بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
بخش مهندسی بیوتکنولوژی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

جداسازی و بررسی بیان دو ژن فنیل آلانین آمونیالیاز و ترا نس سینامات مونواکسیژناز تحت تنش با الیسیتور قارچی در درمنه

مولف:

فاطمه موسوی مرتضوی

استاد راهنما:

دکتر حمید رضا کاوسی

شهریور ماه ۱۳۹۲

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط درجه کارشناسی ارشد به

بخش بیوتکنولوژی

دانشکده کشاورزی

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچگونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مزبور شناخته نمی شود.

دانشجو: فاطمه موسوی مرتضوی

استاد راهنمال: دکتر حمید رضا کاوسی

داور۱: دکتر شهرام پورسیدی

داور۲: دکتر ابراهیم شکوهی

نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده: دکتر مهدیه اسدی زید آبادی

معاون آموزشی و پژوهشی دانشکده: دکتر مجید رحیم پور

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان است.

تقدیم به:

همسر عزیزم که سایه مهربانیش سایه سار زندگی ام می باشد، اوکه اسوه صبر و تحمل بود و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود.

و

تقدیم به پرنیان عزیزم

امیدبخش جانم که آسایش او آرامش من است.

تقدیر و تشکر:

سپاس خداوندگار بلند مرتبه‌ام که مرا بستری آفرید تا همیشه تشنه آموختن باشم و جویای علم؛ باشد که شایسته‌ی این راه باشم.

بر خود واجب می دانم که از راهنمایی ها و مساعدت های بی شائبه اساتید فرهیخته، جناب آقای دکتر حمید رضا کاوسی و جناب آقای دکتر محمد رهنماییان در خصوص انجام این پایان نامه تقدیر و تشکر نمایم. همچنین از جناب آقای دکتر جعفر ذوالعلی که در این مسیر از لطف بی دریغشان همواره بهره جستم صمیمانه سپاس گذاری می نمایم.

از اساتید محترم جناب آقای دکتر شهرام پور سیدی و جناب آقای دکتر ابراهیم شکوهی که زحمت مطالعه و داوری این رساله را بر عهده داشتند،سپاس گذارم.

مراتب سپاس و امتنان خود را از زحمات بی دریغ اولین معلمان زندگیم پدر و مادرم که از ابتدای تحصیل تا کنون همواره یاریگر و پشتوانه من بوده اند دارم.

چکیده:

درمنه افسنطین (*Artemisia absinthium* L.) متعلق به خانواده Asteraceae، علفی، پایا و دیپلوئید (2n=18) است. گیاهان این جنس دارای خواص دارویی متعددی هستند که این مهم به علت وجود اسانس و ترکیبات معطر قابل ملاحظه در اندام‌های گیاه است. به دلیل تولید متابولیت-های ثانویه فراوان و مقاومت بالای درمنه در برابر تنش‌های محیطی، این گیاه می‌تواند به عنوان یک گیاه مدل جهت مطالعه مکانیسم‌های دفاعی مختلف مورد استفاده قرار گیرد. مسیر فنیل پروپانوئید مسیر مهم در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهی است. فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) آنزیم اصلی در مسیر فنیل پروپانوئید وترنس سینامات مونواکسیژناز (TCMO) دومین آنزیم مهم این مسیر است. برای بررسی عملکرد صحیح این ژن‌ها در مکانیسم مقاومت، در این تحقیق ترادف بخشی از ژن کد کننده این دو آنزیم در گیاه درمنه جداسازی و میزان بیان این دو ژن در شرایط تنش با الیسیتورهای قارچ فوزاریوم مطالعه گردید. طی تنش با الیسیتورهای قارچ، میزان رونوشت ژن کد کننده PAL و TCMO در ساعات (۶–۱۸) پس از اعمال تنش القا می شوند. بنابراین می-توان نتیجه گرفت که مسیر فنیل پروپانوئید که منجر به تولید ترکیبات دفاعی در گیاهان می‌شود، یک مکانیسم بالقوه در پاسخ گیاه درمنه در برابر تنش‌های زیستی است. بر پایه بررسی‌های فیلوژنتیکی بیشترین مشابهت ترادف ژن PAL درمنه با کاهو (*Lactuca sativa*) به میزان ۹۷ درصد و TCMO با کنگر فرنگی (*Cynara cardunculus*) به میزان ۹۷ درصد است.

