مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره چهارم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه ۱۲۳-۱۱۳

تجزیه و تحلیل پروتئوم عصاره پروتئینی باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* با خاصیت محرکی بر روی گیاه آرابیدوپسیس

Proteome analysis of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* protein extract with elicitor activity on *Arabidopsis thaliana*

وحید فلاح زاده ممقانی

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

Assistant Professor of Plant protection department, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fallahzadeh@azaruniv.edu

(تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۸ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۱۷)

چکیده

در حال حاضر پژوهش های وسیعی در موسسات پژوهشی در دنیا در حال انجام است که هدف آنها یافتن محرکهایی (الیسیتورهای) جدید از میکروارگانیسم‌ها و گیرنده‌های آنها از گیاهان می‌باشد. شناخت کامل این محرکها و گیرنده‌های مربوط به آنها، امکان استفاده از آنها جهت ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به بیمارگرهای گیاهی را امکان پذیر می‌سازد. با توجه به اینکه تولید اتیلن گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیانا در واکنش به تیمار محرکهای میکروبی به شدت افزایش می‌یابد، در این مطالعه از آزمون سنجش اتیلن برای خالص سازی و بررسی پروتئین‌هایی با خاصیت محرک از باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcc*) استفاده شد. برای این منظور عصاره پروتئینی این باکتری تهیه و خالص سازی شد و سپس نمونه خالص شده که در آزمون سنجش اتیلن خاصیت محرکی داشت، با استفاده از طیف سنجی جرمی متوالی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. حدود ۶۰ پروتئین مختلف در نمونه مورد بررسی شناسایی شد که از بین موارد شناسایی شده تنها سه مورد از نظر جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک مشابه محرک مشاهده شده در عصاره پروتئینی باکتری *Xcc* بودند. این پروتئین‌ها عبارتند از cspA (پروتئین شوک سرمایی A)، csrA (پروتئین تنظیم‌گر ذخیره کربن) و یک پروتئین ناشناخته فرضی محافظت شده که از خانواده پروتئینی DUF1456 می‌باشد. با بررسی‌هایی که در نرم افزارهای SOSUI وPSORTB صورت گرفت مشخص شد که این پروتئین ناشناخته فرضی قابل حل در آب بوده و هیچگونه توالی مرتبط با غشاءهای باکتری را ندارد و بنابراین به احتمال زیاد جزء پروتئین‌های سیتوپلاسمی محسوب می‌شود.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس
محرک
اتیلن
پروتئین
زانتوموناس سیتری

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

مقدمه

در سالهای اخیر تشخیص الگو (Pattern recognition) به عنوان فرآیندی اساسی در پاسخ ایمنی گیاهان و جانوران شناخته شده است. گیاهان و جانوران دارای گیرنده‌های تشخیص الگویی (Pattern recognition receptors- PRRs) هستند که آنها را قادر می‌سازد که الگوهای مولکولی (یا محرکها) از تمام رده‌های میکروبی را ادراک کنند (مثل کیتین در مورد قارچ‌ها و یا پپتیدوگلیکان در مورد باکتریها). از آنجایی که این ترکیبات در خود میزبان وجود ندارند، به شناسایی غیر خودی آنها کمک می‌کند. اگرچه الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگر (Pathogen-associated molecular patterns-PAMPs)، به صورت قراردادی به این نام خوانده می‌شوند، اما الگوهای مختلفی از میکروارگانیسم‌های مختلف اعم از بیمارگر یا غیر بیمارگر توسط گیرنده‌های شناساگر پروتئینی (Pattern recognition receptors-PRRs) ادراک می‌شوند. بنابراین، در منابع گذشته (Mackey and Ludwig *et al.* 2005; McFall, 2006) ترجیح داده شده است که به عنوان الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب (MAMPها-Microbe-associated molecular patterns) توصیف شوند. محرکهای مشابهی ممکن است از خود گیاه نیز ایجاد شود که در اثر آسیب ایجاد شده توسط میکروبها حاصل می‌شود. این محرکها نیز به عنوان الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب (Damage-associated molecular patterns-DAMPs) توصیف شده‌اند (Lotze *et al.* 2007). ادراک محرکها چه از نوع MAMP و یا از نوع DAMP توسط PRRها پاسخ‌های دفاعی فعالی را شروع می‌کنند که در گیاهان، ایمنی پایه (basal immunity) و در جانوران، ایمنی ذاتی (innate immunity) نامیده می‌شوند، که بیمارگرهای ناسازگار را بازداری می‌کنند (Boller and Felix, 2009). از جمله مهمترین محرکها و گیرنده‌های آنها که تا به حال شناخته شده‌اند عبارتند از: ناحیه flg22 از تاژک باکتریها که گیرنده آن در گوجه فرنگی و آرابیدوپسیس FLS2 شناخته شد است، فاکتور ترجمه EF-Tu از باکتریها که گیرنده آن در اعضای تیره کلم ، EFR شناسایی شد، گیرنده گلوکان بیمارگر *Phytophthora megasperma* در سویا، زایلاناز قارچ *Trichoderma viride* که گیرنده آن در آرابیدوپسیس EIX شناخته شد و گیرنده کیتین در برنج که CERK1 نامیده شده شده است. علاوه بر این تعداد زیادی از MAMPها از بیمارگرهای مختلف شناسایی شده‌اند که عملکرد آنها، گیرنده‌ها و برهمکنش مولکولی آنها به طور دقیق مطالعه نشده است (Boller and Felix, 2009).

شناسایی محرکها چندین فرآیند پاسخ سلولی از قبیل تغییر جریان یونی بین غشای سلولی (که باعث قلیایی شدن فضای بین سلولی می‌شود)، افزایش غلظت یون کلسیم سیتوپلاسمی (Boller and Felix, 2009)، القا کینازهای پروتئینی فعال شونده از طریق میتوژن (Mitogen-activated protein kinase–MAPK) که باعث فعال شدن فاکتورهای نسخه‌برداری می‌شوند (Asai *et al.*, 2002) و بیوسنتز هورمون استرس اتیلن (که از طریق فعال شدن ACC-synthase صورت می‌گیرد) را القا می‌کنند (Felix *et al.*, 1999). وقوع هر کدام از این پدیده‌ها به عنوان مارکر شناسایی محرکها می‌باشد که با تکنیکها مختلف اندازه گیری می‌شوند.

