

تغییرات در الگوی بیان پروتئین های برگ گیاه لیموترش تحت بیماری جاروک

Changes in Protein Expression Patterns of Lime Leaves Caused by Witches' Broom Disease

فرزان طاهری^{۱*}، قاسم حسینی سالکده^۲

Farzan Taheri^{*1}, Ghasem Hosseini Salekdeh²

۱- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان، ایران

۲- بخش زیست شناسی سیستم ها، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران

1- Department of Plant Breeding and Biotechnology Takestan Branch, Islamic Azad
University, Takestan, Iran.

2- Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran,
Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: F.taheri@tiau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۵)

چکیده

واژه های کلیدی

بیماری جاروک،

الکتروفورز دو بعدی،

طیف سنج جرمی،

فیتوپلاسم،

لیموترش

بیماری "جاروک" که توسط عامل "*Candidatus phytoplasma aurantifolia*" به وجود می آید یکی از بیماری های مهم مرکبات در ایران، غرب آسیا و شمال آفریقا می باشد که سبب ایجاد خسارت اقتصادی زیادی شده است. در این پژوهش اثر تنش بیماری جاروک بر پروتئوم برگ گیاه لیموی رقم مکزیکن مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های برگي از گیاهان جمع آوری شده و با الکتروفورز دوبعدی (2-DE) و سپس طیف سنجی جرمی (MS) مطالعه شدند. توان بالای (2-DE) در تفکیک پروتئین ها این امکان را فراهم می سازد که انواع تغییر کیفی (بودن یا نبودن و یا تغییر مکان) و کمی (افزایش یا کاهش بیان) پروتئین در شرایط تنش و نرمال مطالعه شوند. از میان هشتصدویک پروتئین برگي که با استفاده از نرم افزار ملانی (Melani6) در هشت تکرار زیستی سالم و هشت تکرار زیستی آلوده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند، شصت و سه پروتئین نسبت به بیماری پاسخ نشان دادند که از این تعداد نوزده پروتئین توسط طیف سنج جرمی شناسایی شدند، این پروتئین ها در مقابله با تنش اکسیداتیو، فتوسنتز، متابولیسم و پاسخ به تنش شرکت داشتند که با شناسایی این پروتئین ها می توان مسیرهای پاسخ جدیدتر و ژن هایی که آن ها را کنترل می کنند آشکار کرد و همچنین نتایج این پژوهش می تواند در به نژادی لیموی مکزیکن لایم مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

بیماری "جاروی جادوگر" یکی از بیماری های مهم مرکبات در جنوب کشور می باشد. این بیماری در اواخر دهه ۱۹۷۰ در کشور پادشاهی عمان مشاهده شد. در ایران نیز از سال ۱۳۷۶ پس از ارائه اولین گزارش از استان سیستان و بلوچستان، درختان آلوده زیادی در استان های هرمزگان و کرمان مشاهده شد. علائم این بیماری شامل رنگ پریدگی برگ ها، جارویی شدن سرشاخه های گیاه، توقف رشد، خشکیدگی سرشاخه درخت لیموترش است. ظهور شاخه جارویی در یک قسمت از درخت آغاز می شود و با گسترش بیماری منجر به افزایش تدریجی تعداد شاخه های جارویی در سایر قسمت های درخت می گردد. تولید میوه های کوچک و بدشکل نیز در گیاهان آلوده به فیتوپلازما دیده می شوند. عامل این بیماری، فیتوپلازمای "*Candidatus* *phytoplasma aurantifolia*" می باشد که فاقد دیواره سلولی است (Zreik et al. 1995). زنجره *Hishimonus phycitis* عامل انتشار جاروک لیموترش به درختان سالم می باشد بنابراین به دلیل گستردگی انتشار بیماری و همچنین ماهیت عامل بیماری کنترل بیماری مشکل می باشد (Salehi et al. 2007). یکی از مسائل مجهول در مورد فیتوپلازماها رابطه بین فیتوپلازما با گیاه یا حشره میزبان است. تئوری های مختلفی در مورد چگونگی اثر فیتوپلازما بر فعالیت فیزیولوژیکی گیاه میزبان وجود دارد، مثل تغییر در غلظت هورمون های داخلی گیاه و جذب عناصر غذایی (Daniels, 1983). اما هیچکدام از تئوری ها هنوز به اثبات نرسیده است. جهت کنترل بیماری های فیتوپلاسمائی، از ارقام مقاوم یا متحمل، پایه های عاری از آلودگی، حذف علف های هرز میزبان، کنترل حشرات ناقل، نابود کردن گیاهان آلوده، انتقال ژن های مختل کننده رشد فیتوپلازماها استفاده شده است. استفاده از آنتی بیوتیک هایی مانند تتراسیکلین طبق مشاهدات توصیه شده است ولی اغلب این روش ها، روش توصیه شده و کارآمدی نیستند. یکی از مهمترین دستورالعمل های مقابله با تنش بیماری ایجاد و گسترش ارقام مقاوم به بیماری از طریق برنامه های اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک می باشد. برای ایجاد ارقام مقاوم ابتدا باید عکس العمل گیاهان و واریته های مختلف به بیماری مورد