واژگان کلیدی: درمنه، مسیر فنیل پروپانوئید، ترنس سینامات مونواکسیژناز، فنیل آلانین آمونیالیاز، الیسیتور

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول : مقدمه ۱

۱-۱ مقدمه ۲

فصل دوم: مروری بر منابع ۶

۲-۱-۳-کاربرد های بالینی درمنه..... ۸

۲-۱-۴-فعالیت ضدباکتریایی اسانس درمنه..... ۸

۲-۲- سیستم‌های دفاعی گیاهان ۸

۲-۲-۱- مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) ۹

۲-۲-۲- مقاومت عمومی القایی (ISR) ۱۳

۲-۲-۳- مسیرهای انتقال پیام دفاعی در گیاهان..... ۱۳

۲-۲-۴- ژن های مرتبط با متابولیت‌های ثانویه..... ۱۴

۲-۲-۴-۱- ترکیبات فنولی..... ۱۴

۲-۲-۴-۲- فیتوالکسین‌ها..... ۱۵

۲-۲-۵- مسیر فنیل پروپا نوئید ۱۵

۲-۲-۵-۱- فنیل آلانین آمونیالیاز ۱۶

۲-۲-۵-۲- ترنس سینامات مونواکسیژناز (TCMO) ۲۰

۲-۲-۶- قطعات مولکولی پاتوژن (PAMP) ۲۱

۲-۲-۶-۱- محرک‌های مولکولی مربوط به باکتری‌ها..... ۲۳

۲-۲-۶- ۲- محرک‌های مولکولی مربوط به قارچ‌ها..... ۲۴

۲-۲-۷- مطالعات مقاومت به بیماری‌ها..... ۲۶

۲-۲-۸ مطالعات مربوط به ژن فنیل آلانین آمونیالیاز در گیاهان طی مواجه با بیماری‌های قارچی ۲۸
۲-۲-۸-۱- فعالیت پراکسیدازها در پی تیمار با کیتوزان..... ۲۹

۲-۲-۹-مطالعات مربوط به ژن TCMO در گیاهان طی مواجه با بیماری های قارچی..... ۲۹

فصل سوم: مواد و روش ها..... ۳۱

۳-۱- مواد گیاهی ۳۲

۳-۲-کاشت مواد گیاهی..... ۳۲

۳-۳- جداسازی قطعه داخلی ژن PAL و TCMO..... ۳۲

۳-۳-۱-استخراج DNA ژنومی ۳۲

۳-۳-۱-۱-دستورالعمل استخراج DNA ژنومی..... ۳۲

۳-۳-۱-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA..... ۳۲

۳-۳-۱-۳- روش اسپکتروفتومتری..... ۳۳

۳-۳-۱-۴- الکتروفورز ژل آگارز..... ۳۳

۳-۳-۲- طراحی آغاز گرها ۳۳

۳-۳-۳- واکنش PCR..... ۳۴

۳-۳-۴- آماده سازی نمونه ها جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی..... ۳۶

۳-۳-۵-آنالیز و مقایسه توالی حاصل با توالی های موجود در پایگاه NCBI..... ۳۷

۳-۴-آزمایشات بررسی بیان ژن..... ۳۷

۳-۴-۱-کاشت مواد گیاهی..... ۳۷

۳-۴-۲-آماده سازی محلول الیسیتور ۳۷
۳-۴-۳- اعمال تنش ۳۷
۳-۴-۳-۱-نحوه اعمال و بررسی تنش با الیسیتور فوزاریوم ۳۸
۳-۴-۳-۱-۱- زمان های نمونه برداری جهت بررسی الگوی بیان ژن‌های PAL و TCMO پس از اعمال تنش ۳۸
۳-۴-۴-استخراج RNA و سنتز cDNA ۳۹
۳-۴-۴-۱- استخراج RNA ۳۹
۳-۴-۴-۱-۱- بررسی کمی و کیفی RNA استخراج شده ۳۹
۳-۴-۴-۱-۲-تیمار RNA با آنزیم DNase ۴۰
۳-۴-۴-۱-۳- ساخت DNA مکمل (cDNA) ۴۱
۳-۴-۵- آغازگرهای واکنش RT-PCR ۴۱
۳-۴-۶ واکنش RT-PCR نیمه کمی ۴۲
۳-۴-۷آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزار MEGA5.1 ..... ۴۲
فصل چهارم: نتایج و بحث ۴۳
نتایج و بحث ۴۴
۴-۱ - نتایج حاصل از مطالعات مولکولی ۴۵
۴-۱-۱- ژن PAL ۴۵
۴-۱-۱-۱- تکثیر قطعه داخلی از ژن PAL بااستفاده از آغازگرها ۴۵
۴-۱-۱-۲- تعیین توالی قطعه ی داخلی ژن PAL جداسازی شده از درمنه ۴۵
۴-۱-۱-۳- آنالیز و مقایسه توالی حاصل با توالی موجود در پایگاه NCBI ۴۶

