Biological Journal of Microorganisms
Year 12, No.45, Spring 2023
Received: 2022-02-07
Accepted: 2022-04-04

(Research Paper)

Investigating Synergistic Effects of Dermasptin B1 Recombinant Proteins and Peppermint Essential Oils against Gram-negative Phytopathogens Bacteria using Fractional Inhibitory Concentration Index (FIC)

Hossein Mirzaei Najafgholi*
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabbad, Iran, mirzaei.h@lu.ac.ir
Mitra Khademi
Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran, khademi.mitra@yahoo.com
Farhad Nazarian Firouzabadi
Department of Plant Production and Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran, nazarian.f@lu.ac.ir
Fateme Derikvand
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabbad, Iran, derikvand.fat@fa.lu.ac

Abstract

Introduction: Due to the increasing concern about the growing resistance of pathogenic bacteria to a variety of common antibiotics, it is vital to find and introduce new drugs to treat bacterial infections. To this end, intensive efforts need to be taken to find novel antimicrobial agents with diverse antimicrobial modes of action, preventing pathogen growth. Combination therapy using current antibiotics and other biological or chemical molecules might be efficient as an exciting new approach.

Materials and Methods: In the present study, the synergistic antibacterial activity of Dermastin B1 recombinant peptides isolated from transgenic T1 tobacco plants either alone or in combination with peppermint essential oils were evaluated against *Xanthomonas translucen*, *Xanthomonas perforans*, *Xanthomonas citri*, *Xanthomonas gardneri* and *Pseudomonas syringae* by measuring the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index at different concentrations.

*Corresponding Author

2322-5181/ © The Authors.
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.132629.1451

Results: The results of this study showed that the MIC of Dermaseptin B1 peptides and the peppermint essential oils against bacteria were 50 µg/ml and 4.6 µg/ml, respectively. FIC index showed a synergistic effect of peppermint essential oils with Dermaseptin B1 recombinant peptide with FIC=0.49.

Discussion and Conclusion: The results of this study suggest that Dermasptin B1 recombinant peptides can be effective either alone or in combination with the peppermint essential oils to control bacterial infections. However, it seems that there is a synergistic effect between recombinant peptides and peppermint essential oils in combat against phytopathogens.

Key words: Peppermint Essential Oil, Bacterial Pathogens, Recombinant Peptides, Fractional Inhibitory Concentration Index.

زیســـــت‌شناســـــی میکروارگانیســـــم‌هـــــا
ســـال دوازدهـــم، شـــماره ۴۵، بهـــار ۱۴۰۲ ، صـــفحه ۱۰۴-۹۱
تـاریخ دریافـت: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸ – تـاریخ پـذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۱۵

مقاله پژوهشی

بررسی اثر سینرژیستی پروتئین‌های نوترکیب درماسپتین *B1* و اسانس گیاه پونه علیه باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی گیاهی با استفاده از شاخص غلظت مهاری نسبی (FIC)

حسین میرزایی نجفقلی*: استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، mirzaei.h@lu.ac.ir
میترا خادمی: گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، khademi.mitra@yahoo.com
فرهاد نظریان فیروزابادی: استاد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، nazarian.f@lu.ac.ir
فاطمه دریکوند: دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، derikvand.fat@fa.lu.ac

چکیده

مقدمه: با توجه به افزایش نگرانی به مقاومت باکتری‌ها به انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج، لازم است داروهای جدیدی برای درمان بیماری‌های باکتریایی عرضه شوند؛ بنابراین، تلاش فراوان برای یافتن ترکیبات ضدمیکروبی با مکانیسم عمل متنوع جهت ممانعت از رشد باکتری‌ها باید صورت گیرد. درمان ترکیبی شامل آنتی بیوتیک‌های فعلی و سایر مولکول‌های بیولوژیکی یا شیمیایی از راهکارهای جدید و کارامد در مبارزه علیه بیماری‌های باکتریایی است.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر فعالیت ضدباکتریایی سینرژیستی پپتید نوترکیب درماسپتین B1 جداشده از گیاهان توتون تراریخت در حالت منفرد و ترکیبی با اسانس گیاه پونه علیه پنج باکتری‌های *زانتوموناس ترانس لوسنس*، *زانتوموناس پرفورانس*، *زانتوموناس سیتری*، *زانتوموناس گاردنری* و *سودوموناس سرینگه* پتوار *سرینگه* با استفاده از شاخص غلظت بازدازنده افتراقی (FIC) در غلظت‌های مختلف بررسی شد.

نتایج: نتایج نشان دادند حداقل غلظت بازدارندگی پپتیدهای نوترکیب درماسپتین B1 و اسانس پونه علیه بیمارگرهای باکتریایی ۵۰ میکروگرم بر لیتر و ۴/۶ میکروگرم بر لیتر به‌ترتیب مشاهده شد. محاسبه غلظت بازدارنده افتراقی (FIC شاخص) حاکی از اثرات هم‌افزایی با FIC= ۰/۴۹ اسانس پونه با پپتیدهای نوترکیب علیه باکتری‌ها بود.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © The Authors.
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)
10.22108/BJM.2022.132629.1451

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان می‌دهند پپتیدهای نوترکیب درماسپتین B1 می‌توانند به تنهایی یا در ترکیب با اسانس پونه برای کنترل بیماری‌های باکتریایی مؤثر باشند؛ با این حال به نظر می‌رسد بین پروتئین‌های نوترکیب و مواد مؤثره گیاه پونه ارتباط سینرژیستی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: اسانس پونه، بیمارگرهای باکتریایی، پپتیدهای نوترکیب، شاخص غلظت بازدارنده افتراقی

مقدمه

در طی چند دهه گذشته، استفاده بیش از حد یا سوءمصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌ها (انسانی، دامپزشکی و کشاورزی) باعث مقاومت دارویی باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های رایج شده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی خطر جدی برای سیستم بهداشت جهانی است. توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید با مکانیسم‌های عمل متنوع صورت گرفته است؛ اما فرایندهای کشف و توسعه داروهای جدید معمولاً ۱۰ تا ۱۷ سال طول می‌کشد و میزان موفقیت آنها کمتر از ۱۰ درصد است (۱ و ۲ و ۳)؛ بنابراین، نیاز است داروهای جدید ضدمیکروبی برای درمان بیماری‌های باکتریایی عرضه شود. همچنین در صنعت کشاورزی، بیماری‌های گیاهی سبب افت چشمگیر عملکرد، کاهش کیفیت و ایمنی محصولات زراعی می‌شوند که یک معضل برای امنیت غذایی در سراسر جهان به‌خصوص در کشورهای درحال توسعه‌اند. استفاده از سموم شیمیایی یکی از روش‌های متداول برای جلوگیری از کاهش محصول است که در درازمدت سبب مقاومت اکتسابی بیمارگر و روند روبه‌رشد آلودگی‌های زیست‌محیطی می‌شود (۴ و ۵ و ۶).

