

## مطالعه پروتئوم آپوپلاستی لیموترش با استفاده از الکتروفورز دوبعدی در پاسخ به بیماری شانکر باکتریایی

### Apoplatic proteome of *citrus aurantifolia* investigation by two dimensional electrophoresis in response to citrus canker

عبدالرحمن رسول نیا<sup>۱</sup>، سید مهدی علوی<sup>۱\*</sup>، حسین عسکری<sup>۲</sup>، ناصر فرخی<sup>۳</sup>، مسعود سلطانی نجف‌آبادی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری،

تهران، ایران

۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- استادیار، بخش دانه‌های روغنی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران

Rasoulnia A<sup>1</sup>, Alavi SM<sup>\*1</sup>, Askari H<sup>2</sup>, Farrokhi N<sup>2</sup>, Soltani Najafabadi M<sup>3</sup>

1- PhD Student, Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran

2- Assistant Professors, Department of Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

3- Assistant Professor, Oil Seeds Research Department, Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Karaj, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mealavi@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۱)

## چکیده

بیماری شانکر باکتریایی مرکبات یکی از بیماری‌های ویرانگر می‌باشد که اکثر وارته‌های تجاری مرکبات را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در مطالعه حاضر تغییرات پروتئوم آپوپلاستی تحت تأثیر آلودگی پانوزن برای تعیین پاسخ مولکولی گیاه لیمو ترش تحت بررسی دقیق قرار گرفت. به منظور بررسی پروتئوم خارج سلولی از تکنیک پروتئومیکس برای بررسی تغییرات پروتئین آپوپلاست در طی آلودگی استفاده شد. گیاه لیمو ترش با باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* آلوده شده سپس از گیاهان آلوده شده و سالم در زمان‌های ۱، ۴، و ۷ روز پس از آلودگی در سه تکرار بیولوژیکی نمونه‌برداری شد. پروتئین‌ها با استفاده از ژل دو بعدی جدا شده و لکه‌های دارای میزان افتراقی به وسیله اسپکترومتری جرمی شناسایی شدند. در بررسی ژل‌های الکتروفورز دوبعدی تعداد ۶۳ لکه پروتئین تغییرات معنی‌داری از نظر فراوانی در تیمارهای ۱، ۴ و ۷ روز پس از آلودگی در مقایسه با گیاهان شاهد نشان دادند. از میان ۶۳ لکه پروتئینی معنی‌دار ۳۵ لکه پروتئینی به وسیله اسپکترومتری در پایگاه داده‌ای NCBI nr شناسایی شدند. این پروتئین‌ها در سیستم دفاعی، فتوسنتز، متابولیسم و سایر فرایندهای سلولی دخالت دارند. به نظر می‌رسد پانوزن با ایجاد تغییراتی در هموستازی میزبان به تکثیر و توسعه بیماری ادامه می‌دهد.

## واژه‌های کلیدی

آپوپلاست  
پروتئومیکس  
شانکر باکتریایی  
مرکبات

## مقدمه

گیاهان در اکوسیستم طبیعی در بر همکنش با میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها زندگی می‌کنند. برهمکنش‌های باکتری‌ها و گیاهان به سه دسته‌ی همزیستی<sup>۱</sup>، بیماری‌زایی<sup>۲</sup> و همکاری<sup>۳</sup> تقسیم می‌شود (Ryan et al. 2011). بررسی «رابطه متقابل گیاه-پاتوژن» توجهات بسیاری را از سوی دانشمندان و محافل علمی جهان به خود معطوف داشته است. این توجهات، ناشی از پررنگ شدن موضوع «امنیت غذایی جهان» از یک سو و «حفظ محیط زیست» با به‌کارگیری راهکارهای بهینه در جهت «توسعه پایدار کشاورزی» از دیگر سوی است. تولید مرکبات در جهان امروز از اهمیت بسزایی برخوردار بوده و یکی از منابع مهم ثروت، مبادلات تجاری و اشتغال به کار ساکنین حدود ۱۲۵ کشور مرکبات‌خیز جهان به شمار می‌رود. با این حال، عوامل بیماری‌زای مختلفی، کشت و کار مرکبات را تحت تاثیر قرار داده و بر تولید مرکبات در سطح ایران و جهان تاثیر می‌گذارند. بیماری شانکر آسیایی مرکبات که عامل آن *Xantomonas citri subsp. citri* می‌باشد یک از بیماری‌های مهم مرکبات می‌باشد (Gottig et al. 2010) و از نظر اقتصادی زیانبار می‌باشد که این بیماری در مرکبات ایران نیز وجود دارد (Alizadeh and Rahimian 1990). پاتوژن عامل ایجاد این بیماری به‌وسیله منافذ طبیعی و یا زخم‌های موجود در سطح گیاه، به گیاه وارد شده و پس از تکثیر سبب پاره شدن اپیدرم گیاه و خروج از میزبان می‌شود. آلودگی خود را به صورت زخم‌های فوران‌کننده بر روی برگ، میوه و شاخه‌های جوان نشان می‌دهد. بیماری در حالت توسعه یافته و شدید می‌تواند باعث ریزش برگ، ریزش پیش از موعد میوه و در حالت بسیار شدید سبب مرگ شاخه‌ها شود که از این طریق سبب کاهش شدید در میزان بازاری پسندهی محصول، کاهش حجم تولید و در نتیجه افزایش قیمت محصول شود (Garavaglia et al. 2010a).