۴-۱-۱-۴- همردیفی توالی ژن PAL با ارتولوگ‌های موجود در گیاهان نزدیک..... ۴۷

۴-۱-۱-۵- درخت فیلوژنی براساس همردیفی توالی نوکلوتیدی با ارتولوگ های TCMO در گیاهان نزدیک درمنه ۴۸

۴-۱-۲- ژن TCMO..... ۴۹

۴-۱-۲-۱- تکثیر قطعه داخلی ژن TCMO با استفاده از آغازگر ها..... ۴۹

۴-۱-۲-۲- تعیین توالی قطعه ی داخلی ژن TCMO جداسازی شده از درمنه..... ۵۰

۴-۱-۲-۳- آنالیز و مقایسه توالی حاصل با توالی موجود در پایگاه NCBI..... ۵۰

۴-۱-۲-۴- همردیفی توالی ژن PAL با ارتولوگ‌های موجود در گیاهان نزدیک..... ۵۱

۴-۱-۲-۵- درخت فیلوژنی براساس همردیفی توالی نوکلوتیدی با ارتولوگ های TCMO در گیاهان نزدیک درمنه ۵۳

۴-۳-نتایج حاصل از RT- PCR نیمه کمی تحت تنش با محرک قارچ فوزاریوم ۵۵

۴-۳-۱-نتایج RT- PCR نیمه کمی ژن PALتحت تنش با محرک قارچ فوزاریوم ۵۵

۴-۳-۲- نتایج RT- PCR نیمه کمی ژن TCMO تحت تنش با محرک قارچ فوزاریوم.... ۵۶

نتیجه گیری..... ۶۲

پیشنهادات..... ۶۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مقدمه

گیاه درمنه یا افسنطین[1] (*Artemisia absinthium* L.) از خانواده Asteraceae با حدود ۳۴ گونه در ایران از نظر پوشش، تراکم و پراکنش وسیع، یکی از مهم ترین جنس‌های گیاهی در ایران است (مظفریان ،۱۳۸۲). گونه‌های این جنس دارای ویژگی‌های مهم از دیدگاه گیاهان دارویی می‌باشد و این مهم به علت وجود اسانس و ترکیبات معطر قابل ملاحظه در اندام‌های این گیاهان است. این گونه به واسطه ویژگی‌های بارز خود به شدت در مقابل شرایط سخت محیطی مقاوم بوده و این ویژگی در پایداری و بقای پوشش گیاهی مراتع بسیار مؤثر است. با توجه به مقاومت زیاد این گیاه به خشکی، این گیاه از قابلیت بالایی جهت حفاظت از خاک، استقرار آسان و سازگاری وسیع از طریق تولید اکوتیپ‌های فراوان دارد. از این رو این گیاه می‌تواند به عنوان یک گیاه مدل جهت مطالعه مکانیسم‌های دفاعی مختلف مورد استفاده قرار گیرد. مکانیسم‌های مولکولی دخیل در فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر تنش‌های مختلف پیچیده هستند. جهت غلبه بر تنش‌ها، گیاهان از مجموعه ی متنوع و پیچیده‌ای از مکانیزم‌های دفاعی بهره می-گیرند. در گیاهان عالی مسیر بیوسنتزی فنیل پروپانوئید، متابولیت‌های فیزیولوژیکی مهمی از قبیل فلاونوئیدها[2]، لیگنین‌ها[3]، آنتوسیانین‌ها[4] و فیتوالکسین‌ها[5] را تولید می‌کند که در نمو، حفاظت‌های مکانیکی و ایجاد مکانیسم‌های دفاعی در مقاومت به بیماری‌های قارچی یا باکتریایی و تنش‌های غیر زنده نقش دارند (توآن[6] و همکاران، ۲۰۱۰).

