳۶
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2020.16167.2462

شناسایی و بررسی سیلیمارین قارچ اندوفیت جداسازی‌شده از بذر گیاه خارمریم (*Silybum marianum* (L) Gaert.)

هدی السادات عقیلی[۱]، *حسین مرادی[۲]، محمد علی تاجیک قنبری[۳] و ولی اله قاسمی[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد باغبانی، گروه باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم و کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران،
[۲]استادیار گروه باغبانی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم و کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران،
[۳]دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم و کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران،
[۴]استادیار پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲٤؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۲/۳۰

چکیده

مقدمه: خارمریم (*Silybum marianum* (L.) Gaert.) گیاهی از خانواده آستراسه است، که سیلیمارین به‌عنوان ماده مؤثره با ارزش بذر این گیاه در درمان بسیاری از بیماری‌ها، مانند بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. چالکون‌سنتاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در تولید سیلیمارین می‌باشد. قارچ‌های اندوفیت تأثیر مفید بر مقدار تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارند. اخیراً چندین قارچ اندوفیت از گیاهان جدا شده و مطالعه شیمیایی و مولکولی آن‌ها مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین این پژوهش با هدف جداسازی قارچ اندوفیت از بذر گیاه خارمریم، بررسی و مقایسه سیلیمارین تولیدی قارچ و این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها: بذرهای خارمریم از محوطه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری جمع‌آوری و پس از ضدعفونی در محیط موراشیگ و اسکوگ کشت شدند. پس از ظهور قارچ در محیط، قارچ‌ها در شرایط استریل به محیط PDA و به‌منظور خالص‌سازی، به محیط آب و آگار دو درصد منتقل شدند. جدایه‌های رشد کرده به محیط PDB منتقل شده و پس از ۱۰ روز استخراج سیلیمارین انجام شد. شناسایی مولکولی جدایه قارچ اندوفیت با تکثیر نواحی ریبوزومی انجام شد، سپس هم‌ردیف‌سازی توالی به‌دست آمده با توالی‌های موجود در سایت NCBI با نرم‌افزار آنلاین BLAST مورد مقایسه قرار گرفتند و با رسم درخت فیلوژنی قارچ اندوفیت شناسایی شد. بررسی بیوانفورماتیکی چالکون‌سنتاز مربوط به گیاه خارمریم و چند گونه قارچ دیگر با استفاده از پایگاه اطلاعاتی NCBI دامنه‌ها و موقعیت‌های مشابه چالکون‌سنتاز به‌دست آمد و با برنامه Clustalo پایگاه اطلاعاتی UniProt بررسی شد. سپس با نرم‌افزار CLC Genomics Workbench5.5.2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و جدول مشخصات آن‌ها رسم گردید. درخت فیلوژنی مربوط به این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Mega7 و با روش Neighbor-joining رسم شد.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده با دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا، تولید سیلیمارین از قارچ را نشان داد. مقدار سیلیمارین برای نمونه برگ تهیه شده از گیاه خودرو، ۳/۳۰۷۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر و برای گیاه استریل درون شیشه ۱/۷۱۸۳ میلی‌گرم در گرم

* مسئول مکاتبه: moradiho@yahoo.com

وزن تر و برای قارچ اندوفیت ۰/۷۲۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر اندازه‌گیری شد. شناسایی مولکولی جدایه‌های به‌دست آمده، با استفاده از نواحی ITS انجام و گونه آن، *Alternaria alternata* شناسایی گردید. هم‌چنین بررسی فیلوژنی چالکون‌سنتاز به‌عنوان آنزیم کلیدی برای تولید سیلیمارین بین این گیاه و چند قارچ صورت گرفت؛ که بیش‌ترین نزدیکی را در گیاه *S. marianum* به قارچ *Alternaria* sp نشان داد.

نتیجه‌گیری: بررسی تولید سیلیمارین در قارچ جداسازی‌شده از بذرهای گیاه خارمریم، گیاه درون‌شیشه‌ای و فضای باز همراه با مطالعه بیوانفورماتیکی مسیر تولید آنزیم چالکون‌سنتاز، نقش مؤثر قارچ‌های اندوفیتی را در تولید سیلیمارین مشخص کرد. هم‌چنین این جدایه قارچی قادر به تولید سیلیمارین در شرایط آزمایشگاهی بود.

واژه‌های کلیدی: آلترناریا، اندوفیت، خارمریم، سیلیمارین، HPLC

مقدمه

خارمریم (*Silybum marianum* (L) Gaert.) با نام انگلیسی Milk thistle از خانواده آستراسه است؛ که گیاهی یک یا دوساله، علفی و بدون کرک می‌باشد. ساقه آن مستقیم، ضخیم، ساده یا اصولاً از قاعده منشعب، برگدار، یک کپه‌ای، با بخش فوقانی تقریباً بدون برگ است. این گیاه حاوی گروهی از فلاونولیگنان‌ها، به نام سیلیمارین است؛ که مجموعه‌ای از فلاونوئیدها شامل سیلی‌بین، سیلی‌کریستین و سیلی‌دیانین می‌باشد (۱۵). این گیاه در صنایع داروسازی بسیار با اهمیت است و در ایران در مناطق مختلفی مثل گنبدکاووس، بین گرگان و نوده، کلاردشت، دره هزار، دشت مغان، شوش، حمیدیه، رامهرمز، ایذه و کازرون پراکندگی دارد (۱۲). میوه‌های رسیده و پاپوس‌های آزاد شده دانه بخش مورد استفاده گیاه می‌باشد (۱۱). سیلیمارین محافظ کبد در برابر انواع مسمومیت‌ها و دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و افزایش‌دهنده گلوتاتیون سلولی است (۷). این ترکیب در آب غیرمحلول و در الکل محلول است. هم‌چنین محافظت‌کننده کبد، بهبود عملکرد ایمنی، اشتها و کاهش تهوع در بیماران سیروزی، کاهش عوارض جانبی در بیماران تحت شیمی درمانی، احتمال پیشگیری یا درمان سنگ کیسه صفرا، درمان اختلالات گوارشی است. موارد مصرف مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی بر اساس داده‌های بالینی شامل درمان حمایتی هپاتیت حاد و مزمن، سیروز ناشی از الکل، دارو و سموم است. موارد مصرف مورد تأیید کمسیون E شامل درمان مشکلات سوء هاضمه، سمیت کبدی، درمان حمایتی بیماری التهابی کبد و سیروز کبدی، و موارد مصرف در طب سنتی شامل درمان یبوست، دیابت، تب یونجه، خونریزی رحمی، وریدهای واریسی، درمان بی‌اشتهایی، اختلالات کیسه صفرا و طحال، زردی و هموروئید می‌باشد. هم‌چنین برگ‌های گیاه برای درمان مالاریا استفاده می‌شدند (۱۱). سیلیمارین از مسیر بیوسنتز فنیل‌آلانین تولید می‌شود که دارای دو مسیر، یکی از طریق تولید کونیفریل‌آلدهید توسط سینامیل‌الکل‌دی هیدروژناز و مسیر دیگر تولید تاکسی‌فولین، توسط چالکون‌سنتاز می‌باشد (۲۱). چالکون‌سنتاز، در مرحله اتصال ۳ واحد استیل از مالونیل کوانزیم A با ٤ هیدروکسی‌سینامیل کوانزیم A برای تولید نارنجین چالکون به‌عنوان پیش‌ساز تولید تاکسی‌فولین در مسیر تولید سیلیمارین نقش دارد؛ که به‌عنوان نقطه‌ای کلیدی در کنترل متابولیکی این مسیر بیوسنتزی است (۱۸ و ۲۱). سطوح آنزیمی و mRNA چالکون‌سنتاز در طی مراحل نموی با نوع بافت و سلول در پاسخ به