عوامل بیماری‌زای گیاهی تنوع بسیار زیادی دارند که نزدیک به ۷۱۰۰ گونه شامل ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و نماتدها هستند. در این میان، تقریباً ۱۵۰ گونه باکتری وجود دارند که باعث بیماری در گیاهان می‌شوند. مناطق گرمسیری به‌دلیل شرایط گرم و مرطوب برای رشد باکتری‌ها مطلوب است؛ بنابراین، در این مناطق بیمارگرهای باکتری شایع‌تر است. مخرب‌ترین عوامل بیماری‌زای گیاهی متعلق به جنس‌هایی مانند *اروینیا*[1]، *پکتوباکتریوم*[2]، *پانتوئا*[3]، *آگروباکتریوم*[4]، *سودوموناس*[5]، *رالستونیا*[6]، *بورخولدریا*[7]، *اسیدووراکس*[8]، *زانتوموناس*[9]، *کلاویباکتر*[10]، *استرپتومایسس*[11]، *زایلا*[12]، *اسپیروپلاسما*[13] و *فیتوپلاسما*[14] هستند (۷ و ۸ و ۹ و ۱۰).

ازجمله بیماری‌های مهم باکتریایی می‌توان به بیماری شانکر باکتریایی مرکبات (CBC)، ناشی از *زانتوموناس سیتری* زیرگونهٔ *سیتری* (*Xcc*)[15] اشاره کرد که یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات است و آسیب مستقیم و غیرمستقیم به صنعت مرکبات وارد می‌کند (۱۱).

محققان به دنبال مواد ضدمیکروبی جدید از منابع مختلف ازجمله اسانس‌های گیاهی به‌عنوان جایگزین‌های مناسب برای سموم شیمیایی هستند. امروزه گیاهان دارویی به‌دلیل داشتن متابولیت‌های ثانویه، بیشتر مدنظر محققان در زمینهٔ تولید ترکیبات ضدمیکروبی قرار گرفته‌اند. اسانس‌ها و عصاره‌های مشتق‌شده از گیاهان یکی از گزینه‌های مناسب برای کنترل بیمارگرها هستند که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده‌اند. پونه (منا لونگیفولیا)[16] یکی از گیاهان دارویی خانواده نعناعیان است که منبع ارزشمندی از متابولیت‌های ثانویه برای درمان طبیعی انواع بیماری‌ها دارد که تاکنون از آن استفاده شده است (۱۲ و ۱۳). از مهم‌ترین اجزای موجود در اسانس پونه ترکیب‌های

لیمونین[۱۷]، گاما کاریوفیلین[۱۸]، رو ـ سیمنین[۱۹]، لینالول[۲۰]، آلفا ـ پینین[۲۱]، کارواکرول[۲۲] و تیمول[۲۳] هستند. خاصیت ضدمیکروبی گیاه پونه مربوط به ترکیب کارواکرول و تیمول است (۱۲ و ۱۳)؛ بنابراین، استفاده مکرر و بی-رویه از ترکیبات شیمیایی و آفت‌کش‌ها در صنعت کشاورزی و همچنین مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان انسان و دام باعث ظهور باکتری‌های مقاوم شده است؛ بنابراین، ضرورت تحقیق و معرفی انواع جدیدی از ترکیبات ضدمیکروبی برای کنترل بیمارگرهای انسانی و گیاهی را افزایش داده است.

فناوری مهندسی ژنتیک، فرصت‌های جدیدی برای تولید محصولات زراعی تراریخت مقاوم به طیف وسیعی از بیمارگرها با استفاده از معرفی ژن‌های خارجی فراهم کرده است. در میان طیف وسیعی از ترکیبات ضدمیکروبی، پپتیدهای ضدمیکروبی به‌دلیل فعالیت ضدمیکروبی قوی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، قارچ‌ها و ویروس‌ها به‌عنوان جایگزین مناسب مدنظر محققان قرار گرفته‌اند (۱۴ و ۱۵). پپتیدهای ضدمیکروبی (AMP) پروتئین‌های کوچک با توالی کمتر از ۱۰۰ اسید آمینه هستند که توسط طیف وسیعی از موجودات زنده تولید می‌شوند و به‌دلیل نقش ضروری آنها در سیستم ایمنی ذاتی، از آنها به‌عنوان پپتیدهای دفاعی میزبان یاد می‌شود (۱۶). از ویژگی منحصربه‌فرد پپتیدهای ضدمیکروبی این است که بین غشاهای میکروبی مهاجم و غشاهای گیاهان و حیوانات میزبان، تفاوت قائل می‌شوند و به همین علت به‌صورت گزینشی عمل می‌کنند؛ ازاین‌رو، احتمال کمی وجود دارد که سویه‌های مقاوم در برابر این پپتیدها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های متداول ظهور پیدا کنند؛ بنابراین، معرفی چنین پپتیدهایی می‌تواند کاندیدهای دارویی مناسبی برای درمان بیماری‌های عفونی و بیمارگرهای گیاهی در آینده باشد (۱۴).

پپتید درماسپتین B1 (DrsB1) یک پپتید ضدمیکروبی کاتیونی به طول ۳۱ اسید آمینه از خانواده درماسپتین‌ها است که از ترشحات پوستی قورباغه (فیلومدوزا بیکولور) جداسازی شده است. درماسپتین B1 بیشترین قدرت ضدمیکروبی را بین همه درماسپتین‌ها دارد (۱۷). تاکنون تأثیر نسبی پپتیدهای خانواده درماسپتین در جلوگیری از رشد بیماری‌زاهای قارچی و باکتریایی بررسی شده است؛ اما هنوز اطلاعات کافی دربارهٔ فعالیت سینرژیستی این پپتید با سایر پروتئین‌های دیگر و اسانس گیاه پونه وجود ندارد. این مطالعه برای نخستین‌بار با هدف بررسی اثرات ضدمیکروبی پپتید درماسپتین B1 با اسانس گیاه پونه ترکیب با سایر پروتئین‌های نوترکیب پپتید درماسپتین B1 همچون CBD_{Avr4}-DrsB1، DrsB1-CBD_{Avr4}، $(CBD_{Avr4})2$-DrsB1، CBD_{rice}-DrsB1 و DrsB1-CBD_{rice} علیه تعدادی از باکتری‌های بیمارگر گیاهی بررسی شده است. نتایج این مطالعه می‌تواند در راستای تولید داروی ضدمیکروبی مناسب درخور توجه واقع شود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های باکتریایی: جدایه‌های استاندارد استفاده‌شده برای انجام آزمایشات ضدباکتریایی شامل *زانتوموناس ترانس لوسنس*[۲۴]، *زانتوموناس پرفورانس*[۲۵]، *زانتوموناس سیتری*[۲۶]، *زانتوموناس گاردنری*[۲۷] و *سودوموناس سرینگه* پتوار *سرینگه*[۲۸] بودند. این جدایه‌های استاندارد از آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان تهیه شدند.