فنیل آلانین آمونیالیاز[7](PAL) اولین آنزیم این مسیر است که با حذف غیر اکسیداتیو آمونیا از فنیل آلانین، فنیل آلانین را به ترنس سینامیک اسید تبدیل می کند. این آنزیم یک آنزیم کلیدی در پاسخ به تنش‌های محیطی است و سنتز آن در پی حمله پاتوژن، زخم مکانیکی بافت و حتی سطح پایین نیتروژن، فسفات و یا آهن ، فعال می شود (ریتر و اسکولز[8] ۲۰۰۴).

از آنجا که تاکنون هیچ یک از ژن های مسیر فنیل پروپانوئید در درمنه شناسایی نشده است، شناسایی و بررسی بیان آنزیم PAL به عنوان کلیدی ترین آنزیم این مسیر، از اهمیت بسیار بالایی

[1] Absinthium
[2] Flavonoids
[3] Lignins
[4] Antosianin
[5] phytoalexines
[6] Tuan
[7] phenylalanine ammonia lyase
[8] Ritter and Schulz

برخوردار می باشد. ترنس سینامات مونواکسیژناز[1](TCMO) یکی دیگر از آنزیم‌های مسیر فنیل پروپانوئید است که دومین مرحله از سنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی را کاتالیز می‌کند. این آنزیم ترنس-سینامیک اسید را که از فعالیت آنزیم PAL از پیش ماده فنیل آلانین تولید می‌گردد، به کومارات تبدیل می کند. این آنزیم یک عضو از خانواده پروتئین سیتوکروم P450 است و مونوکسیژناسیون طیف گسترده ای از سوبستراها را کاتالیز می کند (اسکوک[2] و همکاران ،۲۰۰۲). ،۲۰۰۲). کومارات پیش سازی برای ساخت ترکیبات فنیل پروپانوئیدی است که در حفاظت مکانیکی، سنتز آنتوسیانین، پاسخ دفاعی از طریق فلاونوئیدها و نیز محافظت از گیاه در مقابل استرس‌های زنده و غیر زنده نقش دارد.

درک صحیح عملکرد ژن های پاسخ دهنده، به روشن شدن بیشتر مکانیسم‌های مقاومت در برابر تنش کمک خواهد کرد. برخی از ژن‌هایی که توسط تنش‌های زیستی و غیرزیستی القا می شوند، می‌توانند از طریق تولید متابولیت‌های مهم و پروتئین‌های حفاظتی، از سلول‌ها محافظت نمایند (اومزاوا [3]و همکاران، ۲۰۰۶). گیاهان به دامنه وسیعی از مکانیسم‌های دفاعی در برابر انواع تنش‌ها نیاز دارند (زو[4] و همکاران، ۲۰۰۸). علاوه بر پاسخ‌های دفاعی موضعی، گیاهان دارای یک سیستم سیستم ایمنی سیستمیک می باشند (فیا و پارکر[5]،۲۰۰۰) که درواقع تولید متابولیت‌های ثانویه ای مثل فیتوآلکسین‌ها، نتیجه این نوع از مقاومت یعنی مقاومت اکتسابی سیستمیک یا [6] SAR می باشد؛ نوعی مقاومت القایی گسترده در برابر پاتوژن ها که بعد از تشکیل زخم نکروزه در برگ ها به عنوان بخشی از پاسخ فوق حساسیت[7] به یک آلودگی فعال می شود. ترکیب مهم در این مسیر، اسید سالیسیلیک است که مهمترین مولکول انتقال پیام دفاعی در گیاه محسوب می شود. این هورمون در مراحل آغازین مسیر فنیل پروپانوئید، در نتیجه فعالیت آنزیم PAL ، از سینامات ساخته شده و باعث فعال شدن مسیر SAR در گیاهان می گردد (چن[8] و همکاران، ۲۰۰۹).