شانکر باکتریایی مرکبات، یکی از خطرناکترین بیماریهای مرکبات بوده و همه انواع مرکبات را آلوده می‌کند. باکتریهای ایجاد کننده این بیماری سه گونه متمایز از جنس *Xanthomonas* می‌باشند. مخربترین و شایعترین فرم عامل بیماری، فرم A (شانکر آسیایی) ناشی از باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* می‌باشد. خسارت بیماری شامل کاهش کمیت و کیفیت محصول و ریزش میوه‌های نارس است (Agrios, 2005). به رغم اعمال اقدامات بهداشتی و رعایت مقررات قرنطینه‌ای و ریشه کنی درختان بیمار در بعضی از کشورها، گستره شیوع این بیماری در جهان رو به افزایش است. در ایران نیز برای اولین بار این بیماری در سال ۱۳۶۸ در منطقه کهنوج استان کرمان گزارش شد و در حال حاضر در بسیاری از باغات مرکبات استانهای جنوبی کشور گسترش پیدا کرده است (Ashkan, 2009).

با توجه به دشواریهای موجود جهت کنترل موفق این بیماری، یافتن شیوه‌های نوین کنترل این بیماری از اهمیت زیادی برخوردار است. یکی از موثرترین و سالم‌ترین روش‌ها جهت کنترل بیماری‌های گیاهی افزایش دادن مقاومت گیاهان علیه بیمارگرهای گیاهی است و یکی از روش‌های نوین برای مقاوم

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

سازی گیاهان ایجاد گیاهان تراریخته با گیرنده‌های مختلف است که قادر به شناسایی مولکولی بیمارگرهای گیاهی و فعال‌سازی واکنش دفاعی می‌باشند (Brutus and Yang He, 2010). در حال حاضر پژوهش ها وسیعی در موسسات پژوهش های مختلفی در دنیا در حال انجام است که هدف آنها یافتن محرکهایی جدید از میکروارگانیسم‌ها و گیرنده‌های آنها از گیاهان مختلف می‌باشد تا بعد از شناخت کامل این محرکها و گیرنده‌های مربوطه آنها امکان استفاده از آنها جهت ایجاد گیاهان ترنسژنیک مقاوم علیه بیمارگرهای گیاهی مورد ارزیابی قرار گیرد.

ایده وجود محرکی جدید در *Xanthomonas citri* subsp. *citri* از فعالیت قابل توجه سوسپانسیون سلولی آن در تست‌های مختلفی همچون تست قلیایی شدن خارج سلولی، تولید فرم‌های فعال اکسیژن و تولید اتیلن به وجود آمد که بر روی گیاه کامل آرابیدوپسیس تالیانا و کشت سلولی آن انجام گرفت (Jehle, 2013). هم سوسپانسیون سلولی و هم عصاره خام بدست آمده از این باکتری فعالیت شدیدی بر روی کشت سلولی آرابیدوپسیس نشان دادند (Jehle, 2013). علاوه بر این در تست تولید اتیلن نیز آموده‌های مزبور بر روی چنین آرابیدوپسیسی بسیار فعال بودند. خاصیت محرکی سوسپانسیون باکتریایی و عصاره خام بدست آمده از آن بعد از حرارت دادن به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و تیمار با پروتئازها به شدت کاهش پیدا می‌کرد که نشان دهنده ماهیت پروتئینی آن است (Jehle, 2013). تمامی محرکهایی که تا به حال از گونه‌های مختلف *Xanthomonas* گزارش شده‌اند نسبت به حرارت مقاوم بودند.در تحقیق حاضر در ابتدا عصاره پروتئینی حاصل از باکتری *Xcc* با روش‌های مختلف و بر اساس خاصیت محرکی آن در آزمون تولید اتیلن خالص سازی گردید وسپس نمونه‌های خالص شده با دستگاه تجزیه و تحلیل جرم سنجی متوالی (LC-MS/MS) مورد بررسی قرار گرفت. دانسته ها بدست آمده از LC-MS/MS با روشهای بیوانفورماتیک تجزیه و تحلیل شد و پروتئینهایی با بیشترین تشابه با ویژگی‌های پروتئین مورد بررسی معرفی شدند.

مواد و روش‌ها

سویه باکتریای و نحوه نگهداری آن: باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 306 از کلکسیون میکروارگانیسم‌ها و کشتهای سلولی آلمان (DSMZ) دریافت گردید. برای نگهداری کوتاه مدت، باکتری بر روی محیط کشت LB آگار و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای نگهداری بلند مدت، باکتری تا اواخر فاز لگاریتمی در داخل محیط LB کشت شد و سپس سوسپانسیون حاصل با گلیسرول مخلوط گردید، به طوری که درصد نهایی گلیسرول آن ۵۰ درصد شد. سوسپانسیون‌های حاصل بعد از نگهداری به مدت حداقل یک ساعت در دمای اتاق به دمای ۸۰- منتقل شدند.

گیاه وحشی و جهش یافته‌های مورد استفاده: در تمامی آزمایشات ، جفت موتانتهای *efr x fls2* و *efr x bak1* از گیاه *آرابیدوپسیس تالیانا* مورد استفاده قرار گرفت. جفت موتانت *efr x fls2* هیبریدی از لاین الحاقی T-DNA در SALK_044334 (که دارای یک الحاق در ژن کد کننده گیرنده EF-Tu است)، و لاین الحاقی T-DNA در SALK_691_C4 (که دارای یک الحاق در ژن کد کننده گیرنده FLS2 است)، می‌باشد. این موتانت توسط دکتر Cyril Zipfel (آزمایشگاه ساینبوری، نورویج، بریتانیا) تهیه شده است (Zipfel, 2005).