لازمه دستیابی به افزایش عملکرد محصولات کشاورزی در واحد سطح در راستای توسعه پایدار کشاورزی، عوامل و عناصری

هستند که از آن جمله می‌توان به «کنترل و مدیریت آفات و بیماری‌های گیاهی» اشاره نمود (Graham et al. 2004). تحقق موضوع اخیر نیز زمانی وقوع عینی خواهد یافت که درک درستی از «رابطه متقابل گیاه-پاتوژن» به‌دست آمده باشد. درک چگونگی شناخت میزبان و پاتوژن از یکدیگر و تمایز میان یک «رابطه سازگار»، در مواردی که رابطه منجر به بروز بیماری می‌شود، از یک «رابطه ناسازگار»، در مواردی که رابطه منجر به بروز مقاومت یا پاسخ فوق حساسیت می‌شود، نقش اساسی در مطالعه و بررسی «رابطه متقابل گیاه-پاتوژن» دارد (Mehta and Rosato 2003; Cheng et al. 2008). تا به امروز مطالعات مختلفی در زمینه برهمکنش‌های گیاهان با عوامل بیماری‌زای گیاهی، با هدف شناسایی عوامل اصلی درگیر در این برهمکنش‌ها صورت گرفته است (Tyers and Mann 2003). در سال‌های اخیر با افزایش مطالعات ژنومی و پساژنومی، پیشرفت‌ها و دستاوردهای بیشتری در زمینه ایجاد درک بیشتر از مکانیسم‌های درگیر در برهمکنش‌های گیاه-پاتوژن حاصل شده‌است. آنچه‌که در حال حاضر به عنوان چالش اصلی در زمینه مطالعات پساژنومی مطرح بوده و مانع شناخت کامل مکانیسم‌های درگیر در این برهمکنش‌ها می‌شود، خلا ناشی از فقدان مطالعات عملکردی در ژن‌ها و پروتئین‌های مورد بررسی است. در این راستا مطالعات ژنومیکس کاربردی شامل علومی چون پروتئومیکس و ترانسکریپتومیکس به منظور شناسایی عملکرد ژن‌ها و فعالیت پروتئین‌های درگیر در این برهمکنش‌ها مورد تاکید ویژه قرار گرفته و در شناسایی ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی و یا ژن‌ها و پروتئین‌های درگیر در دفاع در سیستم‌های گیاه-پاتوژن مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Edreva 2005).

پروتئومیکس ابزار قدرتمندی برای مطالعه تغییرات فراوانی پروتئین‌هاست و در شناخت پروتئین‌هایی که مستقیماً در فرایند‌های حیاتی موجودات زنده نقش ایفا می‌کنند از اهمیت بالایی برخوردار است. این روش، برای مطالعه فرایندهای بیوشیمیایی گیاه میزبان در زمان مواجهه با عوامل بیماری‌زا استفاده شده‌است. چرا که درک درست از چگونگی پاسخ گیاه به عامل پاتوژن می‌تواند در شناخت ژن‌های جدید مقاومت و روشن ساختن مکانیسم‌های دفاعی گیاهان موثر واقع شود (Cantú et al. 2008).