سالیسیلک اسید[9] (SA) علاوه بر اینکه در سیستم رشد و نمو، فتوسنتز و تعریق گیاه ایفای نقش می می کند، به عنوان یک مولکول پیام رسان[10] مهم دخیل در پاسخ دفاعی علیه استرس‌های زنده و

[1]Trans -cinnamate 4-monooxygenase
[2] Schoch
[3] Umezawa
[4] Xu
[5] Feya and Parker
[6] systemic acquired resistance
[7] Hypersensitive response (HR)
[8] Chen
[9] Salicylic acid
[10] Signaling

غیر زنده نیز محسوب می شود. مسیر فنیل پروپانوئید مسیر مهم در تولید متابولیسم‌های ثانویه گیاهی است و تبدیل فنیل آلانین را به بسیاری از متابولیت‌های ثانویه که در نهایت منجر به تولید انواع مختلفی از ترکیباتی همچون آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، محافظان اشعه ماورای بنفش، فورانوکومارین‌های[1] ضدمیکروبی، ایزوفلاونوئید، فیتوالکسین‌ها، لیگنین‌ها و استرهای فنولی[2]خواهد شد (هرمن[3]،۱۹۹۵) که در نمو، حفاظت‌های مکانیکی و ایجاد مکانیسم های دفاعی در مقاومت به بیماری های قارچی یا باکتریایی و تنش های غیر زنده نقش دارند (هالبروک و همکاران[4] ، ۱۹۸۹).

الیسیتورها ترکیباتی با منشا زیستی و یا غیر زیستی هستند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه می شوند (ژوا [5]و همکاران، ۲۰۰۵). در طبیعت گیاهان به حمله پاتوژن ها، حشرات، علفخواران و دیگر تنش‌های زیستی و غیر زیستی از طریق فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی شامل القای تشکیل متابولیت‌های ثانویه نظیر فیتوالکسین‌ها، پاسخ‌های فوق حساسیتی و سدهای دفاعی ساختاری مانند رسوب لیگنین در دیواره سلول پاسخ می دهند (واسکونزول[6]،۲۰۰۷). الیسیتورها ژن را فعال و به دنبال آن آنزیم‌ها و در نهایت مسیرهای بیوسنتزی بیوسنتزی مختلفی را راه اندازی می‌کنند و باعث تشکیل متابولیت‌های ثانویه می‌شوند. شروع پاسخ‌های دفاعی در گیاه شبکه‌ای از ترارسانی را القاء می کند که با تشخیص مولکول‌های الیسیتور توسط پذیرنده‌ها شروع می‌شود. الیسیتورهای قارچی و ترکیبات اصلی دیواره سلول بسیاری از گونه‌های قارچی مانند کیتین[7] و کیتوزان[8] باعث افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه، بویژه آنهایی که در ساز وکارهای دفاعی گیاه نقش دارند، می‌شوند (کانگ[9]وهمکاران،۲۰۰۴؛ پوو[10] و همکاران، ۲۰۰۹). در این پژوهش از الیسیتور قارچ *Fusarium graminearum* به عنوان محرک سیستم ایمنی گیاه درمنه استفاده شد. این جنس، متعلق به خانواده آسکومیست‌ها بوده و در کشاورزی از اهمیت بالایی برخوردار است. این قارچ پاتوژن اصلی این گیاه نمی باشد اما نظر به این که در طبیعت الیسیتورهایی که مورد شناسایی سیستم ایمنی گیاهان قرار می‌گیرند، عمومی

[1] Furanocoumarins
[2] Phenolic Ester
[3] Herrmann
[4] Hahlbrock
[5] Zhao
[6] Vasconsuelo
[7] Chitin
[8] Chitosan
[9] Kang
[10] Pu

هستند و حضورشان باعث فعال شدن سیستم ایمنی می گردد در این پژوهش از عصاره سلولی این قارچ به منظور القای مسیر فنیل پروپانوئید استفاده شده است.