بررسی و صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی که ماهیت سازگار کننده به شرایط بیماری داشته و در نهایت منجر به تولید عملکرد اقتصادی در چنین شرایطی می شوند مشخص شود. یکی از راهکارهای مهم در این بررسی استفاده از پروتئومیکس است. عرصه های جدید پروتئومیکس با قابلیت ایجاد حجم بسیار زیادی از اطلاعات علمی، در ترکیب با روش های نوین ژنومیکس و بیوانفورماتیک، امکان شناسایی سازوکارها و ژن های دخیل در پاسخ این گیاهان به تنش های زیستی و غیرزیستی را فراهم می کند. در ایران نیز این راهکار بطور عمده در گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (Salekdeh et al. 2002; Hajheidari et al. 2005). در پژوهشی از طریق پروتئومیکس چهارصد و چهل و هشت پروتئین نسبت به بیماری جاروک شناسایی شدند که این پروتئین ها در پاسخ به استرس، متابولیسم، رشد و نمو، فتوسنتز، چرخه سلولی و تشکیل دیواره سلولی نقش داشتند (Monavarfeshani et al. 2012). در پژوهشی که با استفاده از ترانسکریپتوم بر روی توالی رونویسی بیماری جاروک در گیاه لیموترش انجام شد ژن های که دارای بیان متفاوت بودند شناسایی شدند این ژن ها در تعامل گیاه - پاتوژن نقش داشتند (Mardi et al. 2015). از راهکار پروتئومیکس این امکان وجود دارد که بتوان به طور جامع به مطالعه بیان ژن های پاسخ دهنده به تنش پرداخت و مسیر واکنش ها یا ترانسکانسیپام های ملکولی را شناسایی نمود (Dubey and Grover, 2001).

مواد و روش ها

در این پژوهش از درختان لیموی مکزیکن لایم (Mexican lime) یک ساله که در گلخانه پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج پرورش یافته بودند استفاده شد. برای تهیه گیاهان آلوده، نمونه هایی از درختان لیموی مکزیکی آلوده با عامل بیماری فیتوپلاسمایی *Candidatus phytoplasma aurantifolia* به درختان سالم پیوند زده شدند. گیاهان شاهد نیز به درختان سالم پیوند زده شدند. درخت های پیوندی در شرایط نور طبیعی و دمای ۲۵-۲۸ درجه قرار گرفتند. پس از گذشت بیست هفته از زمان پیوند از درختان سالم و آلوده در هشت تکرار نمونه تهیه شد و برای تایید آلودگی

نتایج و بحث

علائم بیماری جاروک شامل رنگ پریدگی سرشاخه ها و کوچک شدن برگها که در شاخه های جارویی گل و میوه تشکیل نمی شود و در نهایت برگها خشک شده و ریزش می کنند که این علائم بعد از گذشت پنج ماه روی درختانی که با عامل بیماری فیتوپلازما تلقیح شده بودند ظاهر شد (شکل ۱). آزمایش عامل بیماری که توسط آزمون nested PCR انجام شده بود تایید شد (شکل ۲). تصویر ژل نشان داد که گیاهان سالم از لحاظ مولکولی، آلودگی به فیتوپلازما را ندارند و هیچ بانندی مشاهده نشد.

تغییر الگوی بیان فیتوپلازماها در پاسخ به بیماری جاروک در لیموی مکزیکن

برای مقایسه الگوی بیان پروتئین ها در نمونه های سالم و آلوده شده به عامل بیماری فیتوپلازمایی از روش الکتروفورز دو بعدی استفاده شد. بعد از تجزیه و تحلیل داده ها مشخص شد که از تعداد هشتصدویک لکه پروتئینی، شصت و سه لکه پروتئینی در پاسخ به بیماری تغییر معنی داری را در سطح پنج درصد ($P < 0.05$) نشان دادند.



شکل ۱- آلودگی به بیماری فیتوپلازمایی جاروک

Fig 1. Infection by the phytoplasma causing witches' broom disease

در گیاهان آلوده، آزمایش تایید آلودگی با PCR به وسیله آغازگرهای عمومی P1, P7 فیتوپلازما جهت تکثیر 16s-RNA و قسمتی از 23s-RNA انجام شد. قطعه 1250 bp به روش Nested-PCR تکثیر شده و روی ژل آگارز یک درصد مشاهده شد.