کشت در خاک: بذر گیاه طبیعی آرابیدوپسیس و جهش یافته‌های آن در گلدانهای کوچک به مدت یک هفته کشت شدند و بعد از به وجود آمدن گیاهچه‌های کوچک به گلدانهای دیگر (۵×۷ سانتی‌متر) نشاء شدند. برای هر گلدان یک گیاهچه در نظر گرفته شد. هم برای جوانه‌دار کردن و هم برای رشد، گلدانها در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۸ ساعت تاریکی و شدت نوری ۷۰ μE/m2/s با رطوبت نسبی ۴۰ تا ۶۰ درصد در اتاقکهای کنترل شده محیطی نگهداری شدند. سینی‌های حاوی گلدانها در ۳ هفته اول با پوشش مخصوص شفاف پوشانده شدند. خاک مورد استفاده از نوع GS90 با نسبت ورمیکولیت ۲۱:۵ بود که با کونفیدور ۰/۰۳۵ درصد آبیاری شده بود.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

اندازه‌گیری تولید اتیلن: این آزمون بر اساس روش فلیکس و همکاران (۱۹۹۹) به انجام رسید. برای این کار، برگهایی از گیاه-های آرابیدوپسیس ۴ تا ۶ هفته‌ای جمع‌آوری شده، به قطعات ۱ میلی‌متر در ۲ میلی‌متر (هر تکه حدود ۴ میلی‌گرم بود) تکه تکه شدند و به مدت حداقل ۶ تا ۱۰ ساعت در ddH_2O و در داخل پتری دیش نگهداری شدند. سپس به هر لوله آزمایش کوتاه (۶ میلی‌لیتری) که حاوی ۵۰۰ میکرولیتر ddH_2O بود ۳ عدد از این تکه‌های برگ منتقل شدند. برای اندازه‌گیری فعالیت MAMP نمونه‌های مورد نظر، مقادیر مختلف (بسته به نمونه ۱ تا ۳۰ میکرولیتر) از آن به لوله‌های آزمایش منتقل شد و دهانه لوله‌ها با دربهای لاستیکی مخصوص پوشانده شد و لوله‌ها بر روی شیکر و در دمای آزمایشگاه با چرخش ۱۲۸ دور در دقیقه به مدت ۲ تا ۴ ساعت قرار داده شدند. سپس یک میلی‌لیتر از هوای داخل لوله‌ها با استفاده از سرنگ به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شدند.

تهیه عصاره خام کل باکتری *Xcc* در مقیاس بالا: بعد از انجام کشت خطی و تک کلون نمودن باکتری *Xcc* از استوک گلیسرول آن از دمای ۸۰-، کلنی‌های حاصل برای تلقیح در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت LB در ارلن۲۵۰ میلی‌لیتری مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت تلقیح شده در داخل شیکر انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت گردش ۲۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد و سوسپانسیون باکتریایی حاصل برای تلقیح ۲۰۰ عدد تشتک پتری حاوی محیط کشت کینگ بی (King's medium B) مورد استفاده قرار گرفت. تشتک‌های پتری مایه‌زنی شده به مدت۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و باکتری‌های رشد یافته بر روی این محیط کشت‌ها جمع آوری شده و در داخل ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل تعلیق گردیدند. باکتری‌های موجود در سوسپانسیون حاصل با استفاده از سانتریفوژ با دور ۶۰۰۰ g رسوب داده شدند و یکبار دیگر با آب مقطر استریل شست و شو شدند. محصول نهایی بدست آمده که حدود ۱۵۰ گرم سلول باکتری بود (وزن تر) به نسبت ۱ به ۱ در آب مقطر دیونیزه و استریل شده تعلیق گردید و در ظرف‌های تیوپهای ۵۰ میلی‌لیتری (۳۰ میلی‌لیتر به ازای هر ظرف) ریخته شد. برای تهیه عصاره خام پروتئینی، سوسپانسیون‌های حاصل در معرض سونیکاسیون (با شدت ۶۰ تا ۷۰ درصد) قرار گرفت تا سلولها به طور کامل متلاشی شوند. برای جلوگیری از گرم شدن، هر فالکون ۱۰ بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه در معرض سونیکاسیون قرار گرفت. هم در طول سونیکاسیون و هم در زمان استراحت، فالکون ها در داخل یخ نگهداری می‌شدند تا از گرم شدن آنها جلوگیری شود. سپس قطعات نامحلول موجود در سوسپانسیون‌های حاصل با استفاده از سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۴۰۰۰ g و به مدت ۳۰ دقیقه جداسازی شد. محلول رویی بدست آمده، مایعی زرد رنگ و شفاف بود که بلافاصله به حجم‌های ۱۰ میلی‌لیتری تقسیم شد و به دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد. علاوه بر این یک میلی‌لیتر از آن هم برای اندازه گیری پروتئین کل، تست قلیایی شدن و تولید اتیلن به کار گرفته شد تا میزان خاصیت MAMPی آن تخمین زده شود.

تکنیکهای پروتئومیکس مورد استفاده

تعیین کمیت پروتئینی: غلظت پروتئین در مراحل مختلف با استفاده از روش بردفورد و بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های معیین پروتئینی اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد به وسیله غلظتهای مختلف سرم آلبومین گاوی (از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم) و با نرم افزار اکسل تهیه شد. محلول تغلیظ شده 5x Roti®-Quant Bradford (Carl-Roth, Karlsruhe, Germany) به نسبت ۱ به ۴ رقیق شد و ۱۰ میکرولیتر از بافر نمونه مورد نظر (به عنوان کنترل)، نمونه و محلولهای استاندارد در چاهک های پلیت ۹۶ تایی پخش شدند و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده بردفورد اضافه گردید و با دستگاه الیزا قرائت گردید.

دیالیز: در تمام مراحلی که محلول‌های پروتئینی نیاز به تنظیم pH و یا جداسازی مولکول‌های کوچک داشت مورد دیالیز قرار گرفتند. برای این منظور از تیوپ دیالیز با قابلیت عبور حداکثر ۶ کیلودالتون استفاده شد. بعد از پر کردن تیوپ دیالیز با محلول پروتئینی مورد نظر تیوپ با گیره‌های مخصوص بسته شد و در داخل ۳-۵ لیتر محلول تریس با pH ۸ دیالیز شد.