محرک‌های محیطی تغییر می‌کنند و سبب تغییرات سطوح ترکیبات نهایی در مسیر بیوسنتزی را فراهم می‌آورند (۱۸). که این امر سبب می‌شود کیفیت و کمیت مواد مؤثره گیاهان دارویی تحت‌تأثیر اندام، بافت و شرایط محل رویش قرار گیرد، اندازه‌گیری مقدار سیلیمارین در اندام‌های گوناگون گیاه خارمریم و در ماه‌های مختلف سال متفاوت است. در پژوهشی بیش‌ترین مقدار سیلیمارین در بذر و ساقه مسن برداشت شده در اردیبهشت‌ماه به‌ترتیب ۳۲/۷۵ و ۱۷/۸۳۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود (۱۲). در سال‌های اخیر ریزجاندارانی شناخته شدند که منبع غنی از متابولیت‌های فعال زیستی می‌باشند و در داروسازی، کشاورزی و صنعت به‌کار گرفته می‌شوند. می‌توان از گیاهان به‌عنوان منبع بزرگ تعداد زیادی ریزجانداران که اندوفیت شناخته می‌شوند، استفاده نمود (٤ و ۱۹). اندوفیت‌ها گروه بزرگ و متنوعی از قارچ‌ها یا باکتری‌ها هستند که تمام و یا بخشی از چرخه زندگی خود را درون بافت‌های گیاه میزبان می‌گذرانند (۳). قارچ‌های اندوفیت بخشی از اجزای مهم تنوع زیستی مرتبط با گیاهان بوده و دارای اثرات مفید روی گیاهان میزبان خود هستند (۲). شناسایی ژن‌های کدکننده نوع III پلی‌کتیدسینتاز[1] از اعضای سوپرفامیلی[2] در ریسه‌های قارچ *Aspergillus oryzae* نشان داد که توزیع آن‌ها مختص گیاهان یا باکتری‌ها نیست (۱۸). با این‌حال، کشف این‌که، قارچ‌های اندوفیت قادر به تولید بسیاری از داروهای مشتق شده از گیاه هستند، افق‌های جدیدی را برای قابل استفاده بودن و تولید آن‌ها در صنایع دارویی در مقیاس بزرگ آشکار کرده است (٤). چندین قارچ اندوفیت از اندام‌های گوناگون گیاه خارمریم جداسازی و شناسایی شده است. جداسازی قارچ *Alternaria* sp. توسط راجا و همکاران (۲۰۱۵) از بذر، ساقه و برگ گیاه خارمریم و تولید برخی متابولیت‌های ثانویه توسط این قارچ گزارش شد (۱۷). در پژوهشی دیگر ال-الیمات و همکاران (۲۰۱٤) تولید سه ترکیب از ترکیبات سیلیمارین را از قارچ اندوفیت *Aspergillus iizukae* جداشده از برگ گیاه خارمریم گزارش کردند (٦). هم‌چنین تولید متیل ایبوژینول از قارچ اندوفیت آلترناریا جداشده از گیاه رز، توسط کوال و همکاران (۲۰۰۸) شناسایی شد (۱۰). پژوهش‌ها بر تولید متابولیت‌های ثانویه اندوفیت‌ها در گیاهان دیگر هم انجام شده است. نصیری‌مدیسه و همکاران (۱۳۸۸) تولید تاکسول از ۵ ایزوله قارچ‌های اندوفیت جداشده از سرخدار بومی ایران را گزارش کردند (١٤). هم‌چنین رحیمی و همکاران (۱۳۹۲) ژن ۱۰- داستیل باکاتین III -۱۰- اُ- استیل ترانسفراز (DBAT)[3] که به‌عنوان یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز تاکسول می‌باشد را در هفت ایزوله قارچ اندوفیت جداشده از اندام‌های مختلف درختان فندق در منطقه لو واقع در اردبیل که قادر به تولید تاکسول بودند را گزارش کردند (١٦). بنابراین این پژوهش با هدف جداسازی قارچ اندوفیت از بذر گیاه خارمریم، بررسی و مقایسه سیلیمارین تولیدی قارچ و این گیاه انجام شد.

مواد و روش‌ها

با توجه به اهمیت قارچ‌های اندوفیت و نقش کمکی آن‌ها در تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، در این پژوهش قارچ اندوفیت از بذر گیاه خارمریم جداشده و شناسایی گردید، سپس تولید سیلیمارین در برگ گیاهان رشد کرده در شرایط طبیعی و گیاهان استریل درون‌شیشه‌ای و قارچ اندوفیت جداشده از بذر گیاه خارمریم مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین با استفاده از نرم‌افزارها و روش‌های بیوانفورماتیکی

1- Type III polyketide synthase (PKS)
2- Superfamily
3- 10-deacetylbaccatinIII-10-O-acetyltransferase (DBAT)

رابطه تکاملی پروتئین چالکون‌سنتاز به‌عنوان آنزیم کلیدی در مسیر تولید سیلیمارین بین گیاه *Silybum marianum* و چند گونه قارچ، به‌منظور بررسی میزان شباهت‌ها و شناسایی نواحی حفظ شده، دومین‌ها و خانواده پروتئینی آن بررسی شد.

