مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۸، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۸
صفحه ۱۰۰-۹۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 8, Number 1

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 Salekdeh[2]

۱- گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان، ایران
۲- بخش زیست شناسی سیستم‌ها، پژوهشکده بیوتکولوژی 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

بیماری "جاروک" که توسط عامل "*Candidatus phytoplasma aurantifolia*" به وجود می‌آید یکی از بیماری‌های مهم مرکبات در ایران، غرب آسیا و شمال آفریقا می‌باشد 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. نمونه‌های برگی از گیاهان جمع‌آوری شده و با الکتروفورز دوبعدی (2-DE) و سپس طیف‌سنجی جرمی (MS) مطالعه شدند. توان بالای (2-DE) در تفکیک پروتئین‌ها این امکان را فراهم می‌سازد 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 برگی که با استفاده از نرم‌افزار ملانی (Melani6) در هشت تکرار زیستی سالم و هشت تکرار زیستی آلوده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند، شصت‌وسه پروتئین نسبت به بیماری پاسخ نشان دادند که از این تعداد نوزده پروتئین توسط طیف‌سنج جرمی شناسایی شدند، این پروتئین‌ها در مقابله با تنش اکسیداتیو، فتوسنتز، متابولیسم و پاسخ به تنش شرکت داشتند که با شناسائی این پروتئین‌ها می‌توان مسیرهای پاسخ جدیدتر و ژن‌هائی که آن‌ها را کنترل می‌کنند آشکارکرد و همچنین نتایج این پژوهش می‌تواند در به‌نژادی لیموی مکزین لایم مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

بیماری جاروک،
الکتروفورز دو بعدی،
طیف‌سنج جرمی،
فیتوپلاسم،
لیموترش

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]

مقدمه

بیماری "جاروی جادوگر" یکی از بیماری‌های مهم مرکبات در جنوب کشور می‌باشد. این بیماری در اواخر دهه ۱۹۷۰ در کشور پادشاهی عمان مشاهده شد. در ایران نیز از سال ۱۳۷٦ پس از ارائه اولین گزارش از استان سیستان و بلوچستان، درختان آلوده زیادی دراستان‌های هرمزگان و کرمان مشاهده شد. علائم این بیماری شامل رنگ‌پریدگی برگ‌ها، جارویی شدن سرشاخه‌های گیاه، توقف رشد، خشکیدگی سرشاخه درخت لیموترش است. ظهور شاخه جارویی در یک قسمت از درخت آغاز می‌شود و با گسترش بیماری منجر به افزایش تدریجی تعداد شاخه‌های جارویی در سایر قسمت‌های درخت می‌گردد. تولید میوه‌های کوچک و بدشکل نیز در گیاهان آلوده به فیتوپلاسما دیده می‌شوند. عامل این بیماری، فیتوپلاسمای *"Candidatus phytoplasma aurantifolia"* می‌باشد که فاقد دیواره سلولی است (Zreik *et al.* 1995). زنجره *Hishimonus phycitis* عامل انتشار جاروک لیموترش به درختان سالم می‌باشد بنابراین به دلیل گستردگی انتشار بیماری و همچنین ماهیت عامل بیماری کنترل بیماری مشکل می‌باشد (Salehi *et al.* 2007). یکی از مسائل مجهول در مورد فیتوپلاسماها رابطه بین فیتوپلاسما با گیاه یا حشره میزبان است. تئوری‌های مختلفی در مورد چگونگی اثر فیتوپلاسما بر فعالیت فیزیولوژیکی گیاه میزبان وجود دارد، مثل تغییر در غلظت هورمون‌های داخلی گیاه و جذب عناصر غذائی (Daniels, 1983). اما هیچکدام از تئوری‌ها هنوز به اثبات نرسیده است. جهت کنترل بیماری‌های فیتوپلاسمائی، از ارقام مقاوم یا متحمل، پایه‌های عاری از آلودگی، حذف علف‌های هرز میزبان، کنترل حشرات ناقل، نابود کردن گیاهان آلوده، انتقال ژن‌های مختل‌کننده رشد فیتوپلاسماها استفاده شده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند تتراسیکلین طبق مشاهدات توصیه شده است ولی اغلب این روش‌ها، روش توصیه شده و کارآمدی نیستند. یکی از مهمترین دستورالعمل‌های مقابله با تنش بیماری ایجاد و گسترش ارقام مقاوم به بیماری از طریق برنامه‌های اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک می‌باشد. برای ایجاد ارقام مقاوم ابتدا باید عکس‌العمل گیاهان و واریته‌های 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 می‌شوند مشخص شود. یکی از راهکارهای مهم در این بررسی استفاده از پروتئومیکس است. عرصه‌های جدید پروتئومیکس با قابلیت ایجاد حجم بسیار زیادی از اطلاعات علمی، در ترکیب با روش‌های نوین ژنومیکس و بیوانفورماتیک، امکان شناسایی سازوکارها و ژن‌های دخیل در پاسخ این گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را فراهم می‌کند. 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 پروتئین‌ها 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 ژن‌های که دارای بیان متفاوت بودند شناسایی شدند این ژن‌ها در تعامل گیاه – پاتوژن نقش داشتند (Mardi *et al.* 2015). از راهکار پروتئومیکس این امکان وجود دارد که بتوان به طورجامع به مطالعهٔ بیان ژن‌های پاسخ دهنده به تنش پرداخت و مسیر واکنش‌ها یا ترارسانی پیام‌های ملکولی را شناسایی نمود (Dubey and Grover, 2001).