استخراج پروتئین

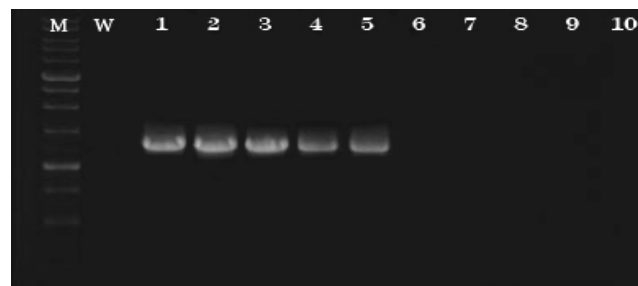
استخراج پروتئین از نمونه ها بر اساس روش سرحدی و همکاران با اندکی تغییر انجام شد (Sarhadi et al. 2010). سپس تعیین غلظت پروتئین ها با استفاده از روش برادفورد و با بهره گیری از دستگاه اسپکتروفتومتری (Carry 300) در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد. ژل ها به مدت دوازده تا شانزده ساعت با آبدهی در سینی های مخصوص آبدهی شدند. در بعد اول پروتئین ها در ژل های IPG (biorad) بیست و چهار سانتیمتری با PH چهار تا هفت جداسازی شدند سپس در مرحله بعد دوم به دستگاه SDS-PAGE انتقال یافتند تا پروتئین ها بر اساس جرم مولکولی در ژل آکریل آمید با غلظت سیزده درصد جدا شوند. پس از اتمام بعد دوم ژل ها در محلول تثبیت کننده (Methanol 40%; acetic acid) 10% قرار داده شدند. رنگ آمیزی برای ژل ها با استفاده از روش رنگ آمیزی نیرات نقره انجام گرفت (Blum et al. 1981). برای ژل های آماده سازی به روش رنگ آمیزی کوماسی بلو استفاده شد (Neuhoff et al. 1988). ژل های رنگ آمیزی شده بلافاصله پس از رنگ آمیزی با قدرت تفکیک ششصد دی پی آی با استفاده از دنسیتومتر تصویربرداری و تصویر دریافتی برای تجزیه و تحلیل نرم افزاری ژل ها مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل نقاط توسط نرم افزار ملانی شس انجام شد. در هر بافت و مرحله حدود هشتصدویک نقطه تکرارپذیر شناسایی و برجسته زده شد و درصد حجمی نقاط (VOL%) به عنوان میزان پروتئین تظاهر یافته در نظر گرفته شد. برای مقایسه فراوانی نسبی لکه های پروتئینی میان گیاهان سالم و آلوده، از آزمون ANOVA یک طرفه در نرم افزار MSTATC استفاده شد و بعد از تجزیه آماری، نقاطی که در سطح پنج درصد معنی دار بودند و Induction Factor (IF) آنها زیر ۰/۶۷ و یا بالای ۱/۵ بود. برای تجزیه و تحلیل اسپکترومتری جرمی انتخاب شدند. شناسایی نقاط با دستگاه اسپکترومتری جرمی MALDI-TOF/TOF-MS انجام شد.

پروتئینهای مربوط به تنش اکسیداتیو در پاسخ به بیماری

بیشتر تنشهای محیطی زیستی زنده و غیرزنده، با افزایش گونههای فعال اکسیژن (ROS) در درون سلول و بروز واکنشهای اکسیداتیو باعث اثر سوء بر سلول و سوخت و ساز سلولی می شوند. گیاهان جهت مقابله با تنش اکسیداتیو و کاهش اثر مخرب گونههای فعال اکسیژن (ROS) از سازوکارهای مختلف آنزیمی و غیر آنزیمی استفاده می کنند. تاکنون بیش از یکصدوپنجاه ژن مختلف حذف کننده یا تولید کننده گونههای فعال اکسیژن در گیاهان شناسایی شده اند، به طوریکه برای هرگونه فعال اکسیژن خاص، وجود چندین سیستم آنزیمی حذف کننده مشخص شده است. به عنوان مثال، سیتوسول حداقل دارای سه آنزیم به نامهای آسکوربات پراکسیداز، گلوکاتایون پراکسیداز و پراکسی ردوکسین برای حذف H_2O_2 می باشد (Sze et al, 1992). گونههای فعال اکسیژن بسیار فعال و سمی هستند و می توانند با آسیب رساندن به DNA، پروتئین ها، لیپیدها و کربوهیدرات ها منجر به مرگ سلولی شوند (Mittler, 2002). تنظیم افزایشی آنزیم های گونههای فعال اکسیژن، طی عفونت سوختگی برگ در گیاهان برنج مقاوم گزارش شد (Kottapalli et al. 2007) و همچنین پاسخ خیار به *Pseudoperonospora cubensis* گزارش شده است (Li et al. 2011). در پژوهش حاضر مشاهده شد که پروتئین پراکسیداز دو (لکه ۳۵۸) به دنبال بیماری فیتوپلاسمائی افزایش بیان نشان داد. احتمال دارد که افزایش بیان این پروتئین در درختان لیموی مکزیکی در پاسخ به پاتوژن *Candidatus phytoplasma aurantifolia* در تجمع گونههای فعال اکسیژن دخالت کند که به نوبه خود یک پاسخ بیش حساسیت را در گیاه سبب می شود.

تنظیم کاهشی پروتئین های فتوستزی

بررسی پروتئوم شواهدی را در رابطه با کاهش بیان پروتئین های فتوستزی از جمله Oxygen-evolving (لکه ۱۹۶)، Ribulose biphosphate carboxylase (لکه ۳۰۸) ارائه کرد. این نتایج با گزارش های قبلی مبنی بر اینکه تنش های محیطی، بیان ژن های رمزگذار پروتئین های فتوستز را مهار می کنند تطابق دارد (Seki et al. 2002; Wu et al. 2010).