نمونه‌برداری و جداسازی قارچ‌های اندوفیت: بذرهای گیاه خارمریم از گیاهان خودرو رشد کرده در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، در اواخر اردیبهشت، خرداد و اوایل تیرماه سال ۱۳۹٦ جمع‌آوری شد. برای حذف آلودگی، نخست بذرها برای چند دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند. برای استریل نمونه‌ها در زیر هود لامینار، نخست قارچ‌کش‌های پنتانیتروکلروبنزن، بنومیل و ناتی‌وو هر کدام با غلظت ۳ در هزار به‌مدت ۱۰ دقیقه استفاده شدند. پس از آب‌کشی با آب مقطر استریل، بذرها در الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه قرار داده شدند، سپس شستشو با آب مقطر استریل انجام شد و نمونه‌ها در هیپوکلریت سدیم پنج درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس دوباره در الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۱ دقیقه منتقل داده شدند. در پایان سه بار آبکشی با آب مقطر استریل انجام شد. بذرهای استریل شده پیش از کشت بین کاغذ صافی استریل قرار گرفتند تا آب اضافی آن‌ها گرفته شود، سپس در محیط موراشیگ و اسکوگ در شرایط کاملاً استریل کشت شدند. پتری‌دیش‌های حاوی بذرها، به‌صورت وارونه در اتاق رشد، با ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

تهیه محیط PDA برای کشت جدایه‌های قارچی: پس از خروج قارچ‌ها از بذرهای کشت شده، بخشی از هیف قارچ‌ها برای رشد در محیط کشت عمومی سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA)[1] (ساخت شرکت Merk) کشت شدند. بدین‌منظور ۳۹ گرم پودر آماده را در مقداری آب مقطر حل کرده و سپس به حجم یک لیتر رسانده شد. ارلن حاوی محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. سپس در شرایط استریل در زیر هود لامینار، در پتری‌دیش‌های استریل پخش گردید.

خالص‌سازی جدایه‌های قارچی: خالص‌سازی قارچ‌ها به روش نوک هیف و محیط کشت آب آگار دو درصد[2] (جدول ۱) انجام شد. بدین‌منظور با استفاده از سوزن سترون قرصی به قطر چند میلی‌متر از هیف قارچ برداشته و در پتری‌دیش حاوی محیط آب آگار دو درصد کشت شدند.

تولید انبوه میسلیوم قارچ‌های اندوفیت: به‌منظور شناسایی مولکولی و بررسی وجود سیلیمارین سه کلونی خالص از جدایه‌های قارچی انتخاب شدند و برای تهیه سوسپانسیون مورد استفاده قرار گرفتند. بدین منظور قطعاتی از قارچ در ۵۰ میلی‌لیتر محیط سیب‌زمینی دکستروز مایع PDB[3] (جدول ۱) قرار داده شد و ارلن‌های آماده شده بر روی شیکر با دور ۱۱۰ rpm، در دمای اتاق به‌مدت ۱۰ روز قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان برای اندازه‌گیری سیلیمارین موجود در قارچ‌ها، میسلیوم‌های قارچی غربال و بخش مایع جدا شدند، میسلیوم قارچ‌ها برای شناسایی مولکولی و محیط محلول آن‌ها برای بررسی وجود سیلیمارین استفاده شد.

1- Potato dextrose agar
2- Water agar
3- Potatodextrose broth

جدول ۱- محیط‌های کشت مورد استفاده و مواد تشکیل‌دهنده.

Table 1. The culture medium used and the ingredients.

محیط کشت	ترکیب محیط کشت	مقدار مورد نیاز با حجم نهایی یک لیتر آب مقطر
WA	آگار agar	20 gr
	آب مقطر distilled water	1000 mL
PDB	آب مقطر distilled water	1000 mL
	سیب زمینی Potatod	200 gr
	دکستروز extrose	10 gr

تولید گیاهچه استریل: برای تولید گیاهچه استریل نخست برای حذف آلودگی، بذرها را چند دقیقه با آب جاری شستشو داده شدند. برای استریل سطحی نمونه‌ها در زیر هود لامینار فلو، بذرها در الکل ۷۰ درصد به‌مدت یک دقیقه قرار داده شدند، پس از شستشو با آب مقطر استریل بذرها در هیپوکلریت سدیم پنج درصد به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و سه بار آبکشی با آب مقطر استریل انجام شد. بذرهای استریل شده در محیط موراشیگ و اسکوگ در شرایط کاملاً استریل کشت شدند. پتری‌دیش‌های حاوی بذرها، در اتاق رشد، با ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند.

اندازه‌گیری سیلیمارین: برای اندازه‌گیری سیلیمارین سه نمونه، (الف) برگ گیاهچه استریل، (ب) برگ گیاه رشد کرده در شرایط طبیعی که در بهمن ماه سال ۹٦ از محوطه دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری جمع‌آوری شد و (ج) محیط کشت مایع که جدایه قارچی در آن رشد کرد بود، مورد استفاده قرار گرفت (۱۲ و ۱٤).

استخراج سیلیمارین از جدایه‌های قارچی: نخست محیط مایع قارچ صاف شد و محلول به‌دست آمده در حجم برابر از مخلوط کلروفرم/ متانول (۱:۱۰) مخلوط شد و فاز آلی با سانتریفیوز جدا گردید. فاز آلی به‌دست آمده به‌وسیله دستگاه آون خلاء خشک شد. ماده خشک حاصل در ۱ میلی‌لیتر متانول حل شده و برای اندازه‌گیری سیلیمارین مورد استفاده قرار گرفت (۱٤).

استخراج سیلیمارین از برگ گیاهچه استریل و برگ جمع‌آوری‌شده از گیاه رشد کرده در شرایط طبیعی: برای استخراج سیلیمارین از برگ گیاهچه استریل و برگ جمع‌آوری‌شده از گیاه خودرو محوطه دانشگاه در بهمن‌ماه، مقدار ۰/۲۵ گرم برگ نمونه را با ۲۵ میلی‌لیتر متانول ۸۰ درصد در بوته چینی کوبیده و به‌مدت ۷۲ ساعت روی شیکر قرار داده شد. سپس عصاره صاف شده و توسط دستگاه آون خلاء تغلیظ شد و از آن برای اندازه‌گیری سیلیمارین استفاده گردید (۱۲).

ستون HPLC از نوع C18 و فاز متحرک متانول/ آب (۷۰:۳۰ حجمی/حجمی) بود. برای انجام تجزیه مقدار ۱۰ میکرولیتر از سیلیمارین استاندارد و نمونه‌ها به دستگاه تزریق شد (جدول ۲).