مواد و روش‌ها

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، نمونه‌هائی 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. درخت‌های پیوندی در شرایط نور طبیعی و دمای ۲۸–۲۵ درجهٔ 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]

در گیاهان آلوده، آزمایش تایید آلودگی با PCR به‌وسیله آغازگرهای عمومی P1, P7 فیتوپلاسما 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 نمونه‌ها بر اساس روش سرحدی و همکاران با اندکی تغییر انجام شد (Sarhadi *et al.* 2010). سپس تعیین غلظت پروتئین‌ها با استفاده از روش برادفورد و با بهره‌گیری از دستگاه اسپکتروفتومتری (Carry 300) در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد. ژل‌ها به مدت دوازده تا شانزده ساعت با آبدهی در سینی‌های مخصوص آبدهی شدند. در بعد اول پروتئین‌ها در ژل‌های IPG (biorad) بیست‌وچهار سانتیمتری با PH چهار تا هفت جداسازی شدند سپس در مرحله بعد دوم به دستگاه SDS-PAGE انتقال یافتند تا پروتئین‌ها بر اساس جرم مولکولی در ژل آکریل آمید با غلظت سیزده درصد جدا شوند. پس از اتمام بعد دوم ژل‌ها در محلول تثبیت‌کننده (Methanol 40% ;acetic acid 10%) قرار داده شدند. رنگ آمیزی برای ژل‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام گرفت (Blum *et al.* 1981). برای ژل‌های آماده سازی به روش رنگ‌آمیزی کوماسی بلو استفاده شد (Neuhoff *et al.* 1988). ژل‌های رنگ‌آمیزی شده بلافاصله پس از رنگ‌آمیزی با قدرت تفکیک ششصد دی پی آی با استفاده از دنسیتومتر تصویربرداری و تصویر دریافتی برای تجزیه و تحلیل نرم‌افزاری ژل‌ها مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل نقاط توسط نرم‌افزار ملانی شش انجام شد. در هر بافت و مرحله حدود هشتصدویک نقطه تکرارپذیر شناسایی و برچسب زده شد و درصد حجمی نقاط (%VOL) به عنوان میزان پروتئین تظاهریافته در نظر گرفته شد. برای مقایسهٔ فراوانی نسبی لکه‌های پروتئینی میان گیاهان سالم و آلوده، از آزمون ANOVA یک طرفه در نرم‌افزار MSTATC استفاده شد و بعد از تجزیه آماری، نقاطی که در سطح پنج درصد معنی‌دار 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.

نتایج و بحث

علائم بیماری جاروک شامل رنگ‌پریدگی سرشاخه‌ها و کوچک شدن برگها که در شاخه‌های جارویی گل و میوه تشکیل نمی‌شود و در نهایت برگها خشک شده و ریزش می‌کنند که این علائم بعد از گذشت پنج ماه روی درختانی که با عامل بیماری فیتوپلاسما تلقیح شده بودند ظاهر شد (شکل۱). 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 فیتوپلاسما را ندارند و هیچ باندی مشاهده نشد.