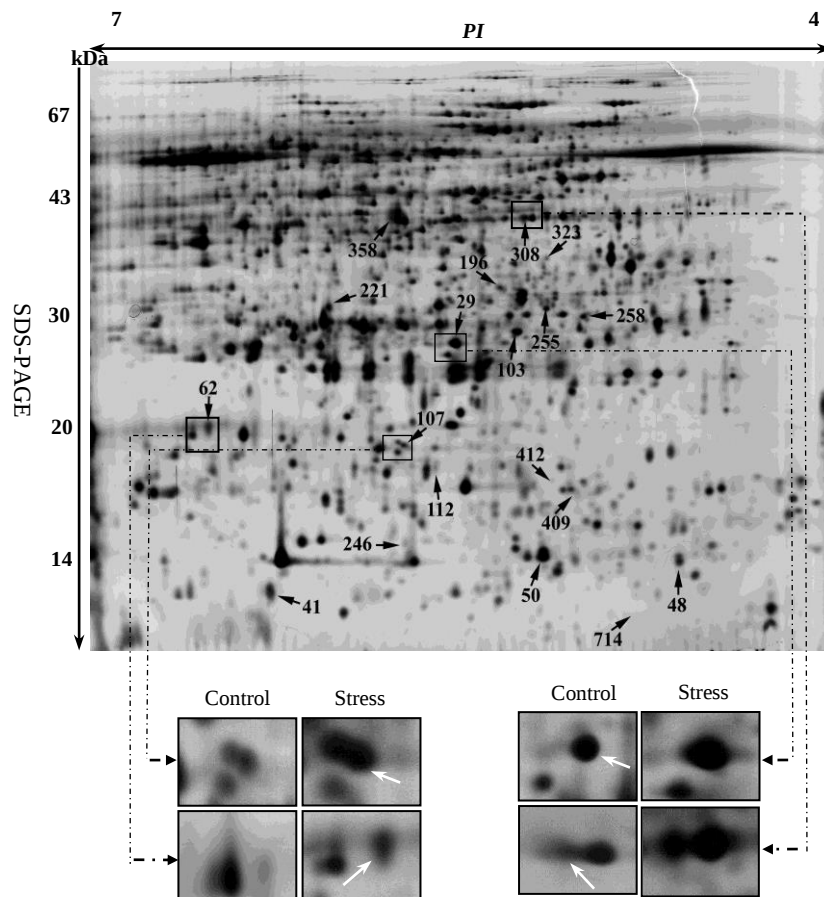


شکل ۲- نتایج الکتروفورز فرآورده های nested - PCR که با استفاده از آغازگرهای عمومی P1 و P7 که منجر به تکثیر قطعه ۱۲۵۰ جفت بازی در گیاهانی که علائم بیماری جاروک را نشان می دادند شد. که بر روی ژل آگاروز یک درصد از چپ به راست، چاهک اول M اندازه نشانگر DNA به طول ۱۲۵۰ bp، چاهک W آب، چاهک ۱-۵ نمونه های لیموترش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش، چاهک ۶-۱ نمونه های سالم لیموترش.

Fig 2. The results from the electrophoresis of nested-PCR products using P7 and P1 primers produced 1250 base pairs which showed signs of witches' broom disease. on 1% agarose gel from left to right, the first ladder indicated 1 kb DNA size marker, W contained water, ladder 1-5 showed Mexican lime samples affected by *phytoplasma aurantifolia* of witches broom, and ladder 1-6 showed healthy samples of Mexican lime.

از این تعداد سی و شش پروتئین در برابر با عامل بیماری افزایش بیان و تعداد بیست و هفت پروتئین نیز کاهش بیان نشان دادند. شناسایی پروتئین ها با بیان متفاوت با استفاده از روش اسپکترومتری جرمی منجر به شناسایی نوزده لکه پروتئینی شد (جدول ۱).

از این تعداد یازده پروتئین افزایش بیان داشتند و هشت پروتئین کاهش بیان داشتند (شکل ۳). چهار پروتئین با بیان افزایشی (1) Miraculin like protein بودند (لکه های ۲۹، ۴۱، ۶۲ و ۲۲۱). سایر پروتئین ها با بیان افزایشی یک Copper chaperon (لکه ۵۰)، پروتئین مربوط به بیماریزایی Pathogenesis-related protein 10.6 (لکه ۱۰۷)، پروتئین Peroxidase (لکه ۳۵۸)، calmodulin، putative (لکه ۷۱۴)، پروتئین predicted (لکه ۲۵۸)، پروتئین KINID (لکه ۴۸) و پروتئین 6-phosphogluconal actorase (لکه ۲۵۵) است. پروتئین های که کاهش بیان داشتند دو پروتئین شوک حرارتی HSP (لکه های ۱۱۲ و ۴۱۲)، Oxygen-evolving (لکه های ۱۹۶). سایر پروتئین های که دارای کاهش بیان بودند عبارت بودند از Triose phosphate isomerase putative (لکه ۱۰۳)، Ribulose Acetyl glutamate kinase (لکه ۲۴۶)، (لکه ۳۰۸) و Thylakoid (لکه ۴۰۹).



شکل ۳- تصویر ژل دو بعدی برگ درخت لیموترش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک و نمونه‌هایی از تغییر بیان نقاط پروتئینی در برگ گیاه سالم و آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش

Fig 3. Image of 2DE gel of mexican lime tree infected by *phytoplasma aurantifolia* and changes in protein expression in healthy and infected plants.