ضدعفونی و کشت بذرهای تراریخت نسل T1: بذرهای توتون نسل T1 حاوی سامانه‌های ژنی

CBD_{Avr4}-DrsB1، DrsB1-CBD_{Avr4}، $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1، CBD_{rice}-DrsB1 و DrsB1-CBD_{rice}، حاصل از نتایج قبلی تیم تحقیقاتی حاضر، به مدت ۱۰ دقیقه در یک محلول شوینده (حاوی ۳۰۰ میکرولیتر هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، ۶ میکرولیتر تریتون ۱۰۰X و ۷۰۰ میکرولیتر آب استریل)، ضدعفونی و سپس سه مرتبه با آب استریل شستشو داده شدند (۱۸). بذرها به‌صورت فاصله‌دار روی محیط کشت MS (۱۹) (pH =۵/۸) حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و در شرایط نوری ۱۰۰۰ لوکس با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۲ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد در اتاق کشت نگهداری شدند.

آنالیز گیاهان تراریخت با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: به‌منظور تأیید تراریختی گیاهچه‌های نسل T1، DNA ژنومی از گیاهچه‌ها به روش CTAB استخراج شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده ازطریق اسپکتروفتومتر و الکتروفورز ژل آگارز انجام شد. سپس آنالیز زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های پپتید درماسپتین B1 (DrsB1) DrsB1 F: GCTAAGGCTATGTGGAAGGATG و DrsB1 R: ATTGAGAAATAGTATCAGCAACAGC روی DNA ژنومی به‌عنوان الگو انجام شد (۱۸). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، تکثیر DNA الگو در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برحسب طول قطعه از ۳۰ ثانیه تا یک دقیقه و یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

استخراج پروتئین: به‌منظور استخراج پروتئین، ۵ گرم از بافت گیاهان تراریخت از سامانه‌های ژنی CBD_{Avr4}-DrsB1، DrsB1-CBD_{Avr4}، $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1)، CBD_{rice}-DrSB1 و $DrsB1_{rice}$-CBD به‌صورت جداگانه در بافر فسفات پتاسیم (pH=7، 50 mM) حاوی بازدارنده پروتئاز فنیل سولفونیل فلوراید (1 Mm، PMSF)، اضافه و بعد از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد فاز رونشین جدا شد. مراحل تخلیص پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از ستون نیکل (Ni-IDA) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. غلظت پروتئین‌های نوترکیب تخلیص‌شده و همچنین گیاه شاهد با استفاده از روش برافورد و سرم آلبومین گاوی (BSA) به‌عنوان استاندارد تعیین شد (۲۰).

بررسی خواص ضدباکتریایی پروتئین‌های نوترکیب میکروبی و اسانس‌ها به روش نشت در دیسک: جدایه‌های باکتریایی روی محیط کشت آگار مغذی در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد رشد داده شدند. از هر جدایه باکتری غلظت با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت آگار غذایی به‌صورت چمنی کشت شد. سپس دیسک‌های کاغذی استریل (۶ میلی‌متری) محتوی ۱۰ میکرولیتر از هر پروتئین نوترکیب (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و اسانس پونه (۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) روی محیط‌های کشت قرار داده شدند. کشت‌های باکتریایی ۴۸ ساعت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس قطر هاله عدم رشد (براساس میلی‌متر) اندازه‌گیری شدند.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل براساس طرح کاملاً

تصادفی در سه تکرار انجام گرفت و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار MSTATC تجزیه و تحلیل شدند. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌ها برای عصاره‌های پروتئینی نوترکیب و اسانس پونه با روش دانکن محاسبه شد.

بررسی حداقل غلظت کشندگی و بازدارندگی پروتئین های نوترکیب گیاهی و اسانس پونه: در این روش رقت‌های مختلف از پروتئین‌های نوترکیب با استفاده از بافر استخراج فسفات پتاسیم و اسانس در حلال DMSO تهیه شد. سپس کشت تازه از جدایه‌های باکتریایی با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند تهیه و مقدار ۱۰ میکرولیتر به محیط کشت NB، حاوی غلظت‌های مختلف پروتئین‌های نوترکیب و اسانس درون چاهک‌های پلیت الیزا اضافه شد. پلیت‌ها در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. اولین چاهک که در آن هیچ رشدی مشاهده نشد به عنوان MIC یا حداقل غلظت مهار کننده رشد تعیین شد. سپس از رقت MIC و چند رقت بالاتر از آن روی محیط کشت منتقل شد و اولین رقت که در آن رشدی مشاهده نشد، به عنوان MBC یا حداقل غلظت کشنده رشد در نظر گرفته شد (۲۱).

بررسی فعالیت ضدمیکروبی پروتئین‌های نوترکیب علیه بیمارگرهای باکتریایی: به‌منظور بررسی برهمکنش ضدمیکروبی پروتئین‌های نوترکیب و اسانس پونه، غلظت مهاری کسری (FIC) تعیین شد. غلظت مهاری نسبی عبارت است از غلظت ماده مهارکننده در صورت ترکیب نسبت به وقتی که همان ماده به تنهایی استفاده می‌شود. برای تعیین FIC پروتئین‌های نوترکیب، $DrsB1\text{-}CBD_{Avr4}$، $(CBD_{Avr4})_2\text{-}DrsB1$، DrsB1، $CBD_{rice}\text{-}DrsB1$ و $DrsB1_{rice}\text{-}CBD$ و اسانس پونه از روش مرسوم چکر بورد استفاده شد. ترکیبات آزمایش‌شده در برابر باکتری‌های گرم منفی در یک محدوده غلظت از هر پروتئین نوترکیب در ترکیب با اسانس گیاهی پونه از $\frac{1}{4}$ MIC تا ۲ MIC بررسی می‌شوند. حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) با استفاده از روش رقت‌سازی در لوله تعیین شد. تهیه سریال رقت با استفاده از پلیت ۹۶ خانه انجام شد. ابتدا غلظت‌های مختلفی از پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه علیه بیمارگرها در حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر، در مقابل باکتری قرار داده و رشد باکتری‌ها بررسی شد. یک چاهک به‌عنوان کنترل منفی (حاوی محیط کشت) و پروتئین نوترکیب و یک چاهک به‌عنوان کنترل مثبت (حاوی سوسپانسیون میکروب به علاوه محیط کشت) در نظر گرفته شدند. سپس به همه چاهک‌ها مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت نیم مک‌فارلند ($1/5 \times 10^8$ سلول) اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. هر آزمایش سه بار انجام شد. شاخص غلظت مهاری کسری (FIC) به شرح زیر محاسبه می‌شود:

$$FIC = \frac{\text{MIC of recombinant peptides in the combination}}{\text{MIC of recombinant peptides alone}} + \frac{\text{MIC of Mena longifulia in the combination}}{\text{MIC of Mena longifulia alone}}$$

FICI به شرح زیر تفسیر شد:

هم‌افزایی $FIC \leq 0/50$، اثر افزودنی $0/5 < FIC \leq 1.0$، بی‌تفاوتی $1 \leq FIC \leq 4$ و آنتاگونیسم $FIC > 4$

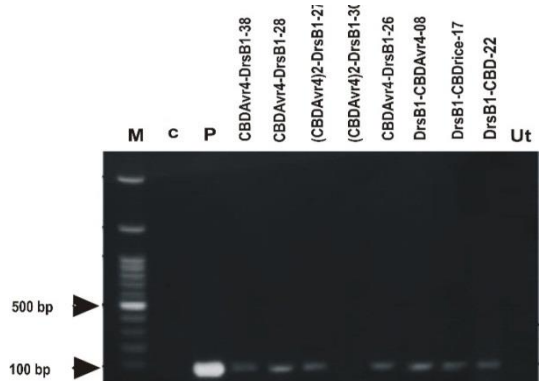
چنانچه میزان شاخص FIC کمتر از ۰/۵ باشد، برهمکنش دو ترکیب به‌عنوان اثر هم‌افزایی (سینرژیست) شناخته خواهد شد. اگر شاخص بین ۰/۵ تا ۱ باشد به‌عنوان افزایشی، بین ۱ تا ۴ به‌عنوان برهمکنش بدون اثر و در صورتی که بزرگ‌تر از ۴ باشد آنتاگونیستی در نظر

گرفته می‌شود.

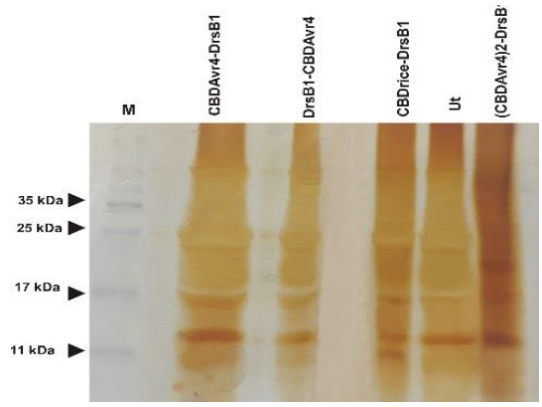
نتایج

استخراج DNA از گیاهان تراریخت و تأیید وجود پپتیدهای نوترکیب: به‌منظور غربالگری گیاهان تراریخت، DNA ژنومی از برگ‌های تازه از هریک از لاین تراریخت حاوی پپتید نوترکیب نسل T1 و گیاه شاهد غیرتراریخت استخراج شد. پس از بررسی کیفیت و خلوص نمونه‌های DNA، همه لاین‌های تراریخت برای تأیید وجود ژن نوترکیب با آغازگرهای اختصاصی پپتید درماسپتین B1 با PCR آزموده شدند (شکل ۱). آنالیز این گیاهان نشان داد در ژنوم گیاهان تراریخت، توالی ژن کدکنندهٔ پروتئین نوترکیب درماسپتین B1 وارد شده بود و تکثیر قطعه حدود ۱۰۰ جفت‌بازی با آغازگرهای اختصاصی (DrsB1-F و DrsB11-R) ژن با اندازه مدنظر مطابقت داشت (شکل ۱).

بررسی تولید پروتئین‌های نوترکیب: به‌منظور بررسی و مشاهده بیان پپتیدهای نوترکیب در گیاهان تراریخت از روش SDS-PAGE استفاده شد. باندها به اندازه ۱۳، ۲۳ و ۱۰ کیلودالتون متناسب با اندازه مورد انتظار پپتیدهای نوترکیب در لاین‌های CBD_{Avr4}-DrsB1، DrsB1-CBD_{Avr4}، (CBD_{Avr4})-DrsB1 و $DrsB1_{rice}$-CBD مشاهده شدند که نشان داد گیاهان تراریخت قادرند به خوبی و به مقدار زیاد این پپتیدهای نوترکیب را تولید کنند؛ درحالی‌که در گیاه شاهد هیچ باند پروتئینی متناظر با اندازه پپتیدهای مدنظر مشاهده نشد (شکل ۲).



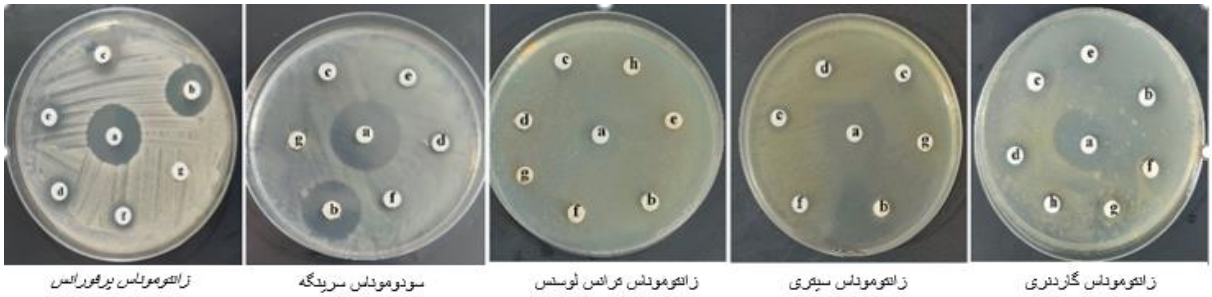
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR گیاهچه‌های تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. M، P و C^- به‌ترتیب نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp، کنترل مثبت (پلاسمید pGSA/ CBD-DrsB1) و کنترل منفی (استفاده از آب به‌جای الگو)، CBD-DrsB1، DrsB1-CBD و (CBD Avr4)2-DrsB1 لاین‌های تراریخت و Ut: شاهد غیرتراریخت



شکل ۲. آنالیز بیان پپتیدهای نوترکیب CBD_{Avr4}-DrsB1، DrsB1-CBD_{Avr4}، $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1 و CBD_{rice}-DrsB1 با استفاده از روش SDS-PAGE و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره؛ M: نشانگر پروتئینی (Tris Glycine) برحسب کیلودالتون (kDa)، Ut به‌ترتیب پروتئین از گیاه و شاهد غیرتراریخت. پپتیدهای نوترکیب از تراریخت انتخابی جداسازی و در ژل ۱۴ درصد اکریل آمید الکتروفورز شدند.

تأثیر عصاره پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه علیه پنج بیمارگر گیاهی به روش انتشار در آگار با استفاده از دیسک: نتایج آزمون انتشار در دیسک نشان دادند عصاره‌های پروتئین‌های نوترکیب CBD_{Avr4}-DrsB1، DrsB1-CBD_{Avr4}، $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1 و CBD_{rice}-

DrsB1 و همچنین اسانس پونه توانستند از رشد پنج گونه باکتری بیماری‌زای گیاهی جلوگیری کنند؛ اما فعالیت بازدارندگی اسانس پونه با اختلاف معناداری (P<0.05) نسبت به پپتیدهای نوترکیب بیشتر بود (شکل ۳، جدول ۱).