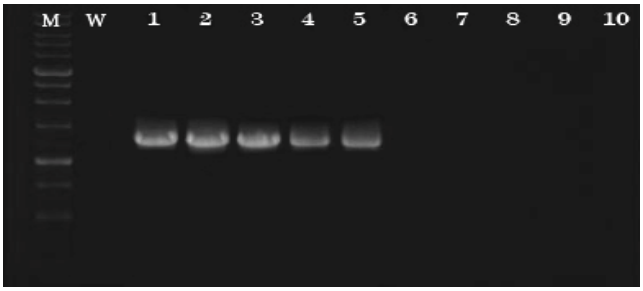
تغییر الگوی بیان فیتوپلاسما**ها در پاسخ به بیماری جاروک در لیموی مکزیکن**

برای مقایسه الگوی بیان پروتئین‌ها در نمونه‌های سالم و آلوده شده به عامل بیماری فیتوپلاسمایی از روش الکتروفورز دو بعدی استفاده شد. بعد از تجزیه و تحلیل داده‌ها مشخص شد که از تعداد هشتصدویک لکه پروتئینی، شصت‌وسه لکه پروتئینی در پاسخ به بیماری تغییر معنی‌داری را در سطح پنج درصد ($P<0.05$) نشان دادند.

شکل۱- آلودگی به بیماری فیتوپلاسمایی جاروک

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]



شکل ۲- نتایج الکتروفورز فرآورده‌های nested – PCR که با استفاده از آغازگرهای عمومی P7 و P1 که منجر به تکثیر قطعه ۱۲۵۰ جفت بازی در گیاهانی که علائم بیماری جاروک را نشان می‌دادند شد. که بر روی ژل آگاروز یک درصد از چپ به راست، چاهک اول M اندازه نشانگر DNA به طول bp ۱۲۵۰ ، چاهک W آب ، چاهک ۵-۱ نمونه‌های لیموترش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش ، چاهک ٦-۱ نمونه‌های 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 سی‌وشش پروتئین در برابر با عامل بیماری افزایش بیان و تعداد بیست‌وهفت پروتئین نیز کاهش بیان نشان دادند. شناسایی پروتئین‌ها 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 (شکل۳). چهار پروتئین با بیان افزایشی Miraculin like protein (1) بودند (لکه‌های ۲۹، ٤۱، ٦۲ و ۲۲۱). سایر پروتئین‌ها با بیان افزایشی یک Copper chaperon (لکهٔ ۵۰)، پروتئین مربوط به بیماریزایی Pathogenesis-related protein 10.6(لکهٔ ۱۰۷)، پروتئین Peroxidase (لکهٔ ۳۵۸)، calmodulin, putative (لکهٔ ۷۱٤)، پروتئین predicted (لکه ۲۵۸)، پروتئین KINID (لکه ٤۸) و پروتئین 6-phosphogluconal actorase (لکه ۲۵۵) است. پروتئین‌های که کاهش بیان داشتند دو پروتئین شوک حرارتی HSP (لکه‌های ۱۱۲و٤۱۲)، Oxygen-evolving (لکه‌های ۱۹٦). سایر پروتئین‌های که دارای کاهش بیان بودند عبارت بودند Triose phosphate isomerase putative (لکهٔ ۱۰۳)، Acetyl glutamate kinase (لکهٔ ۲٤٦)، Ribulose (لکهٔ ۳۰۸) و Thylakoid (لکه ٤۰۹).