فتوستز ممکن است دستگاه فتوستزی گیاه را در برابر تنش اکسیداتیو محافظت کند (Somssich and Hahlbrock, 1998). در پژوهش‌های قبلی مشاهده کردیم آلودگی، بیان چهارده پروتئین درگیر در فتوستز را کاهش می‌دهد. تغییر در سطوح پروتئین‌های فتوستزی همچنین از طریق تجزیه پروتئومی پاسخ به آلودگی فیتوپلاسمای در توت و لیمو مشاهده شده است (Monavarfeshani et al. 2012).

پروتئین‌های مرتبط با پاتوژن (PR)

یکی از پروتئین‌های بیش تنظیم شده (لکه ۱۰۷)، پروتئین مربوط به بیماری‌زایی PR-10 بود. القاء این پروتئین با گزارشی از بیان ژن PR-5 در تاک و *chrysanthemum carinatum* در پاسخ به عفونت فیتوپلاسمای مطابقت دارد (Margaria and Palmano, 2011; Zhong et al. 2004).

بیان متفاوت و تجزیه پروتئین‌های فتوستزی طی بررسی پروتئوم پاسخ توت به فیتوپلاسمای نیز گزارش شده است. همچنین در یک پژوهش مشخص شد که برای شروع تنفس و سایر فرآیندهایی که برای مقابله گیاه با پاتوژن ضروری هستند، باید کاهش فتوستز صورت گیرد (Scharte et al. 2005). بسیاری از پژوهش‌ها پیشنهاد می‌کنند که نرخ فتوستز به طور نسبی بعد از تیمار با پاتوژن بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا، بعد از حمله گیاه‌خواران، ایجاد زخم یا بعد از تیمار با هورمون کاهش می‌یابد (Bolton, 2009). کاهش فتوستز ممکن است یا به دلیل تولید ترکیب‌های وابسته به دفاع باشد یا رشد پاتوژن نرخ فتوستز را کاهش دهد که این کاهش تا پایان رشد پاتوژن ادامه خواهد داشت (Monavarfeshani et al. 2012). به علاوه برای آزاد شدن منابعی که می‌تواند برای پاسخ‌های دفاعی استفاده شود، کاهش در نرخ

جدول ۱- پروتئین های دارای بیان متفاوت در پاسخ به بیماری جاروک در گیاه لیموترش مکزیکن، که توسط اسپکترومتری جرمی MALDI- TOF/TOF-MS شناسایی شدند.

Table 1. Proteins showing differential expression in response to witches' broom disease in Mexican lime observed by MALDI- TOF/TOF-MS mass spectrometry

Spot ¹	exp. PI/MW ²	theo. PI/MW ³	gi No ⁴	protein name ⁵	Score/Coverage ⁶	(PMF)/MS-MS ⁷	Induction factor (IF) ⁸
29	5.6/33	9.3/25	gi/87299375	Miraculin like protein (1)	136/21	4/2	1.85
41	6.21/14	5.5/24	gi/87299377	Miraculin like protein (2)	200/15	2/2	2.35
48	4.72/15	6/13	gi 183396761	KINID1a [Physcomitrella patens subsp. Patens]	67/13	2/2	2.58
50	5.2/16	7/94	gi/119367485	Copper chaperon	103/56	5/2	1.61
62	6.4/24	9.5/24	gi/119367468	Miraculin like protein (2)	228/25	5/3	3.85
103	5.3/30	6.4/33	gi/255635100	Triose phosphate isomerase putative	462/22	7/6	-1.54
107	5.2/15	5.6/17	gi/116643152	Pathogenesis-related protein 10.6	88/15	2/1	1.66
112	5.57/21	9/11	gi 30575570	Heat shock protein	73/15	2/2	-6.36
160	5.4/28	9.3/68	gi 38346645	Hypothetical protein	73/23	2/2	-3.4
196	5.4/34	4.5/18	gi/217071716	Oxygen-evolving enhancer protein1	119/32	3/2	-1.53
221	5.9/34	9.3/25	gi 87299375	Miraculin-like protein 1 [Citrus jambhiri]	104/13	4/2	6.00
246	5.8/17	9.1/15	gi/15234360	Acetyl glutamate kinase regulator	89/23	3/2	-2.41
255	5.2/32	4.9/29	gi/110430677	6-phosphogluconal actorase	122/7	2/2	1.58
258	5.08/23	7.6/33	gi 222849615	predicted protein	81/13	2/2	1.83
308	5.3/42	8.9/20	gi 585787	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	66/49	2/1	-2
358	5.7/43	9.6/38	gi 129809	Peroxidase C2	131/9	5/3	2.73
409	5.1/18	9.3/25	gi 223534416	Thylakoid lumenal protein, chloroplast precursor	76/12	4/2	-2.53
412	5.27/19	9/11	gi 30575570	Heat shock protein	75/15	3/1	-2.6
714	4.8/14	4.6/17	gi 223549501	calmodulin, putative	115/46	7/3	3.24

۱- شماره لکه پروتئینی، ۲- وزن مولکولی تجربی، ۳- وزن مولکولی نظری، ۴- شماره دسترسی در داده پایگاه های MASCOT NCBI، ۵- نام پروتئین، ۶- نمرة ما سکوت/پوشش ۱- درصد توالی، ۷- تعداد پپتیدهای شناسائی شده توسط MALDI- TOF/TOF-MS، ۸- عامل القاء (درصد حجم لکه در گیاهان آلوده، تقسیم بر درصد حجم لکه متناظر در گیاهان سالم).