از آنجا که تاکنون هیچ یک از ژن‌های مسیر فنیل پروپانوئید در درمنه شناسایی نشده اند، شناسایی و بررسی الگوی بیان آن ها در پاسخ به تنش های زیستی و غیرزیستی از اهمیت به سزایی برخوردار است. لذا در این تحقیق در ابتدا توالی جزئی ژن های کد کننده آنزیم PAL و C4H به عنوان آنزیم های کلیدی مسیر فنیل پروپانوئید از گیاه درمنه جداسازی خواهد شد. در مرحله بعد به منظور بررسی نقش مسیر فنیل پروپانوئید در گیاه درمنه الگوی بیان این ژن ها در پاسخ به الیسیتورهای قارچ فوزاریوم با استفاده از تکنیک RT-PCR نیمه کمی در بافت برگ مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

فصل دوم

مروری بر منابع

۲-۱- درمنه

۲-۱-۱-کلیات مرفولوژیک

درمنه (*Artemisia absinthum* L.) گیاهی دیپلوئید (2n=18)، علفی، پایا و متعلق به خانواده کاسنی‌ها، با ارتفاع ۴۰-۶۰ سانتی‌متر، ساقه متعدد، ایستاده، متمایل به سفید، برگ‌ها در سطح زیرین پوشیده از کرک‌های سفید، در سطح رویی متمایل به سبز می‌باشد. گل به رنگ زرد، مجتمع در کپه‌های کوچک است(مظفریان[۱]، ۲۰۰۴).

۲-۱-۲- شرایط رشد

از گیاهان معطر بومی نواحی شمالی و شرقی ایران بوده و به نام‌های خاراگوش، گندواش، مروه و آفسنطین معروف است (گرانچیان و همکاران، ۱۳۷۵). این گیاه در شمال امریکا، شمال و شرق آسیا و افریقا، کشورهای اطراف مدیترانه و در مناطق خشک و بایر و در خاک‌های نرم و با نیتروژن بالا رشد می‌کند. در ایران در اطراف تهران، آذربایجان، گرگان و گیلان یافت می‌شود.

۲-۱-۳-کاربردهای بالینی درمنه

درمنه از زمان‌های قدیم به صورت سنتی در درمان ناراحتی‌هایی چون تب، مالاریا، خونریزی، هپاتیت، انگل‌های روده‌ای، دردهای عصبی، التیام زخم‌ها و اسپاسم مصرف می‌شده است (تان[۲]، ۱۹۹۸). همچنین گونه‌های مختلف این جنس در طب سنتی اروپا جهت رفع سودا و جلوگیری از خونریزی بکار می‌رفته‌اند (تیزرا[۳]، ۲۰۰۴). برگ آن دارای ماده‌ای تلخ به نام ابسیتین[۴] و قسمت هوایی آن دارای اسانس حاوی تویون[۵] است و اثرات مقوی، قاعده آور، ضدکرم و ضد عفونی کننده دارد. در پزشکی سنتی ایران، از دم‌کرده این گیاه برای درمان نارسایی کبد، گلودرد، عفونت گوش، یبوست و اسهال مزمن، در التیام زخم‌ها و همچنین به عنوان داروی ضد کرم و ضدعفونی کننده استفاده می‌شود (مظفریان[۶]، ۲۰۰۴). امروزه اسانس بدست آمده از گیاهان وحشی

[1] Mozafarian
[2] Tan
[3] Teixeira
[4] Absintin
[5] Thuyone
[6] Mozafarian

وحشی درمنه در معطر کردن برخی غذاها و نوشیدنی‌ها، در داروسازی و کشاورزی کاربرد دارد (تورل[1] و همکاران، ۱۹۹۹؛ رایت[2]، ۲۰۰۲).