کروماتوگرافی تبادل آنیونی (Anion exchange chromatography): برای پیش خالص‌سازی عصاره خام بدست آمده، ابتدا

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

کروماتوگرافی تبادل آنیونی به صورت دستی و مرحله‌ای و با استفاده از رزینهای Q-sepharose و یا DEAE sephacel در ستون شیشه‌ای Econo-Column (BioRad, Hercules, USA) در اتاق سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. حجم این ستون ۵۵ میلی-لیتر با قطر ۸ سانتی‌متر بود. با توجه به قطر زیادی که این ستون داشت امکان انجام کروماتوگرافی با سرعت و کارایی بسیار زیاد را امکان‌پذیر ساخت. سرعت جریان بافرها در مرحله متعادل سازی ستون ۲ میلی لیتر بر دقیقه و در زمان اعمال عصاره پروتئینی و شست و شو ۱ میلی لیتر بر دقیقه در نظر گرفته شد. بافر مورد استفاده برای کروماتوگرافی تبادل آنیونی تریس ۲۰ میلی‌مولار با pH ۸ بود. برای انجام کروماتوگرافی ابتدا ستون با محلول B (۱ مولار کلرید سدیم در ۲۰ میلی‌مولار بافر تریس ۸ pH) شست و شو شد و سپس ۳۰۰ میلی‌لیتر از محلول A (۲۰ میلی‌مولار تریس ۸ pH) از آن عبور داده شد تا متعادل (Equilibrate) گردد. سپس نمونه پروتئینی مورد نظر از ستون عبور داده شد و دوباره با محلول A شست و شو شد و پروتئین-های متصل شده به ستون با غلظت‌های مختلف محلول B (با ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) از ستون شست و شو شد و در حجم‌های ۱۴ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد و میزان پروتئین کل و فعالیت محرکی موجود در آنها به ترتیب با آزمون بردفورد و آزمون تولید اتیلن تخمین زده شد. علاوه بر این برای بدست آوردن تفکیک و وضوح بیشتر برای خالص سازی از ستون ۵ میلی‌لیتری Hitrap Q FF متصل به سیستم ÄKTAmicroFPLC با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نیز استفاده شد.

تجزیه و تحلیل جرم سنجی متوالی کروماتوگرافی مایع (LC-MS-MS): تجزیه و تحلیل‌های جرم سنجی که به منظور تعیین توالی پپتیدها در مراحل مختلف انجام شد در مرکز پروتئومیکس دانشگاه توبینگن انجام شد. قبل از انجام کروماتوگرافی پروتئین ها در معرض تریپسین قرار گرفته و سپس تجزیه و تحلیل شدند.

تجزیه و تحلیل پروتومیکس نتایج حاصل از LC-MS/MS

توالی‌های حاصل از LC-MS/MS برای یافتن توالی‌های هومولوگ در بانک ژن NCBI (GenBank) توسط ابزار بلاست مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی از ابزارهای موجود در سرور Protparam پروتال ExPASy (http://web.expasy.org/protparam) استفاده شد. برای تعیین عملکرد پروتئین‌ها از ابزارهای بیوانفورماتیک CDD-BLAST، TIGRFAM و PFAM استفاده شد تا دمین‌ها (Domains) و موتیف‌های (Motifs) محافظت شده در توالی‌های مزبور تعیین گردد. برای پیش بینی جایگاه قرار گیری پروتئین از سرور PSORTB (http://www.psort.org/psortb/) و SOSUI (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html) استفاده شد. تعیین ساختار سه بعدی پروتئین به وسیله سرور Phyre2 (http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index) صورت گرفت.

نتایج و بحث

تهیه عصاره پروتئینی فعال و پیش خالص سازی آن

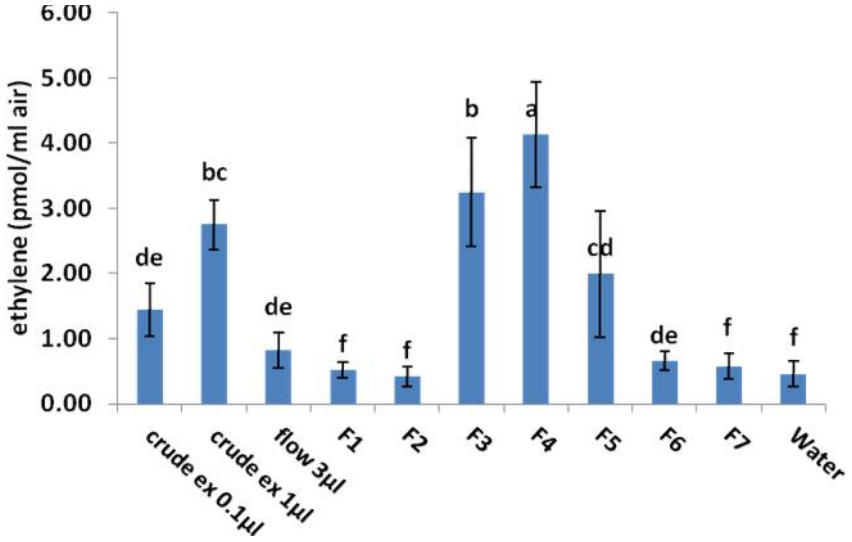
برای تهیه عصاره پروتئینی فعال باکتری از ۲۰۰ عدد تشتک پتری حاوی محیط کشت کینگ بی استفاده شده که در نهایت حدود۱۵۰ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی فعال بدست آمد. غلظت پروتئینی این عصاره بسیار بالا بوده و با روش برد فورد در حدود ۲-۳ میلی گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین این عصاره در آزمون تولید اتیلن بسیار فعال بود و تنها ۰/۱ میکرولیتر از آن منجر به تحریک تولید ۱/۴۴ پیکو مول اتیلن گیاه به ازای هر میلی‌لیتر هوا شد (شکل ۱). در صورتی که هر ۰/۳ میکرولیتر از این محلول را یک واحد فعال در نظر بگیریم محلول مزبور حاوی ۵۰۰۰۰۰ واحد فعال MAMPی خواهد بود. برای خالص سازی نسبی، عصاره به دست آمده بعد از انجام دیالیز بر علیه محلول ۲۰ میلی مولار تریس با pH ۸، بر روی ستون تبادل آنیونی (anion exchange column) اعمال شد و با غلظت های مختلف محلول کلرید سدیم از ستون شست و شو شده و در حجم‌های ۱۴ میلی-لیتری جمع آوری شد. کروماتوگرافی تبادل یونی در حال حاضر یکی از مهمترین تکنیکهایی است که به صورت وسیعی برای

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

خالص سازی پروتئین‌ها به کار می‌رود. همانطور که در شکل ۱ مشخص است، از بین فراکسیونهای جمع‌آوری شده تنها سه فراکسیون فعالیت MAMPی دارد و بیشترین قدرت فعالیت مربوط به فراکسیون‌های F3 و F4 می‌باشد. غلظت پروتئینی این فراکسیون‌ها به ترتیب ۵۱۶ و ۶۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه-گیری شد و هر کدام حاوی ۴۶۰۰ واحد MAMPی بودند. فراکسیون‌های F3 و F4 برای انجام خالص سازی بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند.