1- Protein stain number, 2- observed molecular weight, 3- theoretical molecular weight, 4- Access number in data bases NCBI MASCOT, 5- protein name, 6- MASCOT score, 7- the number of peptides identified by MALDI- TOF/TOF-MS, 8- the percentage of stain volume in infected plants divided by the percentage of stain volume in healthy plants

فعالیت ریبونوکلازی در آزمایشگاه و آنزیمی در سوخت و ساز ثانویه گیاه به آن نسبت داده شده است که این عملکردها حاکی از شرکت PR-10 در مقابله گیاه با حمله پاتوژن دارد (Liu and Ekramoddoullah, 2006)

الگوی بیان پروتئینهای شبه میراکولین

در پژوهش حاضر چهار پروتئین Miraculin like protein (لکه ۲۹، ۴۱، ۶۲ و ۲۱) شناسایی شدند که در پاسخ به بیماری افزایش بیان نشان دادند. این پروتئین ها به شدت گلیکوزیله هستند و به خانواده مهارکننده های پروتئازی تعلق دارند. عملکرد این پروتئین ها در پاسخ به تنش هنوز به طور کامل آشکار نشده است

تنظیم افزایشی بیان ژن PR-10 پس از عفونت با پاتوژن ها در انواع گسترده ای از گونه های گیاهی نشان داده شده است، از جمله در عفونت *Capsicum annum* (Park et al. 2004)، *Cronartium ribicola* در *Pinus monticola* (Liu and Ekramoddoullah, 2006)، *Pseudomonas syringae* در *Vitis vinifera* (Robert et al. 2001)، *Magnaporthe grisea* و *Acidovorax avenae* در برنج مشاهده شده است (McGee et al. 2001). خانواده PR-10 یکی از مهم ترین گروه ها در بین ۱۷ گروه پروتئین های PR است (Yan et al. 2008). برخلاف اکثر پروتئین های PR که مقصد برون سلولی دارند، PR-10 درون سلولی است و عملکردهای مختلفی از جمله فعالیت ضد میکروبی،

در گیاهان آلوده به بیماری جاروک نسبت به گیاهان سالم دیده شد این پروتئین نقش تولید انرژی را دارد و متعلق به گروه بزرگی از نوکلئوزید تری فسفاتازها هستند (Hiwatashi et al. 2008).

نتایج این پژوهش شواهدی را ارائه کردند مبنی بر اینکه فیتوپلازما باعث تغییر در سطوح چندین پروتئین می شود و به این ترتیب بر درک ما از پاسخ درخت لیموی مکزیکی به عفونت فیتوپلازما افزود.

این پژوهش انجام شده، می تواند درک ما را از پاسخ گیاه به پاتوژن افزایش دهد، از جمله:

(۱) استفاده از طیف سنجی جرمی برای شناسایی نوزده پروتئین از مجموعه شصت و سه پروتئینی که بیان متفاوتی در این پژوهش داشتند. شناسایی این پروتئین ها می تواند مسیرهای پاسخ جدیدتر و ژن هایی که آن ها را کنترل می کنند آشکار کند.

(۲) با مقایسه گیاهان آلوده و سالم، چندین پروتئین و مسیر به عنوان شرکت کننده های اصلی در پاسخ به این بیماری پدیدار شدند. نشان داده شده است که این پروتئین ها در فرآیندهای متفاوتی از جمله پاسخ به تنش اکسیداتیو و فتوسنتز دخالت می کنند. به علاوه، پروتئین های Miraculin like زیادی به شکلی متفاوت بیان شدند که احتمال دارد در دفاع گیاه علیه پاتوژن ها شرکت داشته باشند. این نتایج می تواند چارچوبی را برای طرح پرسش ها و آزمون های جدید به منظور آشکار کردن زیست شناسی رابطه گیاه-فیتوپلازما ارائه کند. این نتایج می توانند بنیانی برای شناسایی ژن هایی فراهم کنند که بتوان آن ها را برای افزایش مقاومت گیاه یا سرکوب رشد و تولید پاتوژن مورد هدف قرار داد. با این حال، برای آشکار کردن شرکت این ژن ها در حساسیت یا مقاومت درختان لیموی مکزیکی به "Candidatus phytoplasma aurantifolia" آزمایش های بیشتری باید انجام گیرد. علاوه بر این، می توان راهبردهایی ایجاد کرد که این ژن ها در برنامه های به نژادی مولکولی شرکت کنند.