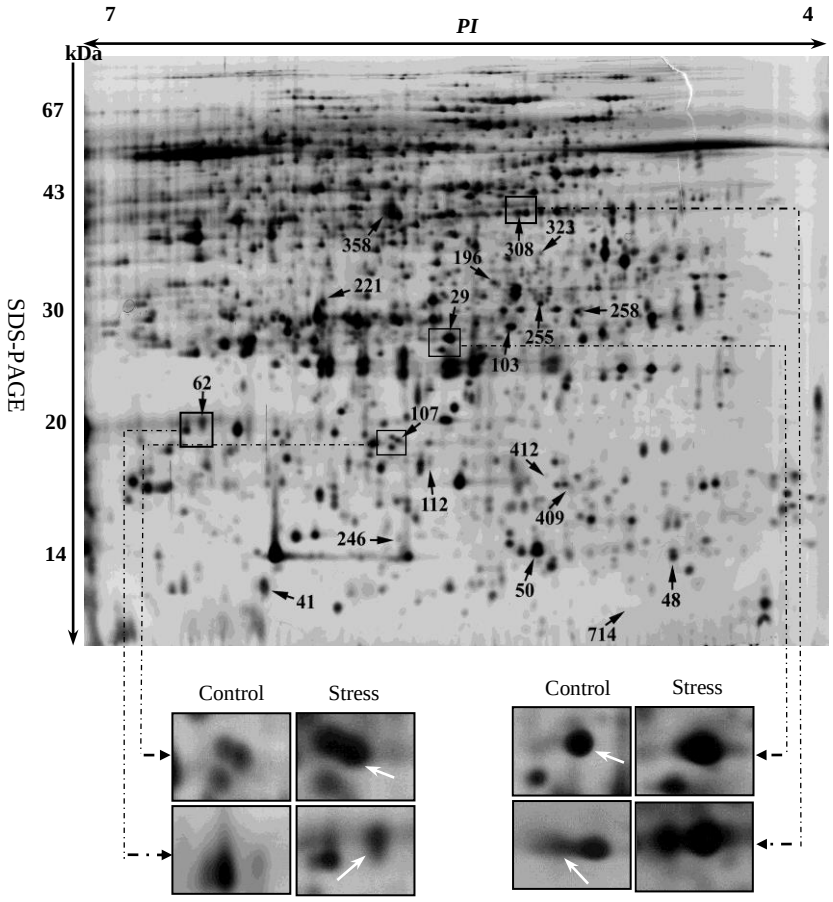
پروتئینهای مربوط به تنش اکسیداتیو در پاسخ به بیماری

بیشترتنشهای 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 می‌شوند. گیاهان جهت مقابله با تنش اکسیداتیو و کاهش اثر مخرب گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از سازوکارهای مختلف آنزیمی و غیر آنزیمی استفاده می‌کنند. تاکنون بیش از یکصدوپنجاه ژن مختلف حذف کننده یا تولید کننده گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان شناسایی شده‌اند، 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، گلوتاتیون پراکسیداز و پراکسی ردوکسین برای حذف H_2O_2 می‌باشد (Sze *et al*, 1992). گونه‌های فعال اکسیژن بسیار فعال و سمی هستند و می‌توانند با آسیب رساندن به DNA، پروتئین‌ها، لیپیدها و کربوهیدرات‌ها منجر به مرگ سلولی شوند (Mittler, 2002). تنظیم افزایشی آنزیم‌های 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 می‌شود.

تنظیم کاهشی پروتئین‌های فتوسنتزی

بررسی پروتئوم شواهدی را در رابطه با کاهش بیان پروتئین‌های فتوسنتزی از جمله Oxygen-evolving (لکه ۱۹٦)، Ribulose bisphosphate carboxylase (لکه ۳۰۸) ارائه کرد. این نتایج با گزارش‌های قبلی مبنی بر اینکه تنش‌های محیطی، بیان ژن‌های رمزگذار پروتئین‌های فتوسنتز را مهار می‌کنند تطابق دارد (Seki *et al*. 2002; Wu *et al*. 2010).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]



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.

بیان متفاوت و تجزیهٔ پروتئین‌های فتوسنتزی طی بررسی پروتئوم پاسخ توت به فیتوپلاسما نیز گزارش شده است. همچنین در یک پژوهش مشخص شد که برای شروع تنفس و سایر فرآیندهائی که برای مقابلهٔ گیاه با پاتوژن ضروری هستند، باید کاهش فتوسنتز صورت گیرد (Scharte *et al*. 2005). بسیاری از پژوهش‌ها پیشنهاد می‌کنند که نرخ فتوسنتزبه 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 فتوسنتز ممکن است یا به دلیل تولید ترکیب‌های وابسته به دفاع باشد یا رشد پاتوژن نرخ فتوسنتز 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 فتوسنتز ممکن است دستگاه فتوسنتزی گیاه را در برابر تنش اکسیداتیو محافظت کند (Somssich and Hahlbrock, 1998). در پژوهش‌های قبلی مشاهده کردیم آلودگی، بیان چهارده پروتئین درگیر در فتوسنتز را کاهش می‌دهد. تغییردر سطوح پروتئین‌های فتوسنتزی همچنین از طریق تجزیه پروتئومی پاسخ به آلودگی فیتوپلاسما در توت و لیمو مشاهده شده است (Monavarfeshani *et al*. 2012).