<sup>1</sup> Symbiosis

<sup>2</sup> pathogenic

<sup>3</sup> mutualism

زنده مانی طولانی مدت باکتری تامین می‌کند (Garavaglia et al. 2010b). از این روی با توجه به نقش پروتئومیکس در مطالعه برهمکنش گیاه-پاتوژن، این تحقیق به منظور بررسی اثر پاتوژن شانکر باکتریایی مرکبات بر الگوی پروتئوم گیاه لیمو ترش و هم-چنین با توجه به آلودگی باغات لیموترش کشور به این بیماری و در راستای شناسایی پروتئین‌های درگیر در ایجاد حساسیت به بیماری انجام شد. هم‌چنین الگوی میزان پروتئین‌های درگیر در سیستم دفاعی میزبان در زمان‌های متفاوت آلودگی باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روش‌ها

نهال لیمو ترش (*Citrus aurantifolia*) از مناطق جنوب کشور تهیه و تحت سیکل روشنایی: تاریکی (۸:۱۶) و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور ایجاد هم‌زمانی در مرحله رشدی، تمام گیاهان یک بار هرس شده و حدود یک ماه و نیم قبل از انجام مایه‌زنی نیز به منظور فراهم نمودن برگ‌های همسن و دارای مرحله رشدی مناسب جهت انجام مایه‌زنی، هرس مجدد انجام شد. جهت انجام مایه‌زنی، برگ‌های لطیفی که حدوداً در مرحله رشدی دو سوم (۲/۳) رشد بودند مورد انتخاب قرار گرفتند. سویه ایرانی NIGEB-88 به عنوان سویه بیماری‌زای فرم  $A^*$  باکتری زانتوموناس از کلکسیون پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه شد. برای تهیه مایه تلقیح سویه مورد نظر در محیط کشت جامد YPGA در دمای ۲۸°C به مدت ۴۸ ساعت رشد داده شدند. سپس یک کلونی منفرد از کشت جامد این سویه در محیط کشت YP رشد داده شده و زمانی کشت سلولی به  $10^9$  (cfu/ml) = OD600 رسید برداشت شده و رقیق شده تا تعداد کلونی به میزان  $5 \times 10^4$  (cfu/ml) برسد (Mehta and Rosato 2003). جهت انجام مایه‌زنی تعدادی نهال مورد انتخاب قرار گرفته و سه زمان نمونه‌برداری شامل ۱، ۴، و ۷ روز پس از انجام مایه‌زنی، به عنوان تیمارهای اصلی با سه تکرار در آزمایش انتخاب شدند. از آب‌مقطر به عنوان مایه تلقیح در گیاهان شاهد استفاده شد. پس از تلقیح از برگ‌های تلقیح شده گیاهان آلوده شده و شاهد نمونه‌برداری شدند.

در این میان، مطالعات صورت گرفته در خصوص فرایندهای زیستی ناشی از مواجهه گیاهان با تنش‌های محیطی از جمله هجوم عوامل بیماری‌زا بخش قابل توجهی از مطالعات پروتئومیکس را به خود اختصاص داده که عموماً نیز مطالعات انجام یافته، معطوف به دو گیاه آرابیدوپسیس و برنج بوده است (Jorin-Novo 2014). در حوزه تنش‌های زیستی، پروتئومیکس در تشخیص برخی پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی بسیار موثر واقع شده است چرا که در یک مطالعه پس از تلقیح گیاهان لفل دریافت کننده ژن  $L3$  با سویه‌های ویروالانس (PMMoV-I) و آویروالانس (PMMoV-S) ویروس PMMoV و مقایسه نقشه پروتئینی گیاهان مزبور، توانستند گروهی از پروتئین‌های PR را شناسایی نمایند که در مقاومت گیاه به بیماری ویروسی Pepper mild motle (PMMo) نقش دارند (Elvira et al. 2008). باکتری *Xanthomonas citri subsp. citri* عامل بیماری شانکر مرکبات که دارای پروتئین PNP-like protein می‌باشد و این پروتئین که خارج سلولی بوده و در سایر باکتری‌ها وجود ندارد، به طور سیستماتیکی متحرک می‌باشد و می‌تواند پاسخ‌های مهم گیاه مانند هوموستازی و رشد را تحریک کند. قبلاً مشاهده شده است که موتانت XacPNP در مقایسه با نوع وحشی زخم‌های نکروتیک بسیاری را در برگ مرکبات ایجاد کرده است و این نشان‌دهنده نقش XacPNP در تنظیم هوموستازی میزبان است. در مطالعه‌ای تغییرات پروتئوم برگ مرکبات (*Citrus Sinensis*) در برهمکنش با باکتری زانتوموناس نوع وحشی و موتانت (Xac) مورد بررسی قرار گرفت که هر دو این باکتری باعث کاهش میزان آنزیم‌های فتوستتزی هم‌چون ریبوزومال پروتئین کلروپلاستی و افزایش میزان آنزیم‌های مربوط به به مکانیسم دفاعی شد. هر چند که باکتری موتانت باعث کاهش بیشتر پروتئین‌های فتوستتزی شد اما در مقایسه با نوع وحشی کاهش در پروتئین‌های سیستم دفاعی نداشت. این مطلب نشان می‌داد که XacPNP کارایی فتوستتزی میزبان را در زمان بیماری حفظ می‌کند. آنالیز پروتئومیکس به همراه داده‌های ترنسکریپتوم نشان از القای میزان پروتئین ATP-Syntase، NADH-dehydrogenase، رابیسکو اکتیواز و S6PDH داشت در نهایت چنین نتیجه‌گیری شد که Xac-PNP با کاهش فتوستتزی مقابله کرده و شرایط بهتری را در بافت آلوده برای

جدول ۱- پروتئین‌های شناسایی شده با MALDI-TOF/TOF.