(۳) درک این موضوع که آیا پروتئین های تنظیم شونده اثر مستقیم تعامل با فیتوپلازما و یا یک اثر ثانویه ناشی از ایجاد علائم را بازتاب می کنند حائز اهمیت است. درک اینکه آیا تغییر پروتئین

(Tsukuda et al. 2006). با این وجود، افزایش بیان این پروتئین ها در رابطه با پاتوژن-گیاه گزارش شده است، از جمله می توان به این روابط که به دلیل قارچ یا درمان با متیل جاسمونات که توسط (Tsukuda et al. 2006). و همچنین (Mozoruk et al. 2006) افزایش بیان این پروتئین را در برگ های *Citrus sinensis* که مورد هجوم زنجره *Homalodisca oagulate* قرار گرفته بود را گزارش دادند. در مقابل، کاهش بیان میراکولین ها در گیاهان لیمویی که مبتلا به مرگ ناگهانی لیمو می شوند دیده شده است (Cantu et al. 2008). پروتئین Miraculin like protein 2 حاوی یک موتیف توماتین است و فعالیت ضد قارچی در مقابل *Altemaria citri* دارد همچنین در این گزارش عنوان کردند که این پروتئین ها احتمال دارد دارای عملکرد دفاعی در مقابل پاتوژن ها باشند، حداقل آن زمان که سلول های میزبان مورد هجوم قرار می گیرند (Tsukuda et al. 2006). به علاوه، این پروتئین ها می بایست به فضاهای برون سلولی صادر شوند و اولین خط دفاعی در مقابل حمله پاتوژن باشند. پاسخ های مختلف به ایزوفرم های گوناگون پروتئین های Miraculin نشان می دهد که یک شبکه تنظیمی پیچیده، الگوی بیان آن ها را تغییر می دهد. تنظیم افزایشی این چهار پروتئین در مطالعه فعلی می تواند دیدگاهی را در مورد مکانیسم دفاعی درخت لیموی مکزیکی در مقابل پاتوژن «*Candidatus phytoplasma aurantifolia*» ارائه کند (Tsukuda et al. 2006).

ترجمه و سرنوشت پروتئین

پروتئین های با بیان متفاوت زیادی در ترجمه و سرنوشت پروتئین دخالت دارند، از جمله پروتئین Copper chaperon (لکه ۵۰) که دارای افزایش بیان بوده و دو پروتئین شوک حرارتی HSP (لکه های ۱۱۲ و ۱۲۷) کاهش بیان داشتند. کاهش بیان پروتئین های شوک حرارتی که برای حفظ ساختار و عملکرد پروتئین های آسیب دیده انجام می گیرد، بازتابی از یک پاسخ تطابقی در گیاهان برای برداشت پروتئین های بد تاخوردده است که به دلیل عفونت فیتوپلازما تجمع می یابند (Polesani et al. 2008) که فراوانی این پروتئین ها در پاسخ به آلودگی به فیتوپلازما کاهش می یابد (Monavarfeshani et al. 2012). افزایش بیان پروتئین KINID1

مشاهده شده در پاسخ به پاتوژن ها، بازتابی از تغییر در بیان ژن هستند یا تغییر پس از ترجمه نیز جالب توجه است. درک نقش این پروتئین های تنظیم شونده مستلزم پژوهش های بیشتر است.

منابع

- Blum H, Beier H, Gross HJ. 1987.** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*. 8:93-99.
- Bolton MD. 2009.** Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 22: 487-497.
- Cantu M, Mariano A, Palma M, Carrilho E, Wulff N. 2008.** Proteomic Analysis Reveals Suppression of Bark Chitinases and Proteinase Inhibitors in Citrus Plants Affected by the Citrus Sudden Death Disease. *Phytopathology*. 98: 1084-1092.
- Daniels MJ. 1983.** Mechanisms of Spiroplasma pathogenesis. *Ann. Rev. Phytopathol*. 21: 29-43.
- Dubey H, Grover A. 2001.** Current initiatives in proteomics research. *The plant perspective. Current Sci*. 802:262-269.
- Hajheidari M, HosseiniSalekdeh GH, Heidari M, Abdollahian Noghabi M, Sadeghian SY. 2005.** Proteome Analysis of Sugar Beet Leaves under Drought Stress. *Proteomics*. 5: 950-960.
- Hiwatashi Y, Obara M, Sato Y, Fujita T, Murata T, Hasebe M. 2008.** Kinesins Are Indispensable for Interdigitation of Phragmoplast Microtubules in the Moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell*. 20: 3094-3106.
- Kottapalli KR, Rakwal R, Satoh K, Shibato J, Kottapalli P, Iwahashi H, Kikuchi S. 2007.** Transcriptional profiling of indica rice cultivar IET 8585 (Ajaya) infected with bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae pv oryzae*. *Plant Physiol. Biochem*. 45: 834-850.
- Li JW, Liu J, Zhang H, Xie CH. 2011.** Identification and transcriptional profiling of differentially expressed. *Plant Cell Rep*. 30: 345-357.
- Liu JJ, Ekramoddoullah AKM. 2006.** The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol. Mol. Plant Pathol*. 68:3-13.
- Mardi M, Karimifarsad L, Gharechahi j, HosseiniSalekdeh GH. 2015.** In-Depth Transcriptome Sequencing of Mexican Lime Trees Infected with *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* journal PLoS ONE. PLoS ONE10: e0130425
- Margarita P, Palmano S. 2011.** Response of the *Vitis vinifera* L. cv. 'Nebbiolo' proteome to Flavesence dorée phytoplasma infection. *Proteomics*. 11: 212-224.
- McGee JD, Hamer JE, Hodges TK. 2001.** Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 14: 877-886.
- Mittler R. 2002.** Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. *Trends Plant Sci*. 7: 405-410.
- Monavarfeshani A, Mirzaei M, Sarhadi E, Amirkhani A, Khayam Nekouei M, Haynes P, Mardi M, HosseiniSalekdeh GH. 2012.** Shotgun Proteomic Analysis of the Mexican Lime Tree Infected with "*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*". *J. Proteome Res*. 12:785-795.
- Mozoruk J, Hunnicutt LE, Cave RD, Hunter WB, Bausher M. 2006.** Profiling transcriptional changes in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck challenged by herbivory from the xylem-feeding leafhopper *Homalodisca oagulate* (Say) by cDNA macroarray analysis. *Plant Sci*. 170: 1068-1080.
- Neuhoff V, Arnold N, Taube D, Ehrhardt W. 1988.** Sample complexity reduction for two-dimensional electrophoresis using solution isoelectric focusing prefractionation. *Electrophoresis*. 9: 255-262.
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, Park JM, Shin YC, Paek KH. 2004.** Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway *Plant J*. 37: 186-198.
- Polesani M, Desario F, Ferrarini A, Zamboni A, Pezzotti M, Kortekamp A, Polverari A. 2008.** cDNA-AFLP analysis of plant and pathogen genes expressed in grapevine infected with *Plasmopara viticola*. *BMC Genomics*. 9, 142.
- Robert N, Ferran J, Breda C, Coutos-Thevenot P, Boulay M, Buffard D, Esnault R. 2001.** Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae pv. pisi*: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *Eur. J. Plant Pathol*. 107: 249-261.
- Salehi M, Izadpanah K, Siampour M, Bagheri A, Faghihi SM. 2007.** Transmission of *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* to Bakraee (*Citrus reticulata* Hybrid) by Feral *Hishimonus phycitis* leafhoppers in Iran. *Plant Dis*. 91, 466.
- Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J. 2002.** A proteomics approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crop Research* 76:199-219.