جدول ۲- کروماتوگرافی با کارآیی بالا (HPLC).

Table 2. High-performance liquid chromatography.

ستون Column	نوع Type	مشخصات ستون C18 (5 µm, 4.6 mm × 150 mm) Symmetry Column C18 (5 µm, 4.6 mm × 150 mm)
	جریان Flow	0.7 ml/min
حلال Solvent	شرایط گرادیان Gradiant condition	A: 20mM phosphate buffer adjusted to pH 2.8 B: Methanol: acetonitrile (2:1) t=0 min (65% A: 35% B) t=3 min (55% A: 45% B) t=12 min (50% A: 50% B) t=24 min (55% A: 45% B) t=30 min (65% A: 35% B)
شناساگر Detector		UV(280 nm)

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچ اندوفیت با تکثیر نواحی ریبوزومی: شناسایی مولکولی جدایه‌های به‌دست آمده پس از استخراج DNA، با استفاده از مکان‌های بین ژنی (ITS)[1] و توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)[2] انجام شد. برای تولید انبوه میسلیوم قارچ مورد نیاز جهت استخراج DNA، قطعه‌ای از پرگنه قارچ به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت برداشته و به محیط کشت PDB منتقل و روی شیکر با ۱۱۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از ۱۰ روز، از گلوله میسلیوم تشکیل شده برای استخراج DNA استفاده شد. بدین‌منظور، نخست توده میسلیوم قارچ تشکیل شده در محیط کشت PDB با آب مقطر سترون آبکشی شد تا محیط کشت به‌طور کامل از روی توده میسلیوم قارچ زدوده گردد. توده میسلیوم با کاغذ صافی سترون خشک و سپس یک گرم از میسلیوم خشک شده قارچ با استفاده از ازت مایع و هاون سترون سرد پودر و به ویال سترون منتقل گردید. مقدار ۶۰۰ میکرولیتر بافر استخراج CTAB به نمونه اضافه شد. مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت و در این مدت محتویات میکروتیوب هر ۱۰ دقیقه یکبار به آرامی مخلوط شد. پس از آن، به اندازه حجم نمونه، مخلوط کلروفرم-ایزوآمیل الکل به هر نمونه اضافه گردید. ویال‌های حاوی نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند، فاز رویی به ویال سترون جدیدی منتقل و به اندازه حجم محلول، ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ویال حاوی مخلوط به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا DNA استخراج شده، رسوب نماید. مایع رویی دور ریخته شد؛ به ویال حاوی رسوب DNA، ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد سرد اضافه شد و به‌مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس الکل تخلیه و ویال حاوی رسوب DNA به‌صورت وارونه روی کاغذ صافی سترون قرار گرفت تا باقی‌مانده الکل درون ویال خشک گردد. پس از این مرحله، ۷۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه سترون به آن افزوده و نمونه به‌مدت یک شب در چهار درجه سلسیوس نگهداری شد تا توده DNA داخل آب حل گردد. به‌منظور

1- Internal Transcribed Spacer (ITS)
2- Polymerase Chain Reaction

مشاهده کمیت و کیفیت DNA حاصله، از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد. برای تکثیر ناحیه ITS از rDNA هسته‌ای از ترکیب آغازگرهای ITS4 و ITS5، به‌عنوان آغازگرهای پیشرو و پسرو استفاده شد (جدول ۳). برای انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR)، به‌ازای هر نمونه، نخست محلول پایه مسترمیکس[1] شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، یک میکرولیتر $MgCl_2$، یک میکرولیتر dNTP، یک میکرولیتر آغازگر پیشرو، یک میکرولیتر آغازگر پسرو، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymarase، سه میکرولیتر از DNA استخراج شده و ۱۶/۲ میکرولیتر آب مقطر استریل با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، تهیه شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر با ۳۵ چرخه تحت شرایط واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، واسرشت‌سازی در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۵ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ دقیقه انجام گردید. تعیین توالی ناحیه ITS با استفاده از آغازگر ITS4 از یک جهت به‌صورت مستقیم و توسط شرکت بایونیر[2] کره جنوبی انجام شد. توالی پس از بلاست در بانک ژن NCBI، با سایر توالی‌های موجود در این بانک ژن، مورد مقایسه قرار گرفتند.

جدول ۳- توالی آغازگرهای عمومی برای تکثیر ناحیه ITS.

Table 3. Sequence of generic primers pair for multiplying the ITS area.

جفت آغازگر Primers pair	توالی Sequence
ITS5	5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3′
ITS4	5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC 3′

بررسی بیوانفورماتیکی چالکون‌سنتاز مربوط به گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L.) و چند گونه قارچ: توالی‌های کامل آمینواسیدی چالکون‌سنتاز مربوط به گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L.) و چند گونه قارچ دیگر از پایگاه اطلاعاتی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) یافت شد. پروتئین چالکون‌سنتاز مربوط به گیاهان موردنظر با فرمت FASTA دریافت شد. دامنه‌ها و موقعیت‌های مشابه چالکون‌سنتاز از قسمت Conserved domains پایگاه اطلاعاتی NCBI به‌دست آمد. هم‌چنین از پایگاه اطلاعاتی uniprot (http://www.uniprot.org/align) و با برنامه clustalo این موقعیت‌ها به‌دست آمد.

توالی‌های به‌دست آمده برای بررسی بیش‌تر و مقایسه با یکدیگر با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench5.5.2 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و جدول مشخصات آن‌ها رسم گردید. درخت فیلوژنی مربوط به این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار مگا ۷ و با روش Neighbor- joining رسم شد.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست آمده نشان داد، که مقدار سیلیمارین، در برگ تهیه شده از گیاه استریل درون‌شیشه‌ای نسبت

1- Master mix
2- Bioneer

به برگ جمع‌آوری‌شده از گیاه رشد کرده در شرایط طبیعی، پایین‌تر بود. جدایه قارچی $SmMs_4$، تولید سیلیمارین از قارچ را نشان داد؛ که از مقدار اندازه‌گیری شده سیلیمارین، در هر دو نمونه گیاهی، کم‌تر بود (جدول ۳). مقدار سیلیمارین در این آزمایش برای نمونه برگ تهیه شده در بهمن‌ماه از گیاه خودرو، ۳/۰۷۹۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر (۳۳/۰۸ پی‌پی‌ام) بود. بررسی فلاونولیگنان‌ها در اندام‌های مختلف گیاه خارمریم در منطقه گرگان نشان داد؛ که برگ‌های جوان در بهمن‌ماه حاوی ۳/۱۸۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک، سیلیمارین بودند (۱۲). این تفاوت در مقدار می‌تواند به‌دلیل متفاوت بودن شرایط محیطی رشد در دو منطقه باشد.