Spot No	Accession number	Protein name	Theoretical Mr/pI	Protein score	Peptide match	Fold change		
						1dpi	4dpi	7dpi
<b>Plant defense and stress related protein</b>								
19	Cs3g12000.1	Copper/zinc superoxide dismutase	15.1/5.4	319	4	+	+	+
3	Cs3g12000.1	copper/zinc superoxide dismutase	15.2/5.4	124	3	+	+	+
47	Cs8g01810.1	Endochitinase A	28.4/4.9	138	3	+	+	-
56	Cs2g27730.1	Glutaredoxin-C6	11.2/6.1	224	4	2.87	3.4	0.65
23	Cs7g28340.1	Glutathione S-transferase DHAR2	23/6.2	677.2	13	1.6	1.8	0.54
54	Cs2g16220.1	Isoflavone reductase-like NAD(P)H-dependent oxidoreductas	34.2/6.5	656.9	14	3.4773	6.32	0.96
33	Cs5g16850.1	Kunitz-type protease inhibitor KPI-D2.2	24.1/5.5	340.2	7	1.2	6.5	2.4
29	Cs8g17370.1	L-ascorbate peroxidase 1	27.6/5.5	896.4	18	2.7	1.65	0.34
26	Cs5g16780.1	Latex serine proteinase inhibitor	25.8/9.2	434.2	8	3.16	3.61	0.54
24	Cs9g03630.1	Major allergen Pru ar 1	17.6/5.4	705.8	12	+	-	-
18	Cs5g16780.1	Latex serine proteinase inhibitor	25.2/9.2	214.9	4	+	+	-
13	Cs1g20230.2	Peroxidase 4	29.8/7.8	574.3	10	1.01	2.3	2.1
50	Cs7g08640.2	Quinone oxidoreductase-like protein	41.9/9.3	1388.6	24	+	+	-
32	Cs3g20630.1	Thioredoxin M-type	19.9/9.8	545.1	10	4.1	1.8	0.24
49	Cs2g05870.1	Pathogenesis-related leaf protein	16.9/4.9	146.1	3	-	+	-
<b>Protein metabolism</b>								
15	Cs2g27790.1	Xylem cysteine proteinase 1	38.4/5.3	349.8	7	3.6	5.5	5.4
22	Cs4g07030.2	20 kDa chaperonin	26.6/9.4	909.7	14	1.8	2.2	1.8
28	Cs4g07410.1	Thiol protease aleurain	38.6/6.5	293.2	5	1.45	2.24	1.56
52	orange1.1t01	Chaperonin CPN60-1	61.7/5.8	1957.1	38	4.6	3.6	1.2
21	Cs1g16180.1	Aspartic proteinase nepenthesin-1	45.6/7.8	355.5	4	0.83	0.61	0.6
12	Cs8g18260.1	Heat shock 70 kDa protein	70.9/5	1726.8	30	-	+	-
14	Cs6g16290.1	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha-like protein	22.3/4.2	259.2	4	1.65	-	-
57	Cs1g03040.1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3	28.8/6.7	94.3	2	2.3	1.8	1.23
<b>Metabolic process</b>								
60	Cs1g18190.1	Beta-galactosidase	47.8/6.3	406	9	2.23	5.06	4.6
27	Cs1g23450.1	Oxygen-evolving enhancer protein 1	35.4/5.7	83	17	2.5	1.2	-
34	Cs7g22860.2	Glycine cleavage system H protein	47.3/4.8	324	5	1.1	1.23	2.46
38	Cs6g15540.1	Enolase	47.8/5.5	153	25	0.6	0.8	0.54
40	Cs6g15540.1	Triose phosphate isomerase	47.8/5.5	143	27	2.67	1.34	0.34
41	Cs6g10600.1	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	61/5.6	145	27	1.1	1.3	-
45	Cs9g01670.1	Dihydrolipoyl dehydrogenase 1	53.8/7.2	73	9	1.03	2.35	1.7
59	Cs7g31800.1	Ribulose bisphosphate carboxylase/ oxygenase activase	50.2/5.2	69	20	2.3	1.8	1.1
<b>Amino acid biosynthesis</b>								
61	Cs9g05680.1	Glutamine synthetase	47.8/6.3	65	13	1.12	1.34	2.2
<b>Unclassified</b>								
30	orange1.	2-acetamido-2-deoxy-D-galactose-binding seed lectin	29.1/5	207	3	+	+	-
6	Cs3g13820.2	hypothetical protein CICLE_v10009624mg	12.8/5.5	84	3	+	+	+
9	Cs2g10930.1	hypothetical protein CICLE_v10017265mg [Citrus clementina]	55/6.2	54	4	+	+	+