۲-۱-٤-فعالیت ضد باکتریایی اسانس درمنه

مطالعات انجام شده در دنیا حاکی از آن است که عصاره بسیاری از گیاهان توانایی مهار رشد میکروارگانیسم‌ها را دارند و به این لحاظ گیاهان دارویی به عنوان عوامل ضدمیکروبی کاربردهای زیادی پیدا نموده‌اند (زرگری[3]، ۱۳۶۹). روغن‌های اسانس‌های گیاهی دارای فعالیت-های ضد میکروبی طبیعی بر روی تعداد زیادی از باکتری‌ها هستند. بیشتر این ترکیبات در ساختارشان واجد گروه‌های فعال فنولیک می باشد. در حقیقت آن‌ها به دلیل دارا بودن مقادیر زیادی از ترکیبات آروماتیک مورد توجه هستند، لذا این ترکیبات به واسطه دارا بودن خاصیت ضد اکسایشی و ضد میکروبی ذاتی نقش مهمی در سیستم دفاعی گیاهان در برابر بیماری‌های میکروبی ایفا می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه که به صورت پیش سازهای غیرفعال در بافت‌های گیاهی تولید و ذخیره می‌شوند شامل ترکیبات فنلی، فلاوونول‌ها[4] و فلاوونوئیدها[5]، گلیکوزیدها[6]، گلیکوزیدها[6]، آلکالوئیدها[7] و پلی استیلن‌ها[8] می‌باشند (هان[9]،۲۰۰۰). استفاده بیش از حد از آنتی-آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب باعث مقاومت روزافزون باکتری‌ها به این داروها شده است. از طرف دیگر مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها غالبا با عوارض جانبی در بدن انسان همراه است. به همین منظور استفاده از گیاهان دارویی با داشتن ترکیبات فعال دارویی و تغذیه‌ای در بهبود روش‌های درمانی و احتمالا تکمیل درمان‌های کلاسیک می‌تواند موثر باشد.

۲-۲- سیستم‌های دفاعی گیاهان

گیاهان همچون حیوانات توسط انواع باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و حشرات، مورد حمله واقع می‌شوند. گیاهان دو راهکار دفاعی مختلف دارند که شامل سیستم‌های دفاعی ساختمانی و القایی است. دفاع ساختمانی که دارای فعالیت دائمی هستند به عنوان مانع فیزیکی عمل می‌کند. از جمله

[1] Torrell
[2] Wright
[3] Zargari
[4] Flavonols
[5] Flavonoids
[6] Glycosides
[7] Alkaloid
[8] Polyacetylenes
[9] Han

این عوامل کرک، دیواره سلولی، سوبرین، کالوز و کوتیکل است که از ورود عامل خارجی به بافت‌های گیاهی ممانعت می‌کنند (ژاوو[1] و همکاران ، ۲۰۰۹). دفاع القایی زمانی اتفاق می‌افتد که که گیاه تحت تنش قرار می‌گیرد. دفاع القایی به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم در گیاه القا می-شود. زمانی که دفاع مستقیم در گیاه القا می‌شود، به سرعت مقادیر قابل توجهی از پروتئین‌های دفاعی مانند مهارکننده پروتئاز[2](PI)، پلی فنل اکسیداز، لیپواکسیژناز، کیتیناز، گلوکاناز و تعدادی پروتئین‌های وابسته به پاتوژن و همچنین مواد شیمیایی مضر را که موجب کاهش تغذیه گیاه‌خوار می‌شود، افزایش می‌یابد (ژاوو همکاران، ۲۰۰۹). القای دفاع غیر مستقیم در گیاه، در نتیجه آزادسازی ترکیبات فرار است که مقاومت سیستمیک گیاهی القا می‌کند. در مقایسه با دفاع ساختمانی، دفاع القایی در حفاظت گیاه در برابر آسیب‌ها نقش موثرتری را ایفا می کند (ژاوو و همکاران، ۲۰۰۹). از آنجایی که دفاع پرهزینه است، گیاهان مکانیسم‌های دفاعی القایی را به کار می‌گیرند که در پاسخ به حمله فعال می‌شوند. مولکول‌های انتقال پیام ویژه‌ای ابتدا بافت گیاهی را حساس[3] می‌کنند، یعنی آماده کردن گیاه برای پاسخی سریع‌تر و قوی‌تر بدون فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی پرهزینه به صورت مستقیم و دائمی(هیل و تن[4]، ۲۰۰۸).

از مهم‌ترین فعال‌کننده‌های پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان محرک‌های مولکولی هستند که از پاتوژن‌های مهاجم تولید می‌گردند. این ترکیبات می‌توانند مسیرهای انتقال پیام را فعال کرده که این به نوبه خود باعث فعال شدن پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شوند.