شکل ۳- تشکیل هاله عدم رشد باکتری‌ها در اثر تیمار پروتئین‌های نوترکیب، اسانس پونه و گیاه غیرتراریخت؛ a) آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (10 نانوگرم)، b) اسانس پونه، c) پپتید نوترکیب CBD-DrsB1، d) پپتید نوترکیب DrsB1-CBD، e) پپتید نوترکیب $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1، f) CBD_{rice}-DrsB1، g) $DrsB1-CBD_{rice}$، h) پروتئین گیاه شاهد غیرتراریخت

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه روی باکتری‌های بیمارگر

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات
پپتید	۵	۶/۱۸**
باکتری	۴	۱/۵۴**
باکتری × پپتید	۲۰	۰/۱۶*
خطا	۶۰	۰/۰۰۶
ضریب تغییرات		٪ ۷/۳۶

ns، * و ** به‌ترتیب یعنی غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد

بیشترین فعالیت بازدارندگی علیه رشد باکتری‌ها مربوط به اسانس پونه بود و فعالیت عصاره CBD_{Avr4}-DrsB1، $DrsB1-CBD_{Avr4}$ و $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1 نوترکیب اختلاف معناداری با سایر پپتیدهای نوترکیب همچون CBD_{rice}-DrsB1 و CBD_{rice}-DrsB1 بر رشد باکتری‌ها نشان داد (شکل ۳، جدول ۱). عصاره‌ی پروتئینی گیاه غیر تراریخت نیز فاقد فعالیت بازدارندگی علیه باکتری‌ها بود و پروتئین نوترکیب-CBD_{rice}

مقایسه میانگین اثر پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه روی پنج گونه باکتری به روش انتشار در دیسک DrsB1 اثر بازدارندگی را بر رشد باکتری‌های زانتوموناس ترانس لوسنس نداشتند (شکل ۳، جدول ۱). بیشترین فعالیت ضدمیکروبی پروتئین‌های نوترکیب و اسانس پونه به‌ترتیب علیه باکتری‌های *زانتوموناس پرفورانس*، *زانتوموناس سیتری* و *سودوموناس سرینگه* بود. همچنین از پپتید نوترکیب $DrsB1-CBD_{rice}$ هیچ‌گونه فعالیت ضدباکتریایی مشاهده نشد.

نشان داد باکتری‌های *زانتوموناس سیتری* و *سودوموناس سرینگه* بیشترین حساسیت را نسبت به پپتیدهای

نوترکیب داشتند؛ درحالی‌که باکتری *زانتوموناس ترانس لوسنس* حساسیت کمتری نسبت به پپتیدهای نوترکیب داشت.

اسانس پونه نسبت به پپتیدهای نوترکیب علیه پنج باکتری از قدرت مهارکنندگی بیشتری برخوردار بود. همچنین قدرت مهارکنندگی هر دو پپتید نوترکیب CBD_{rice}-DrsB1 و DrsB1-CBD_{rice} نسبت به سایر باکتری‌ها کمتر بود (شکل ۳). نتایج حاصل از مقایسه میانگین پپتیدهای نوترکیب دارای دمین اتصال به کیتین نشان دادند پپتیدهای نوترکیب حاصل از CBD_{Avr4}-DrsB1، DrsB1-CBD_{Avr4} و $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1 نسبت به پپتید نوترکیب حاصل از DrsB1-CBD_{rice} علیه باکتری‌های مطالعه‌شده، قدرت مهارکنندگی بیشتری از خود نشان داد.

حداقل غلظت مهارکننده‌گی (MIC) پپتیدهای نوترکیب حاصل از گیاهان تراریخت نسل T1 و اسانس پونه: حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) غلظتی از پپتیدهای نوترکیب است که می‌تواند به میزان ۹۰ درصد از رشد باکتری‌ها جلوگیری کند. نتایج حاصل از حداقل غلظت بازدارندگی پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه در جدول ۲ نشان داده شده‌اند. نتایج به‌دست‌آمده از داده‌های MIC روی باکتری‌های گیاهی نشان دادند بیشترین اثر ضدباکتریایی پپتیدهای نوترکیب علیه باکتری‌های *زانتوموناس پرفورانس*، *زانتوموناس سیتری*، *زانتوموناس گاردنری* و *سودوموناس سرینگه* مشاهده شد که MIC مربوط به آن ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود؛ درحالی‌که باکتری *زانتوموناس ترانس لوسنس* با میزان MIC مساوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مقاومت بیشتری در مقابل پپتیدهای نوترکیب از خود نشان داد. براساس نتایج آزمایش MIC، بیشترین میزان MIC تعیین‌شده روی باکتری‌ها با اسانس پونه، به باکتری‌های *زانتوموناس ترانس لوسنس* و *زانتوموناس گاردنری* با غلظت ۹/۳۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر مربوط بود. با توجه به این نتایج مشخص شد مقدار غلظت بیشتری از اسانس پونه برای مهار این باکتری‌ها در مقایسه با سایر باکتری‌ها مورد نیاز بود. مقدار MIC برای باکتری *زانتوموناس ترانس لوسنس* در بیش از ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از پپتید نوترکیب CBD_{rice}-DrsB1 به دست آمد. نتایج تعیین MBC نیز نشان دادند حداقل غلظتی از پپتیدهای نوترکیب CBD_{Avr4}-DrsB1، DrsB1-CBD_{Avr4}، $(CBD_{Avr4})2$-DrsB1 و CBD_{rice}-DrsB1 که به کشندگی باکتری‌های *زانتوموناس پرفورانس*، *زانتوموناس سیتری*، *زانتوموناس گاردنری* و *سودوموناس سرینگه* منجر می‌شود، نصف غلظت مورد نیاز برای کشندگی *باکتری زانتوموناس ترانس لوسنس* بود (جدول ۲).

به‌طورکلی نتایج حاصل از این بخش نشان می‌دهند براساس FIC شاخص، ترکیب اسانس پونه با پروتئین نوترکیب و پروتیئن‌های نوترکیب با همدیگر علیه باکتری‌ها دارای اثرات مختلفی از نوع هم‌افزایی، افزایی، بی‌اثر و آنتاگونیستی هستند.