کروماتوگرافی مایع سریع پروتئین (FPLC)

کروماتوگرافی تبادل یونی مهمترین تکنیکی بود که به صورت موفقیت آمیزی در پیش خالص سازی محرک فعال کننده اتیلن گیاه مورد استفاده قرار گرفت. این تکنیک به عنوان یک مرحله غیر قابل اجتناب و به صورت موفقیت آمیزی در خالص سازی MAMPهای مختلف به کار گرفته شده است (Thuerig *et al.*, 2006; Felix *et al.*, 1991; Basse *et al.*,1992; Kunze *et al*, 2004; Zhang *et al.*, 2010; Silva and Heath, 1997). فلیکس و همکاران (۱۹۹۱) از این روش برای توصیف فعالیتی شبیه به هارپین (Harpin like activity) از *Pseudomonas syringae* استفاده کردند و در طول پژوهش ها خود به صورت تصادفی فعالیت دیگری را شناسایی کردند که مربوط به تاژک باکتریایی بود.

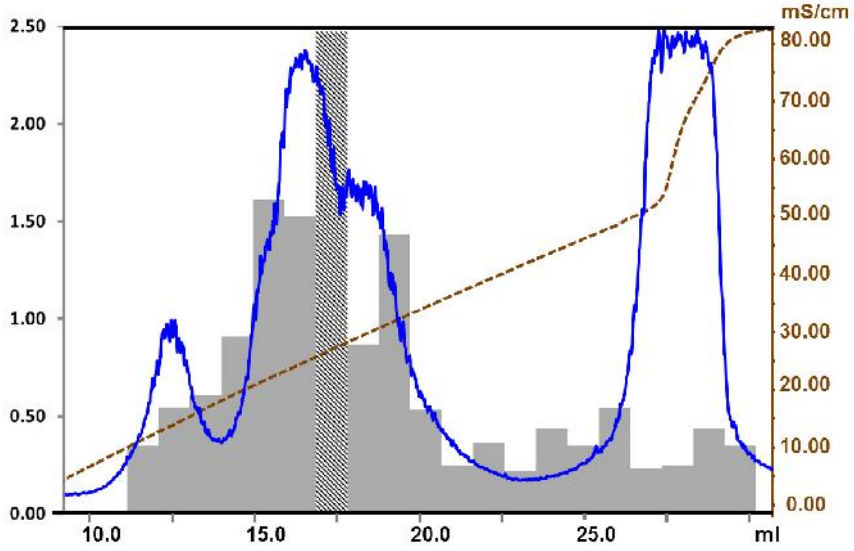


شکل ۱- کروماتوگرافی تبادل آنیونی دستی عصاره خام دیالیز شده *Xcc* با استفاده از رزینهای DEAE sephacel (۵۰ میلی‌لیتری) در ستون Econo-Column. بعد از متعادل کردن ستون مزبور با ۲۰ میلی‌مولار بافر تریس pH ۸، عصاره پروتئینی (۵۰ میلی‌لیتری به غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر، pH ۸) بر روی ستون اعمال شد و پروتئین‌های متصل شده با غلظت‌های ۳۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌مولاری کلرید سدیم در بافر تریس شست و شو شد و در فرکسیونهای ۱۴ میلی‌لیتری جمع‌آوری شده و میزان فعالیت محرکی آنها با آزمون تولید اتیلن بررسی شد. flow: فراکسیون‌های جمع‌آوری شده از ستون قبل از اعمال محلول کلرید سدیم، crude ex: عصاره خام پروتئینی

Figure 1. Manual anion exchange chromatography of *Xcc* crude protein extract with DEAE sephacel resin (50 ml) in Econo-Column. After equilibration of mentioned column with 20 mM tris buffer pH8, protein extract (50 ml with 2 mg/ml concentration, pH8) was applied on column, bonded proteins eluted with 350, 500, and 1000mMNaCl concentrations in tris buffer, gathered in 14 ml fractions and elicitor activity of them was estimated with ethylene production bioassay. frow: gathered fractions from column before sodium chloride solution application, crude ex: crude protein extract.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

نمونه‌های پیش خالص شده توسط کروماتوگرافی مرحله‌ای برای خالص‌سازی بیشتر توسط دستگاه FPLC مجهز شده به ستون تبادل آنیونیHitrap Q FF تجزیه و تحلیل شدند. پروتئین-های متصل شده به ستون با اعمال شیب غلظت نمک کلرید سدیم شسته (elute) و توسط دستگاه جمع کننده (Fraction collector) در فراکسیون‌های (fractions) یک میلی‌لیتری جمع‌آوری و ۰/۱ میکرولیتر از این فراکسیون‌ها برای بررسی فعالیت MAMPی با آزمون تولید اتیلن مورد بررسی قرار گرفتند. با توجه به شکل ۲ فراکسیون‌هایی که بعد از اعمال غلظت ۱۹ تا ۲۹ میلی زیمنس بر سانتی متر از ستون خارج شدند فعال بودند و حداکثر میزان فعالیت در فراکسیونی مشاهده شد که با اعمال غلظت ۲۵ تا ۲۸ میلی زیمنس خارج شده بود (ستون حاشور خورده). این فراکسیون که دارای ۱۰۰۰۰ واحد MAMPی بود با تکنیک MS/MS مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۲- کروماتوگرافی تبادل آنیونی نمونه‌های نیمه خالص با دستگاه FPLC. بعد از تنظیم pH فراکسیونهای بدست آمده از کروماتوگرافی دستی، بر روی ستون HitrapQ FF به حجم ۵ میلی‌لیتر اعمال شد و با اعمال شیب غلظت کلرید سدیم در مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، پروتئین‌های متصل شده در بخشهای ۱ میلی‌لیتری جمع‌آوری شد و میزان فعالیت محرکی موجود در آنها با استفاده از آزمون تولید اتیلن اندازه‌گیری شد.

Figure 2. Anion exchange chromatography of semi purified sample by FPLC. Semi-purified protein solution was dialyzed against Tris buffer with pH8 and applied on Hitrap Q FF 5 ml column and bounded proteins were eluted by applying gradient concentration of NaCl in 15 min with 1 ml per minute. Eluted proteins were gathered in 1 ml fractions and their elicitor activity estimated by ethylene production bioassay.