سیلیمارین برای گیاه استریل درون‌شیشه ۱/۷۱۸۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر (۱۷/۸۳ پی‌پی‌ام) اندازه‌گیری شد. الحاوامده و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند، که مقدار سیلیمارین در شرایط درون‌شیشه‌ای کم‌تر از فضای بیرون بود (۱). مقدار سیلیمارین، در برگ تهیه شده از گیاه استریل درون‌شیشه‌ای نسبت به برگ جمع‌آوری‌شده در بهمن‌ماه از فضای بیرون پایین‌تر بود؛ از آن‌جایی‌که در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای متغیرهای محیطی حذف می‌گردد، یکی از دلایل پایین بودن مقدار سیلیمارین در گیاه درون‌شیشه‌ای نسبت به گیاه بیرون می‌تواند به‌دلیل حذف قارچ‌های اندوفیت از گیاه درون‌شیشه‌ای باشد. گزارش شده که محرک‌های قارچی می‌توانند سبب افزایش متابولیت‌های ثانویه گردند. در آزمایشی به‌منظور بررسی اثرات سویه‌های مختلف *Trichoderma harzianum* بر محتوای سیلیمارین گیاه خار مریم گزارش شد که سویه KHB قارچ تریکودرما، سبب افزایش ۱/۵ برابری مقدار سیلیمارین نسبت به شرایط گروه شاهد گردید (۸). هم‌چنین بررسی اثرات تحریکی عصاره قارچی بر تولید سیلیمارین در کشت ریشه‌های مویین این گیاه نشان داد؛ که عصاره قارچی *Fusarium oxysprum* و *Phytophtora meloni* سبب تجمع و افزایش تولید سیلیمارین گردید (۹).

مقدار سیلیمارین برای قارچ اندوفیت جداشده ۰/۷۲۹ میلی‌گرم در گرم وزن تر اندازه‌گیری شد. در دهه‌های اخیر ۲٦۸ متابولیت از گونه آلترناریا گزارش شد؛ که عموماً شامل استروئیدها، ترپنوئیدها، کوئینون‌ها، فنل‌ها و ترکیبات حاوی نیتروژن می‌باشند (۱۳). در این پژوهش هم از قارچ اندوفیت *Alternaria alternate* جدا شده از بذر گیاه خارمریم، ماده مؤثره سیلیمارین شناسایی شد. راجا و همکاران (۲۰۱۵) ٦۲ ترکیب تولیدشده توسط قارچ‌های اندوفیت را در گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) گزارش کردند؛ که یکی از این قارچ‌ها، قارچ *Alternaria* sp. بود. این قارچ از برگ، ساقه و بذر این گیاه جدا و شناسایی گردید و تولید متابولیت‌های ثانویه آلترنارول[1]، ایوپلکتین[2]، کونوپلکتین[3] و آنتی‌بیوتیک پی‌اف ۱۰۵۲[4] از برگ و هم‌چنین تولید متابولیت‌های ثانویه هومودستروکسین B[5] و دستروکسین B[6] در ساقه این گیاه و ۹ -O- متیل آلترنارول[7] و سروتین A[8] در بذر آن، توسط این قارچ بررسی شد (۱۷). تولید فلاونولیگنان‌های سیلیمارین از دیگر اندوفیت جداشده از این گیاه گزارش شده است. ال- الیمات و همکاران (۲۰۱٤) تولید سه ترکیب سیلی‌بین A، سیلی‌بین B و ایزو سیلی‌بین، از هفت ماده فلاولیگنان تشکیل‌دهنده سیلیمارین را از قارچ اندوفیت *Aspergillus iizukae* جدا شده از برگ گیاه خارمریم گزارش کردند (٦).

1- Alternariol
2- Euplectin
3- Coneuplectin
4- Antibiotic PF1052
5- HomodestruxinB
6- DestruxinB
7- 9-O-methylalternariol
8- Pseurotin A

قارچ آلترناریا از دیگر گیاهان هم به‌عنوان قارچ اندوفیت جدا گردید و تولید ماده مؤثره گیاه میزبان توسط این قارچ مورد بررسی قرار گرفت. کوال و همکاران (۲۰۰۸) قارچ اندوفیت *Alternaria* sp. از گیاه *Rosa damascaena* Mill جدا کرده، تولید متیل ایبوژینول را گزارش کردند (۱۰). این قارچ از گیاه *Capsicum annum* هم جدا گردید و تولید کاپسایسین[1] از آن گزارش شده است (۵).

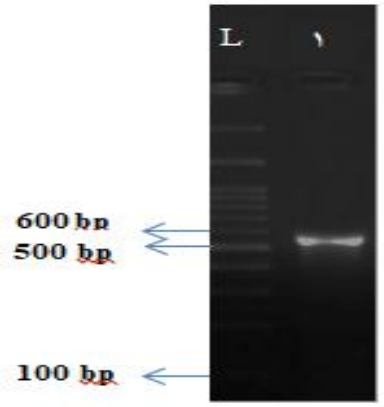
هم‌چنین تولید ماده مؤثره گیاه توسط قارچ اندوفیت آن، در چند گیاه دیگر هم گزارش شده است. در پژوهشی بر روی جداسازی قارچ‌های اندوفیت تولیدکننده داروی ضد سرطان تاکسول از سرخدار بومی ایران، از ۸۰ ایزوله جداشده، تولید تاکسول از ۵ ایزوله گزارش شد (۱٤). رحیمی و همکاران (۱۳۹۲) با بررسی تولید داروی ضد سرطان تاکسول در قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از فندق (*Corylus avellana*) از ٦۰ قارچ جداشده از اندام‌های مختلف درختان فندق در منطقه لو واقع در اردبیل گزارش کردند؛ که ۱۲ ایزوله دارای ژن DBAT بودند؛ که به‌عنوان یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز تاکسول شناسایی شده است؛ از میان این ۱۲ ایزوله، ۷ ایزوله قادر به تولید تاکسول در شرایط آزمایشگاهی بودند (۱٦).

در مرحله الکتروفورز، نمونه $SmMs_4$ با توجه به شکل ۱ باند خوب و شفافی داد؛ که برای بررسی توالی DNA مناسب بود (شکل ۱).

جدول ٤- مقدار تولید سیلیمارین از جدایه قارچ اندوفیت و گیاهچه استریل.

Table 4. The amount of silymarin produced from the isolate of endophytic fungus and sterile seedling.