جدول ۲- مقایسه تأثیر عصاره پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه روی میزان قطر هاله عدم رشد پنج گونه باکتری بیمارگر گیاهی

ترکیب پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه	جدایه‌های باکتری	میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری (میلی‌متر)
آنتی‌بیوتیک جنتامایسین	*زانتوموناس پرفورانس*	۱/۹۶ b

	سودوموناس سرینگه	۲ b
	زانتوموناس ترانس لوسنس	۱ efg
	زانتوموناس سیتری	۲ b
	زانتوموناس گاردنری	۱/۵ d
اسانس پونه	*زانتوموناس پرفورانس*	۱/۸ c
	سودوموناس سرینگه	۲/۰۶ b
	زانتوموناس ترانس لوسنس	۰/۹۶ fg
	زانتوموناس سیتری	۲/۳ a
	زانتوموناس گاردنری	۱ efg
CBD_{Avr4}-DrsB1	*زانتوموناس پرفورانس*	۱/۱ e
	سودوموناس سرینگه	۱ ef
	زانتوموناس ترانس لوسنس	۰/۴ j
	زانتوموناس سیتری	۰/۸ hi
	زانتوموناس گاردنری	۰/۹ gh
$(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1	*زانتوموناس پرفورانس*	۱ efg
	سودوموناس سرینگه	۱ efg
	زانتوموناس ترانس لوسنس	۰/۴ j
	زانتوموناس سیتری	۰/۷ i
	زانتوموناس گاردنری	۰/۹ gh
DrsB1-CBD_{Avr4}	*زانتوموناس پرفورانس*	۱ efg
	سودوموناس سرینگه	۰/۹ gh
	زانتوموناس ترانس لوسنس	۰/۳ j
	زانتوموناس سیتری	۰/۷ i
	زانتوموناس گاردنری	۰/۹ gh
CBD_{rice}-DrsB1	*زانتوموناس پرفورانس*	۰/۸ hi
	سودوموناس سرینگه	۰/۸ hi
	زانتوموناس ترانس لوسنس	۰/۰ k
	زانتوموناس سیتری	۰/۴ j
	زانتوموناس گاردنری	۰/۰ k

میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک با هم اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد نداشتند.

با مقایسه شاخص FIC یا حداقل غلظت بازدانده افتراقی مشخص شد بین ترکیب‌های دوتایی اسانس پونه با پروتئین‌های نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4}، (CBD $_{Avr4})_2$-DrsB1، CBD-DrsB1 $_{Avr4}$- با FIC= ۰/۴۹ روی باکتری‌های *زانتوموناس پرفورانس*، *زانتوموناس سیتری*، *زانتوموناس گاردنری* و *سودوموناس سرینگه* پتوار *سرینگه* اثر هم‌افزایی وجود داشت. همچنین ترکیب اسانس پونه با پروتئین‌های نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4}، (CBD $_{Avr4})_2$-DrsB1 و CBD_{Avr4}-DrsB1 علیه باکتری *زانتوموناس ترانس لوسنس* اثر افزایشی دارد و

ترکیب‌های اسانس با پروتئین CBD_{rice}-DrsB1 علیه باکتری *زانتوموناس ترانس لوسنس* فاقد اثر مهم افزایی یا افزایشی هستند. همچنین ترکیب دوتایی هریک از پروتئین‌های نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4}، -$(CBD_{Avr4})_2$ DrsB1 و -$_{Avr4}$ CBD-DrsB1 با همدیگر دارای اثر افزایشی علیه باکتری‌های *زانتوموناس پرفورانس*، *زانتوموناس گاردنری و سودوموناس سرینگه* بود؛ درحالی‌که ترکیب این پپتیدهای نوترکیب با پپتید نوترکیب CBD_{rice}-DrsB1 علیه باکتری *زانتوموناس پرفورانس و سودوموناس سرینگه* اثر هم‌افزایی داشت و ترکیب دوتایی این پپتید با سایر پپتیدها فاقد اثر هم‌افزایی یا افزایشی علیه باکتری *زانتوموناس ترانس لوسنس* بود. همچنین ترکیب پپتید CBD_{rice}-DrsB1 با پپتیدهای دیگر دارای اثر بی‌تفاوتی بر باکتری *زانتوموناس سیتری و زانتوموناس گاردنری* تشخیص داده شدند.

جدول ۳. حداقل غلظت مهارکنندگی پروتئین‌های نوترکیب علیه بیمارگرها

	CBD_{Avr4}-DrsB1 (µg/ml)		$(CBD_{Avr4})_2$DrsB1 (µg/ml)		DrsB1-CBD_{Avr4} (µg/ml)		CBD rice-DrsB1 (µg/ml)		Mentha (mg/ml)	
پاتوژن	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
زانتوموناس ترانس لوسنس	100	200	100	200	100	200	>100	-	9.37	18.75
سودوموناس پرفورانس	50	100	50	100	50	100	100	200	4.86	9.37
زانتوموناس سیتری	50	100	100	200	100	200	100	200	4.68	9.37
زانتوموناس گاردنری	50	100	50	100	100	200	100	200	9.37	18.75
زانتوموناس سرینگه	50	100	50	100	50	100	50	100	4.6	9.37

بحث و نتیجه‌گیری

پپتیدهای ضدمیکروبی با توانایی نفوذ در غشای بیمارگر و عدم سمیت برای سلول‌های انسانی گزینه مناسبی برای جایگزین کردن آنتی‌بیوتیک‌ها هستند (۲۲)؛ بنابراین، استفاده درمانی به‌صورت ترکیبی از اسانس‌های گیاهی با پپتیدهای ضدمیکروبی می‌تواند از پیشرفت مقاومت در سویه‌های بیمارگر جلوگیری کند. در این راستا، پپتیدهای نوترکیب درماسپتین B1 با اسانس پونه علیه پنج بیمارگر باکتریایی در محیط آزمایشگاهی *درون پتری* بررسی شدند. نتایج این مطالعه نشان‌دهندهٔ کاهش میزان MIC و اثر هم‌افزایی پپتیدهای نوترکیب -CBD_{Avr4} DrsB1 و $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1 با اسانس پونه بودند.

مطالعات متعددی نشان دادند مهم‌ترین اجزا و ترکیب‌های موجود در اسانس پونه شامل لیمونین، گاما کاریوفیلین، رو - سیمنین، کامفوره، لینالول، آلفا - پینین، کارواکرول و تیمول است (۲۳ و ۲۴ و ۲۵). از بین ترکیبات ذکرشده، کارواکرول و تیمول مهم‌ترین اجزای اسانس گیاه پونه و مسئول آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی هستند (۲۴ و ۲۵ و ۲۶). همچنین در این تحقیق اثر ضدباکتری اسانس پونه و پپتیدهای نوترکیب علیه بیمارگر باکتریایی نشان داد بیشترین اثر بازدارندگی علیه باکتری بیماری‌زا در اسانس پونه به‌دلیل داشتن این عوامل ضدمیکروبی همانند تیمول و کارواکرول است. همچنین این اسانس به‌دلیل خاصیت آبگریزی این ترکیبات، موجب نفوذ این مواد به لیپیدهای غشای سلول باکتری و میتوکندری‌ها و اختلال در ساختمان آنها و ایجاد

نفوذپذیری بیشتر شده است (۲۶).

مطالعات انجام‌شده روی اسانس‌های گیاهی نشان داده‌اند اسانس‌ها فاز تأخیری رشد باکتری را طولانی‌تر می‌کنند و در مقابل، سرعت رشد در فاز لگاریتمی را کاهش می‌دهند. عملکرد آنها از یک سازوکار واحد تبعیت می‌کند که به تجمع آنها در دو لایه لیپیدی غشای سلول و تخریب ساختار آن مربوط است (۲۶).