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از جرم سنجی متوالی

فراکسیون فعال حاصل از FPLC با تکنیک تجزیه و تحلیل جرم سنجی متوالی مورد ارزیابی قرار گرفت و توالی‌های پپتیدی داخل آن تعیین، و شباهت این توالی‌ها در پایگاه‌های دانسته های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). بر اساس نتایج حاصل از بلاست پپتیدها در پایگاه‌های دانسته های، برای بیشتر پپتیدهای مورد بررسی عملکرد کاملا مشخصی قابل شناسایی بود و تنها در ۹ مورد عملکرد مشخصی شناسایی نشد و تنها مشخص شد که این توالی‌ها مربوط به پروتئین‌های با عملکرد نامشخص می‌باشند.علاوه بر این جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک هر کدام از موارد با ابزارهای مورد اشاره در مواد و روش‌ها محاسبه گردید. همانطور که در جدول ۱ قابل مشاهده است، پروتئین‌های شناسایی شده دارای عملکردهای متنوعی می‌باشند که در باکتری-های جنس *Xanthomonas* معمول هستند. در غالب موارد، نقطه ایزوالکتریک بین ۵/۵ تا ۶ و جرم مولکولی بین ۲۰ تا ۵۰ کیلو دالتون محاسبه شد. هر چند برای بعضی از پروتئین‌ها نقطه ایزوالکتریک بالای ۹ و جرم مولکولی بالای ۶۰ کیلو دالتون نیز

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

محاسبه شد. در بررسی‌های پیشین جرم مولکولی اصلی‌ترین عامل القاء کننده تولید اتیلن در پروتئوم باکتریهای جنس *Xanthomonas* در حدود ۱۰ کیلو دالتون و نقطه ایزوالکتریک آن در حدود ۸ تعیین شده بود (فلاح‌زاده، ۱۳۹۲). با نگاهی به جدول ۱ می‌توان به راحتی بسیاری از موارد شناسایی شده را غربال کرد چرا که از بین این لیست تنها سه مورد از پروتئین‌ها دارای جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک ذکر شده هستند (موارد ۲، ۱۲ و ۲۱) و به عبارتی می‌توان آنها را به عنوان کاندید القاء کننده اتیلن معرفی کرد.

توصیف خصوصیات کاندیدهای معرفی شده

یکی از کاندیدهای معرفی شده در این بررسی پروتئین CspA می‌باشد که وزن مولکولی آن در حدود ۸ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک آن ۸/۱۲ است. این پروتئین کوچک یکی از مهمترین پروتئین‌هایی است که در هنگام اعمال شوک سرمایی در باکتریها تولید می‌شود به طوری که ۱۰ درصد کل پروتئین‌های سنتز شده در باکتری‌ها بعد از اعمال شوک را تشکیل می‌دهد (Goldstein *et al.*, 1990). پروتئین CspA از ۷۱ اسید آمینه تشکیل شده است که توالی آن با دمین شوک سرمایی خانواده پروتئینی جعبه Y در یوکاریوتها ۴۳ درصد تشابه نشان می‌دهد (Wolffe, 1994). در بررسی‌های اولیه پروتئین شوک سرمایی cspAبه عنوان یک محرک غالب در القای تولید اتیلن معرفی شد (فلاح‌زاده، ۱۳۹۲) اما در بررسی‌های تکمیلی مشخص شد که این پروتئین بر روی توتون به شدت فعال است و در صورتی که بر روی آرابیدوپسیس هیچگونه فعالیتی ندارد (Martin Lipschis, unpublished data).

پروتئین کاندید دیگر CsrA می‌باشد که در واقع جزء مرکزی سیستم تنظیمی عمومی (Global regulatory system) Csr در باکتری‌هاست که مسئول کاهش بیان ژنهای مختلف فاز سکون می‌باشد (Gutierrez *et al.*, 2005). با انجام بلاست در سایت NCBI شباهت توالی این پروتئین با پروتئین CsrA در باکتری *Escherichia coli* به میزان ۹۰ درصد و در جنس *Bacillus* در حدود ۴۵ درصد تعیین شد و می‌توان گفت این پروتئین جزء پروتئین‌های حفاظت شده است. این پروتئین تا به حال به عنوان محرک گزارش نشده است (Boller and Felix, 2009; Henry *et al.*, 2012).

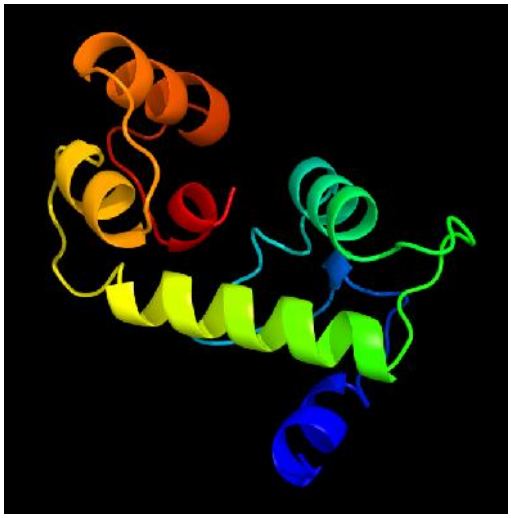
از بین سه کاندید اشاره شده در بالا، مورد شماره ۲ شناخته شده نبوده و تنها به عنوان یک پروتئین حفاظت شده از خانواده پروتئینی DUF1456 شناسایی گردید. این خانواده شامل چندین پروتئین باکتریایی است که هر کدام از حدود ۱۵۰ اسید آمینه تشکیل شده است و عملکرد هیچکدام از آنها شناخته نشده است (http://pfam.xfam.org/family/PF07308.10). با بررسی‌هایی که در ابزارهای SOSUI وPSORTB صورت گرفت مشخص شد که این پروتئین قابل حل در آب بوده و هیچگونه توالی مرتبط با غشاء های باکتری را ندارد و بنابراین به احتمال زیاد جزء پروتئین‌های سیتوپلاسمی محسوب می‌شود. برای تعیین ساختار سه بعدی این پروتئین از سرور Phyre2 استفاده شد (شکل ۳). ابزار مورد استفاده در این سرور چندین مدل بر اساس الگوهای مختلف ارائه کرد که یکی از مدلهای ارائه شده که بیشترین شباهت را به پروتئین مورد بررسی ما داشت مربوط به مدل ارائه شده بر اساس یک پروتئین متصل شونده به DNA به نام ure3-bp بود. سطح اطمینان این مدل پایین بوده و در حد ۶۹ درصد می‌باشد (شکل ۳).