- Sarhadi E, Mahfoozi S, Hosseini SA, Salekdeh GH .2010.** Cold Acclimation Proteome Analysis Reveals Close Link between the Up-Regulation of Low Temperature Associated Proteins and Vernalization Fulfillment J. Proteome Res.9: 5658–5667.
- Scharte J, Schon H, Weis E .2005.** Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *phytophthora nicotianae*. Plant, Cell Environ.28: 1421-1435.
- Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono.Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T .2002.** Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray.Plant J. 31:279-292.
- Somssich IE, Hahlbrock K .1998.** Pathogen defence in plants—a paradigm of biological complexity. Trends Plant Sci. 3: 86–90.
- Sze H, Ward JM, Lai S .1992.** Vacuolar H⁺-translocating ATPase from plants: Structure, function and isoforms. J. Bioenerg. Biomembr. 24: 371-81.
- Tsukuda S, Gomi K, Yamamoto H, Akimitsu K .2006.** Characterization of cDNAs encoding two distinct miraculin-like proteins and stress-related modulation of the corresponding mRNAs in *Citrus jambhiri* lush. Plant Mol. Biol.60: 125–136.
- Wu J, Zhang Y, Zhang H, Huang H, Folta KM, Lu J .2010.** Whole genome wide expression profiles of *Vitis amurensis* grape responding to downy mildew by using Solexa sequencing technology.BMC Plant Biol. 10, 234.
- Yan Q, Qi X, Jiang Z, Yang S, Han L .2008.** Characterization of a pathogenesis-related class 10 protein (PR-10) from *Astragalus mongholicus* with ribonuclease activity. Plant Physiol. Biochem. 46: 93-99.
- Zhong BX, Shen YW .2004.** Accumulation of pathogenesis-related type-5 like proteins in phytoplasma-infected garland chrysanthemum *chrysanthemum carinatum*. Acta Biochim. Biophys. Sin. 36: 773-779.
- Zreik L, Carle P, Bové JM, Garnier M .1995.** Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, "*Candidatus phytoplasma aurantifolia*". Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, "*Candidatus phytoplasma aurantifolia*". Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 449- 453.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

**Changes in Protein Expression Patterns of Lime Leaves Caused by Witches'
Broom Disease**

Farzan Taheri*¹, Ghasem Hosseini Salekdeh²

1- Department of Plant Breeding and Biotechnology, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran

2- Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

Corresponding Author Email: F.taheri@tiau.ac.ir

Abstract

"Witches' broom" Disease caused by the "*Candidatus phytoplasma aurantifolia*" is one of the important citrus disease that causes significant economic losses in Iran, western Asia and North Africa. In this study the effect of disease stress on leaf proteome was investigated. Leaf samples were collected from plants and were analyzed using 2-DE coupled with MS. The power of 2DE for proteins separation makes it possible to study various qualitative and quantitative changes in protein expression under normal and stress condition. out of 801 leaf proteins from eight biological replicates of healthy and infected plants that were analyzed by melani6 software, 63 proteins showed a significant response to the disease. MS results indicated that 19 proteins were involved in oxidative stress defense photosynthesis, metabolism and the stress response. Identifying these proteins can reveal newer response pathways and the genes that control them. The results of this study can be used in mexican lime breeding programs.

Key words: Witches' Brooms, 2DE, Mass Spectrometry, Phytoplasma, Mexican lime