در راستای بررسی اثرات ضدمیکروبی اسانس گیاه پونه وحشی پژوهشی صورت گرفت که نشان داد فعالیت ضدمیکروبی اسانس پونه به‌دلیل وجود ترکیبات مهمی همچون کارواکرول و تیمول است که به‌طور چشمگیری علیه باکتری‌های گرم منفی اثر کشندگی دارند. از دلایل مهم برای این امر می‌توان به ماهیت آبگریزی این ترکیب‌ها و تأثیر آنها بر لایه فسفولیپیدی غشای سیتوپلاسمی باکتری، کاهش یکپارچگی غشا و نشت مواد درون سلول باکتری اشاره کرد. نتایج این محققان با نتایج حاصل از این مطالعه هم‌خوانی داشت (۲۶).

همچنین در پژوهشی تأثیر چند اسانس گیاهی علیه بیماری زانتوموناس سیتری زیرگونه سیتری صورت گرفت که تنوع گسترده‌ای در خواص ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آنها در برابر Xcc-KVXCC1 مشاهده شد. نتایج آنها نشان دادند اسانس‌های سیتروس آرانتیوم[۲۹]، سیتروس اورانتیفولیا[۳۰]، آلفا - ترپینول[۳۱]، سیترال، سیترونلال، ژرانیول، لینالول، لینالیل استات که ترکیبات اصلی آنها شامل سیترال، لینالول، سیترونلال، ژرانیول، آلفا ـ ترپینئول و لینالیل استات هستند، اثرات ضدباکتریایی علیه Xcc-KVXCC1 دارند. سیتروس اورانتیفولیا و سیترال بیشترین ناحیه بازداری را به‌ترتیب ۰/۳۳±۱۵ و ۰/۸۸±۱۶/۶۷ میلی‌متر نشان دادند (۲۷).

مکانیسم عمل برخی از پپتیدها ازطریق تعامل با غشا است که به فعالیت همولیتیکی و سمیت سلولی منجر خواهد شد. مطالعات قبلی روی پپتید درماسپتین B1 و همچنین پپتیدهای نوترکیب درماسپتین B1 طراحی‌شده نشان داده‌اند این پپتیدها دارای پتانسیل ضدمیکروبی قوی در برابر بیمارگرها و بدون ایجاد اثر همولیتیک‌اند (۱۸ و ۲۸). نتایج این مطالعه اثر ضدمیکروبی علیه پنج بیمارگرهای باکتریایی را نشان می‌دهند. همچنین نتایج این مطالعه نشان می‌دهند اتصال دمین متصل به کیتین ژن *Avr4* قارچ *کلادوسپوریوم فلاوم* نسبت به دمین متصل به کیتین از کیتیناز برنج، اثرات ضدمیکروبی مؤثری علیه بیمارگرهای باکتریایی داشت (۱۸ و ۲۸). مقادیر MIC و MBC در جدول ۳ نشان‌دهندهٔ اثرات متفاوت ضدمیکروبی پپتیدهای نوترکیب هستند.

بررسی اولیه فعالیت ضدمیکروبی پپتیدهای نوترکیب به روش هاله عدم رشد نشان داد پپتید نوترکیب دارای فعالیت ضدمیکروبی معنی‌دار است. در مرحله بعدی، آزمایش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی پپتیدهای نوترکیب نشان داد باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی به میزان بسیار بالایی در مقابل پپتیدهای نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4}، $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1 و CBD_{Avr4}-DrsB1 حساس‌اند و در غلظت‌های پایین ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت‌تأثیر این پپتیدهای نوترکیب از بین می‌روند. همچنین بیشترین اثر ضدمیکروبی مربوط به پپتید نوترکیب DrsB1-CBD_{Avr4}، $(CBD_{Avr4})_2$-DrsB1 و CBD_{Avr4}-DrsB1 روی نام باکتری *زانتوموناس پرفورانس* و *سودوموناس سرینگه* بود. برای کنترل رشد باکتری *زانتوموناس ترانس لوسنس* به غلظت (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بیشتری از پروتئین‌های نوترکیب در مقایسه با دیگر باکتری‌ها نیاز بود.

دلیل این تفاوت ناشی از جایگاه اتصال به کیتین دمین متصل به کیتین در کیتیناز گیاهی و افکتور اختصاصی نژاد *Avr4* قارچ *کلادوسپوریوم فلاوم*[۳۲] است؛ به‌طوری که جایگاه اتصال به کیتین در *Avr4* بزرگ‌تر از جایگاه اتصال به کیتین در دمین هوئین است؛ ازاین‌رو، *Avr4* با شدت بیشتری به پلیمر N-استیل گلوکز آمین از پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری متصل می‌شود. همچنین با اتصال دمین مسئول اتصال به کیتین از پروتئین *Avr4* ضمن افزایش بار مثبت پپتید، تمایل به سمت دیواره غشای باکتری افزایش می‌یابد و شرایطی برای فعالیت پپتید درماسپتین B1 فراهم می‌کند (۲۸).

تاکنون بیشتر مطالعات انجام‌شده دربارهٔ اثر هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک‌ها با اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی علیه بیمارگرهای مختلف بوده است؛ برای مثال، در تحقیقات گذشته اثرات هم‌افزایی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین با آویشن، مرزه، رزماری، پونه و نعناع علیه بیمارگر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*[۳۳]، *فیسیوم آنتروکوکوس*[۳۴] و *اینتروکوکوس فکالیس*[۳۵] بررسی شده‌اند (۲۹)؛ اما به اثرات هم‌افزایی بین اسانس‌های گیاهی و پپتیدهای ضدمیکروبی کمتر توجه شده است. در این تحقیق برای نخستین‌بار اثر هم‌افزایی پپتیدهای نوترکیب درماسپتین B1 با اسانس پونه بررسی شد.

در مطالعه حاضر تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه نشان داد این دو ترکیب باعث مهار رشد شدند. براساس نتایج FIC حضور همزمان هریک از پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه بر رشد باکتری‌های *زانتوموناس پرفورانس*، *زانتوموناس سیتری* و *سودوموناس سرینگه* اثر هم‌افزایی داشت. همچنین باعث کاهش حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی دو ماده شد. به نظر می‌رسد به‌دلیل افزایش نفوذپذیری غشای سلول باکتری در حضور پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه اثر ضدمیکروبی هر دو ترکیب بهبود یافته است. همچنین وقتی چند ماده ضدمیکروبی همزمان بر جمعیت میکروبی بررسی و مطالعه می‌شوند، ممکن است در مقایسه با اثر انفرادی هریک از این ماده‌ها، به‌دلیل وجود تفاوت در عمل یا محل اثر آنها اثر هم‌افزایی داشته باشند. درواقع تکنولوژی ترکیبی می‌تواند به کاهش میزان دز مصرفی آنتی‌بیوتیک‌ها و افزایش اثرات ضدمیکروبی کمک کند. این تحقیق نشان داد پپتیدهای نوترکیب و اسانس پونه اثر هم‌افزایی روی باکتری‌های *زانتوموناس پرفورانس*، *زانتوموناس سیتری*، *زانتوموناس گاردنری* و *سودوموناس پتوار سرینگه* داشتند و استفاده همزمان آنها می‌تواند در جلوگیری از رشد باکتری کمک شایانی به صنعت کشاورزی و درمانی کند؛ البته این امر به تحقیقات گسترده‌تری نیازمند است.