هر سه پروتئینی که در این بررسی به عنوان کاندید معرفی شدند اندازه کوچکی دارند و حفاظت شدگی بالایی در بین پروکاریوت‌ها دارند. این خصوصیات تا حد زیادی جزء خصوصیات عمومی MAMPها محسوب می‌شود (Boller and Felix, 2009). از سویی دیگر همانطور که اشاره شد، این پروتئین‌ها از لحاظ جرم مولکولی و نقطه ایزوالکتریک نیز مشابه بخش فعال پروتئوم *Xanthomonas citri* subsp. *citri* می‌باشند. بنابراین با احتمال بسیار بالایی می‌توان نتیجه گیری کرد که یک، دو و یا هر سه این پروتئین‌ها مسئول خاصیت محرکی پروتئوم این باکتری می‌باشند. با این وجود برای اثبات این پروتئین‌ها به عنوان MAMP جدید باید ژن‌های کد کننده این پروتئین‌ها کلون شوند و بعد از بیان آنها در ای. کولای، خاصیت محرکی آنها بر روی آرابیدوپسیس بررسی شود. با شناخت کامل این محرکها و گیرنده‌های آنها می‌توان این سیستم شناسایی را از گیاه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

آرابیدوپسیس به مرکبات منتقل کرد و ارقامی با مقاومت کامل نسبت به بیماری شانکر مرکبات ایجاد کرد.



شکل ۳- ساختار سه بعدی ارائه شده توسط سرور Phyre2 برای پروتئین فرضی شماره دو.

Figure 3. Three dimensional structure of hypothetical protein number 2 by Phyre2 server.

جدول ۱. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل طیف سنجی جرمی متوالی و خصوصیات پروتئین‌های شناسایی شده.

Table 1. Results from tandem mass spectrometry analysis and identified proteins

	Protein Descriptions	Intensity	Sequence Coverage	pI	Mol. Weight [kDa]
1	ssb single-stranded DNA binding protein	185300000	54.4	5.48	19.096
2	conserved hypothetical protein	20404000	33.8	7.82	17.855
3	conserved hypothetical protein	21690000	31.9	7.91	27.393
4	conserved hypothetical protein	16636000	31.8	9.51	17.113
5	mdh malate dehydrogenase	1081500000	31.7	5.52	34.935
6	groEL 60kDa chaperonin	135710000	28.2	5.01	57.184
7	groEL 60 kDa chaperonin	32560000	26.2	5.05	57.166
8	pdxHpyridoxamine 5-phosphate oxidase	55075000	21.6	6.44	22.2
9	osm Cosmotically inducible protein	7476200	19.4	5.6	15.371
10	purEphosphoribosylaminoimidazole carboxylase catalytic subunit	2048100	14.4	6.39	17.097
11	sodMsuperoxidase dismutase	2555000	14.3	5.46	22.717
12	cspA major cold shock protein	2875600	14.1	8.12	7.9449
13	kdsA 2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase	2216200	13.8	5.87	29.755
14	PqqC protein	16708000	13.6	6.67	28.234
15	conserved hypothetical protein	14219000	12.7	5.34	43.848
16	conserved hypothetical protein	7481800	12.6	9.15	21.417
17	pcnB polynucleotide adenyltransferase	19147000	12.3	8.89	51.034
18	eda KDPG and KHG aldolase	6572900	11	6.32	22.774
19	pnp polynucleotide phosphorylase	43356000	10.8	5.46	75.434
20	atoBacetoacetyl-CoA thiolase	22552000	10	6.08	39.847

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

21	csrA carbon storage regulator	7686100	10	6.25	7.5655
22	gvpU gas vesicle protein	3833900	10	4.85	14.139
23	conserved hypothetical protein	2669100	9.9	5.44	17.434
24	gltA citrate synthase	7706800	9.8	5.98	47.832
25	tolBTolB protein	2754500	9.8	9.2	47.034
26	pykA pyruvate kinase	26389000	9.6	5.45	52.21
27	gumLGumL protein	1595800	9.5	6.38	29.376
28	conserved hypothetical protein	1305400	9.4	7.79	23.73
29	acdA acyl-CoA dehydrogenase	1091300	9	5.89	41.503
30	phdBdihydrolipoamideacetyltranferase	27981000	8.9	5.07	59.791
31	dnaKDnaK protein	12167000	8.9	4.99	68.836
32	hydrolase	4487200	8.9	5.17	24.258
33	crt 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	2429200	8.8	6.44	27.648
34	rpoB RNA polymerase beta subunit	30576000	8.7	5.46	154.2
35	tufA elongation factor Tu	5226600	8.1	5.45	43.185
36	fadE9 acyl-CoA dehydrogenase	2609000	8.1	5.96	42.356
37	rpoB RNA polymerase beta subunit	1102300	8.1	5.35	154.9
38	tolBTolB protein	3303900	7.7	9.3	47.056
39	rplT 50S ribosomal protein L20	1289700	7.6	11.74	13.373
40	crt 3-hydroxybutyryl-CoA dehydratase	17537000	7.3	5.99	27.588
41	nerA GTN reductase	16462000	6.8	5.35	39.407
42	rpfNRpfN protein	1742100	6.3	6.07	41.13
43	ggt gamma-glutamyltranspeptidase	16491000	6.1	6.48	62.711
44	alcohol dehydrogenase	9970800	6	6.3	34.912
45	DNA-binding related protein	1499800	6	5.72	20.37
46	purAadenylosuccinatesynthetas	4962500	5.8	5.56	46.163
47	odhAoxoglutarate dehydrogenase	12898000	5.7	5.97	104.42
48	zwf glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	36378000	5.5	9.91	70.995
49	CoA tranferase	1689800	5	5.59	55.008
50	pepAaminopeptidase A/I	4634000	4.7	5.18	51.181
51	bioA adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase	3183200	4.4	6.01	51.508
52	accC biotin carboxylase subunit of acetyl CoA carboxylase	1119500	4.4	6.95	49.435
53	lig1 DNA ligase	4924800	4.2	5.57	90.483
54	conserved hypothetical protein	2950800	4.1	5.88	24.068
55	pgi glucose-6-phosphate isomerase	2789200	4	5.75	54.176
56	folPdihydropteroate synthase	1319600	4	5.86	31.861
57	aceE pyruvate dehydrogenase	2808400	3.5	5.77	99.758
58	bioA adenosylmethionine-8-amino-7- oxononanoate aminotransferase	6634100	3.4	6.11	51.303
59	prc tail-specific protease	1268300	3.4	5.64	79.988
60	conserved hypothetical protein	6544800	3.3	6.92	29.45
61	deoD purine nucleoside phosphorylase	2781500	3.2	5.79	26.216
62	rneribonuclease E	1069300	3.2	5.59	128.31