\*Fold change: نسبت میزان پروتئین‌ها در مقایسه با شاهد، dpi: روز پس از آلودگی، +: الفای پروتئین، -: عدم حضور پروتئین، protein score: امتیاز محاسبه شده پروتئین بر مبنای مشابهت جرم پروتئین، peptide match: تعداد

پپتیدهای جور شده از پروتئین مورد نظر با توالی موجود در پایگاه داده‌ای.

Server انجام شد. برای به دست آوردن اطلاعات GO از پایگاه داده ای Gene ontology استفاده شد.

### نتایج و بحث

بررسی الگوی پروتئوم نشان داد که آلودگی پاتوزن به شدت پروتئوم آپوپلاستی گیاه را تحت تاثیر قرار داده است به طوری که تعداد لکه‌ها در تیمارهای یک و چهار روز پس از آلودگی افزایش و در تیمار هفت روز پس از آلودگی نسبت به شاهد، کاهش نشان داده است (شکل ۱-الف). هم‌چنین بررسی افزایش و کاهش میزان لکه‌های پروتئینی نشان می‌دهد که در تیمار یک روز پس از آلودگی ۶۰ درصد از لکه‌ها نسبت به تیمار شاهد افزایش میزان نشان می‌دهند و در تیمار چهار روز پس از آلودگی تعداد لکه‌های که افزایش میزان داشتند کاهش پیدا می‌کند به طوری که در تیمار هفت روز پس از آلودگی تعداد لکه‌هایی که کاهش میزان داشته‌اند از تعداد لکه‌هایی که افزایش میزان داشتند پیشی می‌گیرد (شکل ۲-الف). پاتوزن عامل بیماری باکتری زانتوموناس بیوتروف بوده و به نظر می‌رسد که بعد از مستقر شدن، شناسایی الگوهای مولکولی همراه با پاتوزن<sup>۱</sup> توسط گیرنده‌های گیاهی می‌تواند سبب راه اندازی سیستم‌های دفاعی در گیاه و توقف آلودگی می‌شود (Garavaglia et al. 2010b). مشخص شده‌است که اتصال تنگاتنگ باکتری *X. campestris pv. malvacea* به دیواره سلولی پنبه، حدود ۴۸ ساعت پس از انجام مایه‌زنی صورت می‌گیرد. این باکتری از نظر هیبریداسیون DNA-DNA شباهت زیادی با باکتری *X. citri* داشته و احتمال داده می‌شود که چنین اتفاقی در زمان مشابه در باکتری *X. citri* نیز وقوع یابد. از طرف دیگر *X. citri* توانایی تحریک تقسیمات سلولی پس از ۷۲ ساعت از انجام مایه‌زنی را دارد که احتمالاً این کار را توسط انتقال مولکول PthA که در انتقال سیگنال تقسیم سلولی نقش دارد و از طریق سیستم ترشحی نوع سوم منتقل می‌شود، انجام می‌دهد (Brunings and Gabriel 2003). از این رو چنین می‌شود استنباط کرد که باکتری در زمان چهار روز پس از آلودگی مکانیسم‌هایی را فعال کرده و با ترشح افکتورهایی، سیستم دفاعی و به‌ویژه پروتئین‌های گیاه را مورد حمله قرار داده و تخریب می‌کند. از طرف دیگر تولید گونه-

نمونه‌ها سریعاً در ازت مایع فریز شده و سپس برای استفاده‌های بعدی در فریزر ۸۰- نگهداری شد. به‌طور خلاصه برای استخراج عصاره آپوپلاستی ابتدا برگ‌های آلوده از گیاه تحت تیمار آلودگی باکتریایی و شاهد از روی گیاهان سالم جمع‌آوری شده و با آب-مقطر شستشو داده شد. سپس در بافر استخراج سرد غوطه ور کرده و با استفاده از پمپ خلا اینفیلتراسیون انجام شد. پس از ایجاد خلا به مدت پنج دقیقه برگ‌ها در داخل لوله فالکن قرار گرفته و در دور ۹۵۰ g سانتریفیوژ می‌شود. عصاره جمع شده در انتهای لوله عصاره آپوپلاستی حاوی پروتئین خواهد بود. تمامی مراحل در دمای چهار درجه سانتی‌گراد انجام شد. استخراج پروتئین به روش دامروال با اندکی تغییرات انجام گرفت (Damerval et al. 1986). غلظت پروتئین‌ها با استفاده از برادفورد اندازه‌گیری شد.