سپاسگزاری

مقاله حاضر طرح پژوهشی درون دانشگاهی است. از همکاری دانشگاه لرستان کمال تشکر را داریم.

References

(1) Almaaytah A, Alnaamneh A, Abualhaijaa A, Alshari N, Al-Balas, Q. In vitro synergistic activities of the hybrid antimicrobial peptide melitap-27 in combination with conventional antibiotics against planktonic and biofilm forming bacteria. *Int. J. Pept. Res. Ther*. 2016; 22: 497–504.

(2) Ashburn T, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. Nat. Rev. *Drug Discov*. 2004; 3: 673–683.

(3) Spellberg B, Bartlett G, Gilbert D. The future of antibiotics and resistance. N. *Engl. J. Med*.

2013; 368: 299–302.

(4) Flooding. *Advice to health care professionals*. London, Health Protection Agency; 2010.

(5) Oerke E. Infection, damage, loss – an assessment of crop losses to pests and their avoidance (in German). *Habilitation thesis, University of Bonn*. 2006: 313.

(6) Vidaver AK. Uses of antimicrobials in plant agriculture. Clin Infect Dis. 2002; 34: S107–S110.

(7) Chisholm S T, Coaker G, Day B, Staskawicz B J. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*. 2006; 124: 803−814.

(8) Davis EL, Hussey RS, Mitchum MG, Baum T. Parasitism proteins in nematode–plant interactions. *Current Opinion in Plant Biology*. 2006; 11: 360–366.

(9) Mirzaei-Najafgholi H, Aeini M, Tarighi S. Golmohammadi M. Comparing bacterial properties in relation to the virulence factors of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains and evaluating resistance of subtribe Citrinae cultivars to the most virulent strain. *Plant Pathology*. 2021; 10: 449-460.

(10) Aeini M, Khodakaramian G, Mirzaei Najafgholi M. Sugar beet leaf culturable endophytic bacterial composition from the major sugar beet growing areas in the west of iran. *Journal of Genetic Resources*. 2018; 4 (2): 105-113.

(11) Arcila-Lozano CC, Loarca-Pina G, Lecona-Uribe S, González De Mejia E. Oregano: Propiedades, composicion y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*. 2000; 54 (1): 100-111.

(12) Proestos CN, Chorianopoulos GJ. Nychas L, Komaitis M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. J. Agric. *Food Chem*. 2005; 53: 1190-1195.

(13) Sadgrove N, Jones G. A Contemporary Introduction to Essential Oils: Chemistry, Bioactivity and Prospects for Australian Agriculture. *Agriculture*. 2015; 5: 48-102.

(14) Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in Biotechnology*. 2011; 29: 464–472.

(15) Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*. 2002; 415: 389–395.

(16) Holaskova E, Galuszka P, Frebort I, Oz MT. Antimicrobial peptide production and plant-based expression systems for medical and agricultural biotechnology. *Biotechnology advances*. 2015; 33 (6): 1005-1023.

(17) Tossi A, Sandri L, Giangaspero A. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2000; 55: 4–30.

(18) Khademi M, Varasteh-Shams M, Nazarian-Firouzabadi F. and Ismaili A. New Recombinant Antimicrobial Peptides Confer Resistance to Fungal Pathogens in Tobacco Plants. *Frontiers in plant science*. 2020; 11: 1236.

(19) Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962; 15 (3): 473-497.

(20) Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 72: 248-254.

(21) Ahmadi A, Mirzaei Najafgholi H, Aeini M, Kakulvand K. Isolation and Identification of Othello, Atlantis, and Puma Super Herbicide-resistant Bacteria Isolated from the Soil of Wheat Farms. *Biological Journal of Microorganism*. 2020; 37: 67-77

(22) Marr AK, Gooderham WJ, Hancock RE. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr.Opin. Pharmacol*. 2006; 6: 468–472.

(23) Arcila L, Piña G, Uribe S, Gonzales E.

Oregano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. (En línea). *Archivo latinoamericano de nutrición*. 2004; 54.

(24) Proestos C, Chorianopoulos N, Nychas GJ, Komaitis M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005; 53: 1190-1195.

(25) Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani, M, Daniele, et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49: 2474-2478.

(26) Aam BB, Heggset EB, Norberg AL, Sørlie M, Vårum KM, Eijsink VG. Production of chitooligosaccharides and their potential applications in medicine. *Marine drugs*. 2010; 8: 1482-1517.

(27) Ferreira RB, Monteiro S, Freitas R, Santos CN, Chen Z, Batista L M, et al. Fungal pathogens: the battle for plant infection. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2006; 25: 505-524.

(28) Mirzaei-Najafgholi H, Tarighi S, Golmohammadi M, Taheri, P. The Effect of Citrus Essential Oils and Their Constituents on Growth of *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. *Molecules*. 2017; 22: 1-14.

(29) Khademi M, Nazarian Firouzabadi F, Ismaili A, Shirzadian Khorramabad R. Targeting microbial pathogens by expression of new recombinant dermaseptin peptides in tobacco. *MicrobiologyOpen*. 2019; 8: e837.

[1]- *Ervinia*
[2]- *Pectobacteriu*
[3]- *Pantoea*
[4]- *Agrobacterium*
[5]- *Pseudomonas*
[6]- *Ralestonia*
[7]- *Burkeldria*
[8]- *Acidorax*
[9]- *Xanthomona*s
[10]- *Claviobacter*
[11]- *Streptomyce*s
[12]- *Xylel*a
[13]- *Spiroplasm*a
[14]- *Phytoplasm*a
[15]- *Xanthomonas citri* subsp. *citr*i
[16]- Mena longifulia
[17]- Lemonine
[18]- gamma caryophylline
[19]- ro-semenin
[20]- linalool
[21]- alpha-pinin
[22]- carvacrol
[23]- thymol
[24]- Xanthomonas translucen
[25]- *Xanthomonas perforans*
[26]- *Xanthomonas citri*
[27]- *Xanthomonas gardneri*
[28]- *Pseudomonas syringae pv.syringae*
[29]- *Citrus Arantium*
[30]- *Citrus Orantifolia*
[31]- α-Terpinol
[32]- *Cladosporium fulvum*
[33]- *Staphylococcus aureus*
[34]- *faecium Enterococcus*
[35]- *Enterococcus faecalis*