پروتئینهای مرتبط با پاتوژن (PR)

یکی از پروتئین‌های بیش تنظیم شده (لکهٔ 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 فیتوپلاسما مطابقت دارد (Margaria and Palmano, 2011; Zhong *et al*. 2004).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]

جدول ۱- پروتئین‌های 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	/22^5.	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، ٤- شمارهٔ دسترسی در داده پایگاه‌های MASCOT NCBI، ٥- نام پروتئین، ٦- نمرهٔ 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 لکهٔ 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

تنظیم افزایشی بیان ژن PR-10 پس از عفونت با پاتوژن‌ها در انواع گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی نشان داده شده است، از جمله در عفونت *Capsicum annuum* (Park *et al* .2004). *Cronartium ribicola* در *Pinus monticola* (Liu and Ekramoddoullah, 2006). *Pseudomonas syringae pisi* در *Vitis vinifera* (Robert *et al*. 2001) *Magnaporthe grisea* و *Acidovorax avenae* در برنج مشاهده شده است (McGee *et al*. 2001). خانوادهٔ PR-10 یکی از مهم‌ترین گروه‌ها در بین ۱۷ گروه پروتئین‌های PR است (Yan *et al*. 2008). برخلاف اکثر پروتئین‌های PR که مقصد برون سلولی دارند، PR-10 درون سلولی است و عملکردهای مختلفی از جمله فعالیت ضد میکروبی، فعالیت ریبونوکلئازی در آزمایشگاه و آنزیمی در سوخت و ساز ثانویهٔ گیاه به آن نسبت داده شده است که این عملکردها حاکی از شرکت PR-10 در مقابلهٔ گیاه با حملهٔ پاتوژن دارد (Liu and Ekramoddoullah, 2006).

الگوی بیان پروتئینهای شبه میراکولین

در پژوهش حاضر چهار پروتئین Miraculin like protein (لکه ۲۹، ٤۱، ٦۲ و۲۱) شناسایی شدند که در پاسخ به بیماری افزایش بیان نشان دادند. این پروتئین‌ها به شدت گلیکوزیله هستند و به خانواده مهارکننده‌های پروتئازی تعلق دارند. عملکرد این پروتئین‌ها در پاسخ به تنش هنوز به طور کامل آشکار نشده است

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]

(Tsukuda *et al*. 2006). با این وجود، افزایش بیان این پروتئین‌ها در رابطه با پاتوژن-گیاه گزارش شده است، از جمله می‌توان 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 برگ‌های *Citrus sinensis* که مورد هجوم زنجرهٔ *Homalodisca oagulate* قرار گرفته بود را گزارش دادند. در مقابل، کاهش بیان میراکولین‌ها در گیاهان لیموئی که مبتلا به مرگ ناگهانی لیمو می‌شوند دیده شده است (Cantu *et al*. 2008). پروتئین Miraculin like protein 2 حاوی یک موتیف توماتین است و فعالیت ضد قارچی درمقابل *Altemaria citri* دارد همچنین در این گزارش عنوان کردند که این پروتئین‌ها احتمال دارد دارای عملکرد دفاعی در مقابل پاتوژن‌ها باشند، حداقل آن زمان که سلول‌های میزبان مورد هجوم قرار می‌گیرند (Tsukuda *et al*. 2006). به‌علاوه، این پروتئین‌ها می‌بایست به فضاهای برون سلولی صادر شوند و اولین خط دفاعی در مقابل حملهٔ پاتوژن باشند. پاسخ‌های مختلف به ایزوفرم‌های گوناگون پروتئین‌های Miraculin نشان می‌دهد که یک شبکهٔ تنظیمی پیچیده، الگوی بیان آن‌ها را تغییر می‌دهد. تنظیم افزایشی این چهار پروتئین در مطالعهٔ فعلی می‌تواند 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