۲-۲-۱- مقاومت سیستمیک اکتسابی[5](SAR)

اولین مرحله از پاسخ دفاعی در مقابل پاتوژن، شناسایی محرک‌های تولید شده توسط پاتوژن است. هنگامی که باکتری یا پروتئین‌های قارچی یا الیگوساکاریدها بصورت غیر اختصاصی توسط سلول میزبان مورد شناسایی قرار گرفت، عوامل محرک که توسط ژن‌های Avr پاتوژن به رسپتورهای میزبان اتصال می‌یابد، منجر به بیان ژن مقاومت (R) در سلول میزبان می‌گردد (نورنبرگ[6]، ۲۰۰۴). ۲۰۰۴). به محض حمله‌ی پاتوژن‌های بیوتروف به بخش کوچکی از گیاه، گیاه برای جلوگیری از گسترش و تکثیر پاتوژن اقدام به انهدام سلول‌های اطراف آلودگی می‌نماید، زیرا سلول‌های مرده

[1] Zhao
[2] Proteinase inhibitor
[3] Priming effect
[4] Heil and Ton
[5] Systemic acquired resistance
[6] Nu¨ rnberger

مانع گسترش و تکثیر پاتوژن می‌شوند که این سیستم دفاعی پاسخ فوق حساسیت[1](HR) نام دارد. پاسخ فوق حساسیت، باعث تجمع سالیسیلیک اسید، جاسمونیک اسید و هیدروژن پرواکساید می-شود (یانگ[2] و همکاران، ۲۰۰۲). پس از بروز این پاسخ، در گیاه سیگنال‌های دفاعی به بخش‌های متفاوت فرستاده می‌شود و باعث بروز پاسخ ایمنی در کل گیاه به هنگام حمله مجدد آن پاتوژن خواهد شد. به محض تشخیص محرک‌های پاتوژن توسط میزبان، سیگنال‌های دفاعی از جمله فسفریلاسیون و دفسفریلاسیون پروتئینی، جریان یونی و تجمع گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) از جمله رادیکال های سوپراکسیداز (O_2) و هیدرژن پرواکسیداز(H_2O_2) به راه می‌افتند. در مرحله‌ی بعدی تنظیم‌هایی که در سطح رونویسی و پس از ترجمه صورت می‌گیرد منجر به فعال شدن فاکتورهای رونویسی و القای ژن‌های دفاعی گیاه و سنتز سیگنال‌های ثانویه می‌شود (یانگ و همکاران، ۲۰۰۲). تعدادی سیگنال‌های ثانویه در گیاه یافت شده که نقش واحد در دفاع با پاتوژن-ها ایفا می‌کنند. این سیگنال ها شامل، گلوکوزیدهای سیانوژنیک، گلوکوزینولات‌ها، آلکالوئیدها، فنولیک‌های گیاهی، فیتوالکسین‌ها، ترپن‌های[3] گیاهی، سالیسیلیک اسید[4] و جاسمونیک اسید[5] می باشد (توآن[6] و همکاران،۲۰۱۰). از جمله نقش این ترکیبات فعال کردن بیان ژن‌های دفاعی و دارا بودن خاصیت کشندگی آن‌ها است.

SA به عنوان یک هورمون، نقش‌های تنظیمی گوناگونی را در متابولیسم گیاهان دارد و باعث فعال شدن مسیرSAR و نیز تا حدی ISR در گیاهان می‌شود (چن[7]و همکاران، ۲۰۰۹). SAR اغلب بعد از آلودگیهای موضعی در بخشی از گیاه القاء و پس از بروز پاسخ فوق حساسیت در گیاه، سیگنال دفاعی به بخش‌های متفاوت گیاه فرستاده می‌شود و باعث بروز پاسخ ایمنی در کل گیاه به هنگام حمله‌ی مجدد آن پاتوژن خواهد شد و به این صورت مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاه القا می‌گردد (کانکل و بروک[8]، ۲۰۰۲). مسیر ISR معمولاً توسط میکروارگانیسم‌های نکروتروف القاء و توسط سیستم آوندی به سایر بافت‌های سبز منتقل می‌گردد و به طور عمده نیازمند فعال‌سازی جاسمونیک اسید و اتیلن است (فیز و پارکر[9]،۲۰۰۰). دفاع گیاهی در پاسخ به حمله میکروبی از طریق شبکه‌ی پیچیده‌ای از مسیرهای سیگنالینگ که سه مولکول سیگنالینگ

[1] Hypersensitive response (HR)
[2] yang
[3] Trpen
[4] Salicilic acid
[5] jasmonic acid
[6] Tuan
[7] Chen
[8] Kunkel and Brooks
[9] Fey and Parker