به‌منظور انجام الکتروفورز دوبعدی از ژل نواری خطی (IPG Strip, 18cm, PH4-7) ساخت شرکت Bio-RAD برای بعد اول استفاده شد. برای انجام بعد دوم از دستگاه الکتروفورز ProteinII XI Cell ساخت شرکت Bio-RAD استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها از نیترات نقره استفاده شد (Blum, Beier and Gross 1987). ژل‌های رنگ‌آمیزی شده توسط دنسیتومتر با وضوح dpi ۶۰۰ عکس‌برداری شدند. جهت شناسایی و همیابی نقاط متناظر بر روی ژل‌های مختلف، از نرم‌افزار Melanie6.0 استفاده شد. برای این منظور پس از باز کردن تصاویر تمام ژل‌ها در یک صفحه کاری نرم‌افزار، تنظیمات اولیه از جمله میزان تقابل رنگی تصویر و تنظیمات مرتبط با محدوده نقاط شناسایی شده انجام شد و پس از آن نقاط پروتئینی شناسایی شده توسط نرم‌افزار انتخاب و برچسب‌گذاری شدند. کمی‌سازی میزان پروتئین‌ها به صورت گزارش درصد حجمی هر لکه نسبت به کل لکه‌ها صورت گرفت. وجود و یا عدم وجود تغییرات معنی‌دار در بین تیمارهای مختلف مورد تجزیه آماری قرار داده شدند و لکه‌های کاندید جهت شناسایی با اسپکترومتری جرمی انتخاب شدند و از روی ژل جدا شدند و برای توالی‌یابی به موسسه Faraunhofer, Germany ارسال شدند.

پس از توالی‌یابی و به‌دست آوردن جرم پپتیدی، شناسایی پروتئین‌ها در پایگاه داده Matrix science و با استفاده از Mascot

<sup>1</sup> Pathogen-associated molecular pattern

پروتئین‌ها در دسته Catalytic activity و Hydrolase activity قرار دارند از طرف دیگر از لحاظ فرآیندهای بیولوژیکی بیشترین پروتئین‌ها در دسته فرایندهای متابولیکی، متابولیسم کربن و پاسخ به استرس قرار دارند. این ارتباط از این نظر قابل توجه است که پروتئین‌های که در فرایندهای متابولیکی نقش دارند دارای عملکرد مولکولی هیدرولازی و کاتالیکی هستند (Bowles 1990). هم‌چنین پروتئین‌های پاسخ دهنده به استرس‌ها نظیر PR پروتئین-ها، عملکرد مولکولی هیدرولازی دارند (Delaunoy et al. 2013).

پروتئین‌هایی که تغییرات معنی‌دار نشان داده بودند به‌وسیله MALDI-TOF شناسایی شده و در جدول دسته‌بندی شدند (جدول ۱). اکثر پروتئین‌ها در پاسخ به تنش نقش داشتند که پروتئین‌های درگیر در سمیت‌زدایی گونه‌های فعال اکسیژن، PR پروتئین‌ها و بازدارنده‌های پروتئین‌سازی در این دسته قرار می‌گیرند.