پروتئین‌های با بیان متفاوت زیادی در ترجمه و سرنوشت پروتئین دخالت دارند، از جمله پروتئین Copper chaperon (لکهٔ ۵۰) که دارای افزایش بیان بوده و دو پروتئین شوک حرارتی HSP (لکه های ۱۱۲و۴۱۲) کاهش بیان داشتند. کاهش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی که برای حفظ ساختار و عملکرد پروتئین‌های آسیب دیده انجام می‌گیرد، بازتابی از یک پاسخ تطابقی در گیاهان برای برداشت پروتئین‌های بد تاخورده است که به دلیل عفونت فیتوپلاسما تجمع می‌یابند (Polesani *et al*. 2008) که فراوانی این پروتئین‌ها در پاسخ به آلودگی به فیتوپلاسما کاهش می‌یابند (Monavarfeshani *et al*. 2012). افزایش بیان پروتئین KINID1 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 فیتوپلاسما باعث تغییر در سطوح چندین پروتئین می‌شود و به این ترتیب بر درک ما از پاسخ درخت لیموی مکزیکی به عفونت فیتوپلاسما افزود.

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

(۱) استفاده از طیف‌سنجی جرمی برای شناسائی نوزده پروتئین از مجموعهٔ شصت‌وسه پروتئینی که بیان متفاوتی در این پژوهش داشتند. شناسائی این پروتئین‌ها می‌تواند مسیرهای پاسخ جدیدتر و ژن‌هائی که آن‌ها را کنترل می‌کنند آشکار کند.

(۲) با مقایسهٔ گیاهان آلوده و سالم، چندین پروتئین و مسیر به عنوان شرکت کننده‌های اصلی در پاسخ به این بیماری پدیدار شدند. نشان داده شده است که این پروتئین‌ها در فرآیندهای متفاوتی از جمله پاسخ به تنش اکسیداتیو و فتوسنتز دخالت می‌کنند. به‌علاوه، پروتئین‌های Miraculin like زیادی به شکلی متفاوت بیان شدند که احتمال دارد در دفاع گیاه علیه پاتوژن‌ها شرکت داشته باشند. این نتایج می‌تواند چارچوبی را برای طرح پرسش‌ها و آزمون‌های جدید به منظور آشکار کردن زیست شناسی رابطه گیاه-فیتوپلاسما ارائه کند. این نتایج می‌توانند بنیانی برای شناسائی ژن‌هائی فراهم کنند که بتوان آن‌ها را برای افزایش مقاومت گیاه یا سرکوب رشد و تولید پاتوژن مورد هدف قرار داد. با این حال، برای آشکار کردن شرکت این ژن‌ها در حساسیت یا مقاومت درختان لیموی مکزیکی به" *Candidatus phytoplasma aurantifolia*" آزمایش‌های بیشتری باید انجام گیرد. علاوه بر این، می‌توان راهبردهایی ایجاد کرد که این ژن‌ها در برنامه‌های به نژادی مولکولی شرکت کنند.

(۳) درک این موضوع که آیا پروتئین‌های تنظیم شونده اثر مستقیم تعامل با فیتوپلاسما و یا یک اثر ثانویهٔ ناشی از ایجاد علائم را بازتاب می‌کنند حائز اهمیت است. درک اینکه آیا تغییر پروتئین

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]

مشاهده شده در پاسخ به پاتوژن‌ها، بازتابی از تغییر در بیان ژن هستند یا تغییر پس از ترجمه نیز جالب توجه است. درک نقش این پروتئین‌های تنظیم شونده مستلزم پژوهش‌های 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 pathogenesity. 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

Margaria P, Palmano S. 2011. Response of the *Vitis vinifera* L. cv. 'Nebbiolo' proteome to Flavescence 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]

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 mycoplasmalike organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, *"Candidatus phytoplasma aurantifolia*". Characterization of the mycoplasmalike 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]

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 Salekdeh[2]

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-17]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1398.8.1.7.3]