منبع زیستی مورد استفاده Source biologic used	سیلیمارین تولید شده (پی‌پی‌ام) Produced Silymarin (ppm)
جدایه قارچ اندوفیت $SmMs_4$	مقدار مترشحه در محیط کشت 7.29
گیاهچه استریل	17.18
برگ جمع‌آوری‌شده از فضای باز	33.08

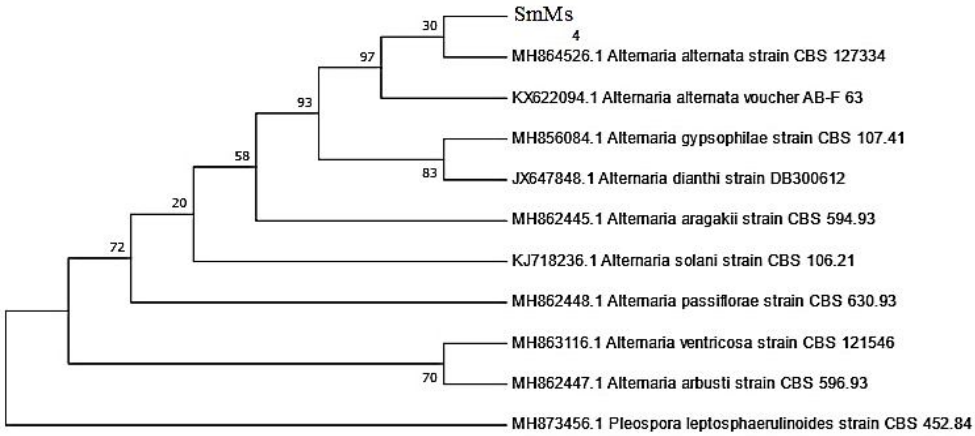


شکل ۱- تکثیر قطعه rDNA جدایه قارچ با پرایمر ITS. L = لدر 100bp. ۱= قارچ اندوفیت جداشده از بذر خارمریم.

Fig. 1. Multiplication the fungal isolate of rDNA with ITS primer. L=lader 100bp, 1= endophytic fungi isolated from seed Milk thistle.

1- Capsaicin

بررسی ریخت شناسی جدایه قارچی، قطر پراگنه این قارچ در محیط PDA پس از شش روز، چهار سانتی‌متر؛ سطح آن ظاهری مخملی، رنگ حاشیه سفید و در وسط قهوه‌ای روشن، رنگ پشت (معکوس) قهوه‌ای تیره بود. ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه قارچ با *Alternaria alternata* مطابقت داشت. مقایسه توالی ناحیه ITS جدایه قارچ $SmMs_4$ توالی‌یابی شده در این پژوهش، با توالی‌های موجود در سایت NCBI، با بیش‌ترین شباهت (۹۹ درصد) *Alternaria alternata* شناسایی شد. هم‌چنین نتایج حاصل از ترسیم درخت فیلوژنی بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS، جدایه به‌دست آمده را با توالی‌های ناحیه ITS جدایه‌های گونه *Alternaria alternata* موجود در بانک ژن، در یک خوشه گروه‌بندی کرد (شکل ۲).



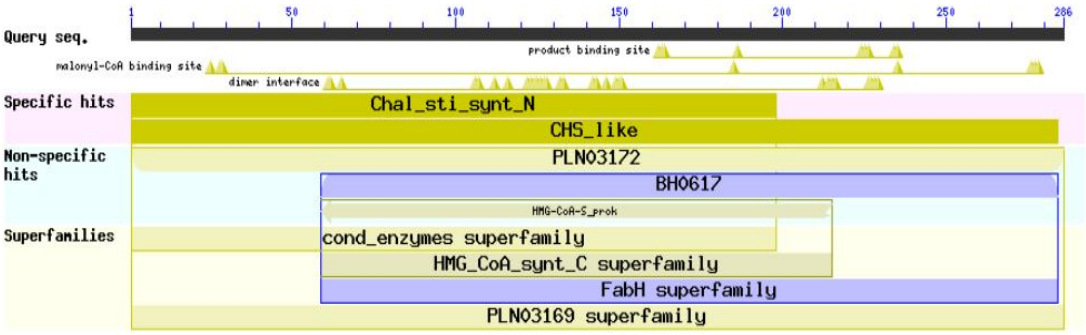
شکل ۲- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS جدایه به روش Neighbor-joining.

Fig. 2. The phylogenetic tree is plotted based on the nucleotide sequence of the ITS region by the Neighbor-joining method.

شکل ۳ نشان می‌دهد که چالکون سنتاز ۱ در گیاه *Silybum marianum* از لحاظ دومین در سه گروه: یک گروه specific، گروه دوم non- specific و گروه سوم super families قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از بلاست پروتئین چالکون‌سنتاز در بین گیاه *Silybum marianum* و قارچ‌های مورد بررسی، درصد تشابه بین ۲٤ تا ٤٥ درصد بود؛ که چالکون‌سنتاز قارچ آلترناریا با ٤٥ درصد بیش‌ترین تشابه را با چالکون سنتاز ۱ گیاه خارمریم داشت. این نتایج نشان می‌دهد که چالکون‌سنتاز در بین جنس‌ها از حفظ‌شدگی بالایی برخوردار است؛ دومین‌های شناسایی شده در پروتئین چالکون‌سنتاز شامل پایانه N، پایانه C، HMG-CoA-S_prok می‌باشد. آنزیم هیدوکسی متیل گلوتاریل - کوآ[1] (HMG-CoA) نخستین مرحله در مسیر بیوسنتز ایزوپنتیل پیروات (IPP) وابسته به موالونات است. در واقع این آنزیم پیوستن استیل کوآ با استواستیل کوآ را کاتالیز کرده و سبب تولید ۳-هیدوکسی-۳-متیل گلوتاریل - کوآ و آزاد شدن یک موکلول کوآ می‌گردد، نتایج حاصل از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench 5.5.2 (جدول ۵) نشان داد که طول این پروتئین در میان