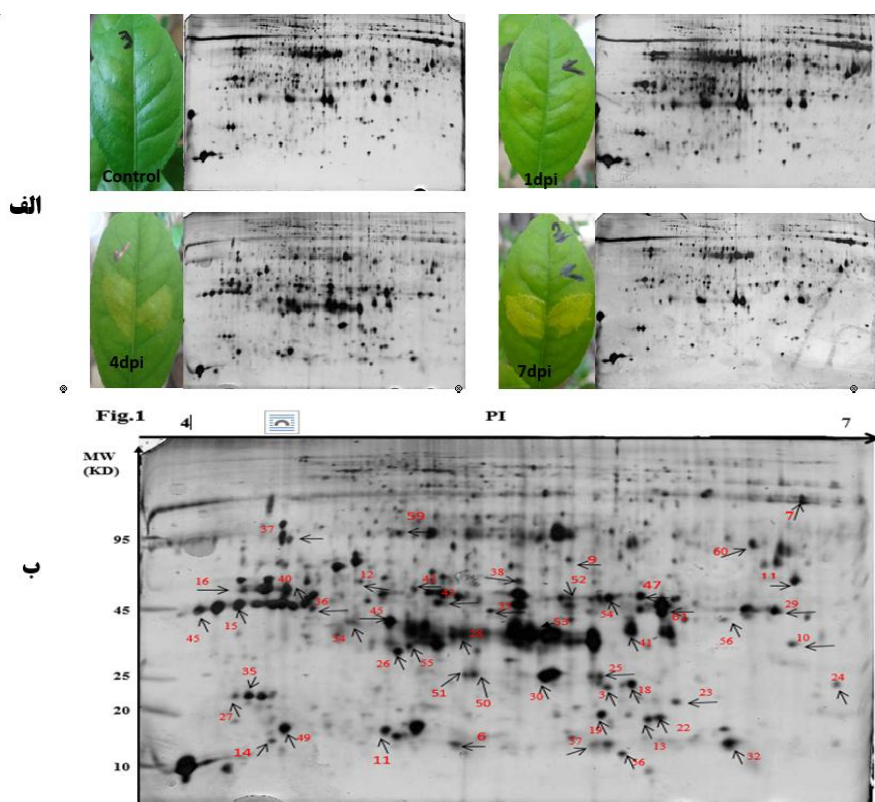
های فعال اکسیژن، یک مرحله کلیدی و اصلی در ایجاد پاسخ به پاتوژن است که با تاثیر بر ساختار دیواره سلولی، تغییر در میزان ژن‌ها و انتقال پیام به سلول‌های آلوده نشده نقش اساسی در ایجاد مقاومت به عامل بیماری‌زا را ایفا می‌کند. گونه‌های فعال اکسیژن علاوه بر نقش مثبت در دفاع و پیام‌رسانی، هم‌چنین باعث تخریب ماکرومولکول‌هایی مانند اسید نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌شوند (Chisholm et al. 2006).

پروتئین‌هایی که تغییرات معنی‌دار داشتند (شکل ۱-ب) از لحاظ عملکردی دسته‌بندی شدند که پروتئین‌های درگیر در مکانیسم‌های دفاعی با ۴۳ درصد، بیش‌ترین تعداد پروتئین‌ها را به خود اختصاص دادند (شکل ۲-ب). داده‌های GO پروتئین‌ها را در سه دسته عملکرد مولکولی<sup>۱</sup>، فرایندهای بیولوژیکی<sup>۲</sup> و اجزای سلولی<sup>۳</sup> تقسیم‌بندی کرد (شکل ۳).

<sup>1</sup> Molecular function

<sup>2</sup> Biological process

<sup>3</sup> Cellular component



شکل ۱- ژل دوبعدی تیمارهای مختلف. الف-ژل دوبعدی شاهد و روزهای پس از آلودگی. ب- لکه‌هایی که میزان افتراقی داشتند و برای شناسایی از روی ژل جدا شدند.

می‌کنند و اغلب پروتئازهای سرینی را از بین می‌برند (Laskowski Qasim and Lu 2000). با توجه به القای دیر هنگام و ضعیف این پروتئین‌ها از طرفی، و گسترش بیماری از طرف دیگر به نظر می‌رسد که افکتورهای باکتریایی در مقابله با این پروتئین‌ها، توانایی زنده مانی باکتری را حفظ کرده و باکتری‌ها توانسته‌اند در بافت گیاهی تکثیر پیدا کنند.