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

منابع

Agrios GN. 2005. Plant pathology. 5th edition. Elsevier Academic Press. USA.

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J. 2002. MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. Nature 415: 977-983.

Ashkan SM. 2009. Handbook of frout trees disease in Iran. Ayizj press. Iran. (In persian).

Basse CW, Bock K, Boller T. 1992. Purification and characterization of glycopeptide elicitors and glycan suppressors generated by enzymatic cleavage of yeast invertase. The Journal of biological chemistry. 267: 10258-10265.

Boller T, Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors.Annual Reveiws of Plant Biology 60:379-406.

Brutus A, Yang HS. 2010. Broad-spectrum defense against plant pathogens. Nature Biotechnology 28: 330–331

D'Silva I, Heath MC. 1997. Purification and characterization of two novel hypersensitive response-inducing specific elicitors produced by the cowpea rust fungus. The journal of biological chemistry 272 (7): 3924-3927.

Fallahzadeh-Mamaghani V. 2012. Iteraction of *Xanthomonas axonopodis* elicitor with the receptor like protein from *Arabidopsis thaliana* and its role in the induction of plant resistance. Doctorial thesis, University of Tehran. (In persian)

Felix G, Duran JD, Volko S., Boller T. 1999. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant Journal 18: 265-276

Felix G, Grosskopf DG, Regenass M, Basse CW, Boller T.1991. Elicitor-induced ethylene biosynthesis in tomato cells: characterization and use as a bioassay for elicitor action. Plant Physiology97**:**19-25.

Goldstein J, Pollotte NS, Inouye M. 1990. Major cold shock protein of Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7322-7326.

Gutierrez P, Li Y, Osborne MJ, Pomerantseva E, Liu Q, Gehring K. 2005. Solution structure of the carbon storage regulator protein CsrA from Escherichia coli. Journal of bacteriology 10(189): 3496–3501.

Henry G, Thonart P, Ongena M. 2012. PAMPs, MAMPs, DAMPs and others: an update on the Diversity of plant immunity elicitors. Biotechnology, Agronomy, Society and Environment 16(2): 257-268

Jehle AK, Lipschis M, Albert M, Fallahzadeh-Mamaghani V, Fürst U, Mueller K, Felix G. 2013. The receptor-like protein ReMAX of *Arabidopsis thaliana* detects the novel MAMP emax from *Xanthomonas*. 25: 2330-2340.

Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G. 2004. The N terminus of bacterial Elongation Factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. Plant Cell 16, 3496-3507.

Lotze MT, Zeh HJ, Rubartelli A, Sparvero LJ, Amoscato AA, Washburn NR, DeVera ME, Liang X, Tör, M, Billiar T. 2007. The grateful dead: damage associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. Immunological reviews 220**:**60-81.

Ludwig AA, Saitoh H, Felix G., Freymark G, Miersch O.2005. Ethylene-mediated cross-talkbetween calcium-dependent protein kinase and MAPK signaling controls stress responses in plants.Proc. Natl. Acad. Sci.USA102: 10736–41.

Mackey D, McFall AJ. 2006. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innateimmunity. Molcular Microbiology61: 1365-71.

Thuerig B, Felix G, Binder A, Boller T, Tamm L. 2006. An extract of *Penicillium chrysogenum* elicits early defense-related responses and induces resistance in *Arabidopsis thaliana* independently of known signalling pathways. Physiological and Molecular Plant Pathology 67: 180-193.

Wolffe AP. 1994. Structural and functional properties of the evolutionary ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. Bioessays 16:245±251.

Yunhua Zhang, Xiufen Yang, Quan Liu, DewenQiu, YuliangZhang,Hongmei Zeng, Jingjing Yuan, Jianjun Mao 2010. Purification of novel protein elicitor from *Botrytis cinerea* that induces disease resistance and drought tolerance in plants. Microbiological Research 165: 142-151

Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, 2010. Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. Cell Host Microbe 7: 290-301.

Zipfel C. 2006. Receptor-like kinases and pathogen-associated molecular patterns perception in *Arabidopsis*. Doctorial thesis, University of Basel.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol4, Number2, Fall 2015 and Winter 2016, Bi-seasonal

Proteome analysis of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* protein extract with elicitor activity on *Arabidopsis thaliana*

Vahid Fallahzadeh-Mamaghani

Assistant Professor of Plant protection department, College of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

* Corresponding Author, Email: fallahzadeh@azaruniv.edu

A B S T R A C T

Extensive research is currently going on in different research centers of the world to find new elicitors from microorganisms and their related receptors from different plants. Comprehensive knowledge about these elicitors and their cognate receptors could be used for development of transgenic plants displaying resistant against plant pathogens. As a crude protein extract of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xcc) has strong elicitor activity on *Arabidopsis*, in this study protein extracts of this bacterium were prepared and fractionated and a semi-purified sample displaying elicitor activity was analyzed by LC-MS/MS. About 60 different proteins were detected in the analyzed sample. Among the detected proteins, only three were similar to the elicitor activity observed in a protein extract of *Xcc* bacterium: cspA (cold shock protein A), csrA (carbon storage regulator protein A) and an unknown conserved hypothetical protein from the DUF1456 protein family. This protein is soluble in water and it has no bacterium membrane-targeting sequence as determined by PSORTB and SOSUI analysis, suggesing with high probability that it is a cytoplasmic protein.

Key Words

Arabidopsis, Elicitor, Ethylene, Proteome, *Xanthomonas*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.4.4]