1- Hydroxyl methylglutaryl-CoA

گیاه و گونه‌های قارچ اندوفیت مورد بررسی بین ۶۷۹–۹۲ اسیدآمینه است. بیش‌ترین وزن مربوط به قارچ *Xanthophyllomyces dendrorhous*، کم‌ترین وزن مربوط به *Silybum marianum* (CHS3`) و نقطه ایزوالکتریک این پروتئین در محدوده ۸/۶۳–۵ می‌باشد. نقطه ایزوالکتریک pH است که پروتئین از نظر بار خنثی می‌شود و قادر به حرکت در میدان الکتریکی نیست. دو قارچ *Magnaporthe oryzae* P131 و *Magnaporthe oryzae* Y34 دارای نقطه ایزوالکتریک بالاتر از ۷ بودند. محدوده شاخص آلیفاتیک که به‌عنوان یک عامل مثبت برای افزایش مقاومت حرارتی است در محدوده ۵۸/۴۷۶ تا ۱۰۴/۹۴ قرار دارد که بیش‌ترین شاخص آلیفاتیک مربوط به *Silybum marianum* (CHS3) است. نتایج بررسی فیلوژنی چالکون‌سنتاز در بین گیاه *Silybum marianum* و قارچ‌های مورد بررسی نشان‌دهنده سه شاخه اصلی بود و خود این شاخه‌ها هم در گونه‌های گوناگون به چند زیر شاخه تقسیم شدند؛ در درخت فیلوژنی مورد بررسی این آنزیم (CHS3) در گیاه *Silybum marianum* بیش‌ترین نزدیکی را به قارچ *Alternaria* sp. و دورترین فاصله را *Silybum marianum* (CHS2) با قارچ *Magnaporthe oryzae* 70-15 دارد؛ هم‌چنین قارچ *Exophiala dermatitidis* NIH_UT8656 به‌صورت مستقل در یک گروه قرار گرفت. *Aspergillus nomius* NRRL 13137، *Aspergillus bombycis* و *Aspergillus arachidicola* از خانواده Trichochomaceae در یک شاخه و قارچ‌های خانواده Magnaporthaceae شامل *Magnaporthe oryzae* P131، *Magnaporthe oryzae* Y34، *Magnaporthe oryzae* 70-15 در یک شاخه قرار گرفتند (شکل ٤). تاکنون مطالعاتی در مورد خانواده چالکون‌سنتاز، بین گیاه *Silybum marianum* و قارچ *Alternaria alternata* انجام نشده است. همان‌طور که شکل ٤ نشان می‌دهد، در درخت فیلوژنی، بیش‌ترین نزدیکی بین چالکون‌سنتاز در قارچ آلترناریا و چالکون‌سنتاز ۳ (CHS3) در گیاه خارمریم دیده شد. نزدیکی بین پروتئین چالکون‌سنتاز در گیاه خارمریم و قارچ آلترناریا بیانگر تفاوت کم‌تر در توالی پروتئین آن‌ها می‌باشد که می‌تواند به‌دلیل وجود جد مشترک آن‌ها باشد.



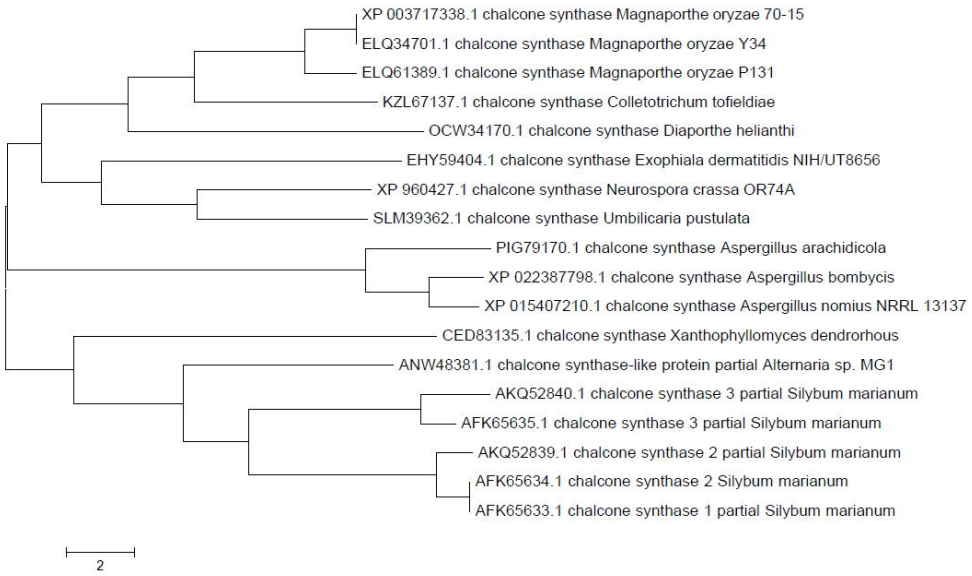
شکل ۳- دومین‌های حفظ شده چالکون سنتاز در گیاه *Silybum marianum*.

Fig. 3. The preserved chalcone synthase domains in *Silybum marianum*.

جدول ۵- خصوصیات مهم چالکون‌سنتاز (طول بر حسب اسیدآمینه و وزن بر حسب کیلو دالتون می‌باشد).

Table 5. Important Characteristics of Chalcone synthesis (Length on terms of amino acid and Weight in KD).

شاخص آلیفاتیک Aliphatic Index	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	وزن Weight	طول Length	نام گونه Name of Species
93.077	6.44	31.77	286	*Silybum marianum* (CHS1)
90.947	6.34	45.094	412	*Silybum marianum* (CHS2)
95.677	5.29	16.831	155	*Silybum marianum* (CHS2)
104.94	5.91	27.537	249	*Silybum marianum* (CHS3)
98.696	5	9.824007	92	*Silybum marianum* (CHS3)
101.656	5.4	32.814	314	*Alternaria* sp. MG1
86.218	6.38	44.218	406	*Aspergillus arachidicola*
96.822	5.78	41.404	387	*Aspergillus nomius* NRRL 13137
98.431	5.91	38.44	357	*Aspergillus bombycis*
90.486	6.12	74.118	679	*Xanthophyllomyces dendrorhous*
96.766	5.67	43.158	402	*Umbilicaria pustulata*
86.494	5.39	29.674	271	*Diaporthe helianthi*
58.476	8.63	35.451	336	*Magnaporthe oryzae* P131
89.353	8.49	35.776	340	*Magnaporthe oryzae* Y34
86.854	5.28	47.371	445	*Neurospora crassa* OR74A
94.158	5.38	44.369	411	*Exophiala dermatitidis* NIH_UT8656



شکل ٤- درخت فیلوژنی مربوط به پروتئین چالکون‌سنتاز در گیاه ***Silybum marianum*** و چند گونه قارچ.

Fig. 4. Phylogeny tree associated with chalcone synthase protein in *Silybum marianum* and several species of fungi.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش سیلیمارین در قارچ اندوفیت آلترناریا آلترناتا جداشده از بذر گیاه خارمریم در شرایط آزمایشگاهی و بدون حضور گیاه میزبان تولید شد. از سوی دیگر با تولید گیاهان استریل شده خارمریم، کاهش مقدار تولید سیلیمارین در این گیاهان نسبت به گیاهان گیاه رشد کرده در شرایط طبیعی دیده شد. هم‌چنین نتایج بررسی فیلوژنی چالکون‌ستاز در بین گیاه *Silybum marianum* و قارچ‌های مورد بررسی بیش‌ترین نزدیکی را بین قارچ آلترناریا و گیاه خارمریم نشان داد. بنابراین با بررسی فیتوشیمیایی، بیوانفورماتیکی میزان تولید و مسیر تولید آنزیم چالکون‌ستاز در گیاه درون‌شیشه‌ای و گیاه رشد کرده در شرایط طبیعی خارمریم (*Silybum marianum*) نقش موثر قارچ‌های اندوفیتی مشخص گردید. به‌طوری‌که وجود سیلیمارین به‌صورت اختصاصی از قارچ جداسازی‌شده از بذرهای گیاه، این نوید را می‌دهد که در آینده بتوان از تعدادی قارچ اندوفیت جداشده از گیاهان دارویی بدون نیاز به گیاه اصلی، در محیط کشت برخی از مواد مؤثره با ارزش و تجاری را تولید نمود.

منابع

1. Al-Hawamdeh, F.M., Shibli, R.A. and Al-Qudah, T.S. 2013. In vitro production of silymarin from *Silybum marianum* L. Med Aromat Plants. 1: 001. 2167-0412.
2. Ataei Salami, Tajik Ghanbari, Babayizad, M. and Mehdian, P. 2017. Isolation and identification of endophytic fungi in Sarakhs forest from Shahid Zareh forest. Third National Conference on Applied Microbiology. Babolsar. Mazandaran University. (In Persian)
3. Babakhanzadeh Sajirani, A. and Hasan Abadi, M. 2010. Interaction between Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Endophytes with Medicinal Plants to Increase Production of Chemicals and Secondary Metabolites, National Conference on Environment and Plant Production. Semnan. Islamic Azad University. pp. 21-17. (In Persian)
4. Das, M., Prakash, H.S. and Nalini, M.S. 2017. Antioxidative and antibacterial potentials of fungal endophytes from *Justicia wynaadensis* Heyne: an ethnomedicinal rain forest species of western Ghats. Asian J. Pharm. Clin. Res. 10: 6. 203-209.
5. Devari, S., Jaglan, S., Kumar, M., Deshidi, R., Guru, S., Bhushan, S., Kushwaha, M., Gupta, A.P., Gandhi, S.G., Sharma, J.P. and Taneja, S.C. 2014. Capsaicin production by *Alternaria alternata,* an endophytic fungus from Capsicum annum; LC–ESI–MS/MS analysis. Phytochem. 98: 183-189.
6. El-Elimat, T., Raja, H.A., Graf, T.N., Faeth, S.H., Cech, N.B. and Oberlies, N.H. 2014. Flavonolignans from *Aspergillus iizukae*, a fungal endophyte of milk thistle (*Silybum marianum*). J. Nat. Prod. 77: 2. 193-199.
7. Fallah Huseini, H., Hemati, A.R. and Alavian, S.M. 2004. A review of herbal medicine: *Silybum marianum*. J. Med Plant. 3: 11. 14-24. (In Persian)
8. Hasanloo, T., Kossari, M., Mohajeri Naraghi, S. and Bagheri, M. 2008. Effect of Different Strains of *Trichoderma harzianum* on the Silymarin Content of Milk thistle (*Silybum marianum*) 6th Iranian Horticultural Science Congress, Rasht, Guilan University. (In Persian)
9. Hasanloo, T., Ahmadi, M., Khayyan Nequei, S.M. and Salehi Jouzani, G.R. 2013. Elicitation effects of fungal extracts on Silymarin accumulation in *Silybum marianum* (L.) gaertn hairy root culture. J. Med Plant. 4: 48. 25-39. (In Persian)
10. Kaul, S., Wani, M., Dhar, K.L. and Dhar, M.K. 2008. Production and GC-MS trace analysis of methyl eugenol from endophytic isolate of Alternaria from rose. Ann. Micro. 58: 3. 443-445.

11. Khalighi Sigaroodi, F., Jarvandi, S. and Taghizadeh M. 2013. Application of Medicinal Plants. Arjmand. Press, 248p. (In Persian)
12. Kordi, H., Aghdasi, M. and Khalafi, M. 2013. An investigation on flavonolignans in different organs of *Silybium marianum* L. in Gorgan region. Iran. J. Med Arom. Plant. 29: 3. 651-664. (In Persian)
13. Lou, J., Fu, L., Peng, Y. and Zhou, L. 2013. Metabolites from Alternaria fungi and their bioactivities. Molecules. 18: 5891-5935.
14. Nasiri Madiseh, Z., Mofid, M., Ebrahimi, M., Khyam Nekouee, S.M. and Khosravi Ahahli, M. 2010. Isolation of Taxol-producing endophytes fungi from Iranian yew (*Taxus baccata* L.). J. Shahrekord Univ. Med. Sci. 11: 4. 101-106. (In Persian)
15. Omidbaigi, R. 2009. Production and Processing of Medicinal Plant. Behnashr. Press, 440p. (In Persian)
16. Rahimi, N., Nazeri, S. and Mirzaei, S. 2013. Taxol production by endophytic fungi isolated from *Corylus avellana*. Arak. Med. Univ. J. 16: 37-44. (In Persian)
17. Raja, H.A., Kaur, A., El-Elimat, T., Figueroa, M., Kumar, R., Deep, G., Agarwal, R., Faeth, S.H., Cech, N.B. and Oberlies, N.H. 2015. Phylogenetic and chemical diversity of fungal endophytes isolated from *Silybum marianum* (L) Gaertn.(milk thistle). Mycology. 6: 1. 8-27.
18. Schmid, J., Doerner, P.W., Clouse, S.D., Dixon, R.A. and Lamb, C.J. 1990. Developmental and environmental regulation of a bean chalcone synthase promoter in transgenic tobacco. The Plant Cell. 2: 7. 619-631.
19. Seshime, Y., Juvvadi, P.R., Fujii, I. and Kitamoto, K. 2005. Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 331: 253-260.
20. Strobel, G. and Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 67: 4. 491-502.
21. Torres, M. and Corchete, P. 2016. Gene expression and flavonolignan production in fruits and cell cultures of *Silybum marianum*. J. Plant Physiol. 192: 111-117.