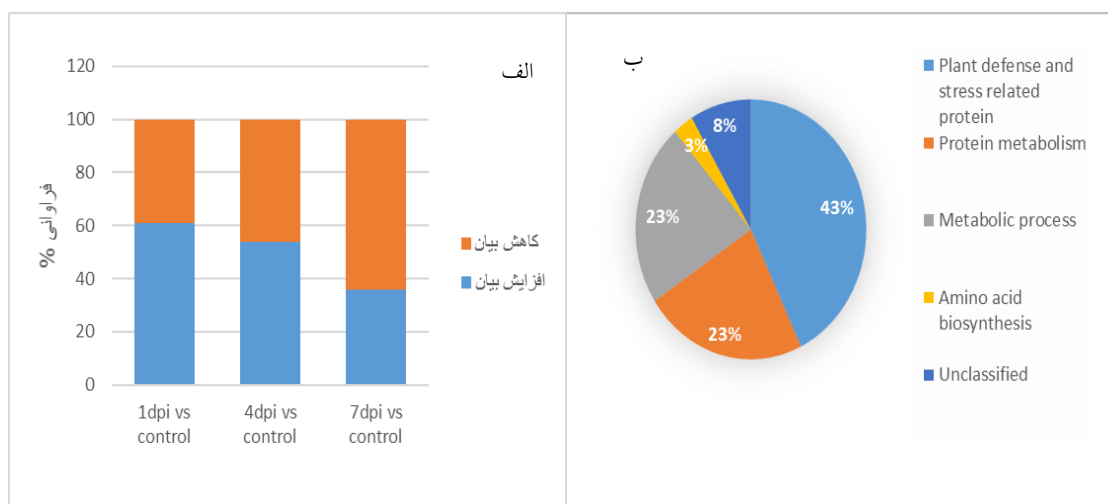
پروتئین‌هایی که در تنظیم و فولدینگ پروتئین‌ها نقش دارند نیز دچار تغییر میزان شده‌اند (جدول ۱). چاپرون‌ها (لکه ۲۲ و ۲۸)، پروتئین‌های شوک حرارتی (لکه ۱۲)، پپتیدیل ایزومراز (لکه ۵۷) و پروتئین‌ها (۱۵ و ۲۱) در این دسته قرار می‌گیرند. از مهم‌ترین پروتئین‌های این دسته چاپرون‌ها هستند. به‌طور کلی چاپرون‌ها نقش حیاتی در تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایفا می‌کنند و در فولدینگ پروتئین‌ها، سنتز و جابجایی آن‌ها و همچنین سنتز برخی ماکرومولکول‌ها نقش دارند (Hartl and Hayer-Hartl 2002). در سال‌های اخیر توجه زیادی به نقش چاپرون‌ها در سیستم ایمنی گیاه در مقابل حمله پاتوژن‌ها شده‌است (Liu and Whitham 2013). در واقع گیاهان از طریق دو سیستم ایمنی فعال شده به وسیله الگوهای مولکولی همراه پاتوژن<sup>۱</sup> و سیستم ایمنی فعال شده از طریق افکتور<sup>۲</sup> پروتئین‌ها به پاتوژن پاسخ می‌دهند. سیستم ایمنی فعال شده از طریق افکتور پروتئین‌ها، به‌وسیله پروتئین‌های مقاومت (R proteins) به پاتوژن‌ها پاسخ می‌دهند. گزارش شده- است که پروتئین HSP90 دارای دامین‌های متصل شونده به نوکلئوتید می‌باشد و می‌تواند به دامین‌های پروتئین‌های مقاومت متصل شود و پایداری پروتئین‌های مقاومت را موجب شود و از این طریق به شناسایی افکتورهای بیماری‌زایی پاتوژن کمک کند (Kadota and Shirasu 2012). همچنین گزارش شده‌است که HSP90 به‌طور مستقیم و فیزیکی می‌تواند به ژن‌های RPM1 (ژن مقاومت به باکتری سودوموناس) بچسبد (Hartl and Hayer-Hartl 2002). به‌نظر می‌رسد این پروتئین‌ها با کمک به پایداری پروتئین‌های مقاومت در شناسایی افکتورهای باکتریایی نقش مثبت و مؤثری در ایجاد مقاومت به پاتوژن‌ها ایفا می‌کنند.

گونه‌های فعال اکسیژن دارای نقش دوگانه در گیاهان هستند این مولکول‌ها در غلظت‌های کم نقش مخربی در گیاه نداشته و منجر به القای پیام‌رسانی و تمایز دیواره سلولی، القای متابولیسم ثانویه و همچنین در ایجاد پاسخ فوق حساسیت نقش دارند (Kotchoni and Gachomo 2006). اما در غلظت‌های زیاد که ناشی از القای پاتوژن می‌باشد گونه فعال اکسیژن برای گیاه مضر بوده لذا گیاه با درک این خطر مکانیسم استفاده از آنتی اکسیدانت‌ها را فعال می‌کند. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت در بسیاری از گیاهان در مقابل پاتوژن دیده شده‌است (Agüero et al. 2008). پرواضح است که گونه‌های فعال اکسیژن برای پاتوژن سمی می‌باشد اما پاتوژن‌ها به‌دلیل وجود پلی ساکاریدهای خارج سلولی نسبت به گونه‌های فعال اکسیژن مقاوم می‌باشند (Dahal et al. 2010). از طرفی گیاهان با استفاده از احیا کننده‌هایی نظیر گلوکاتایون ریداکتاز و آنزیم‌های آنتی اکسیدانت باعث از بین رفتن گونه‌های فعال اکسیژن شده و محیط را برای رشد باکتری و ایجاد بیماری مساعدتر می‌سازند.

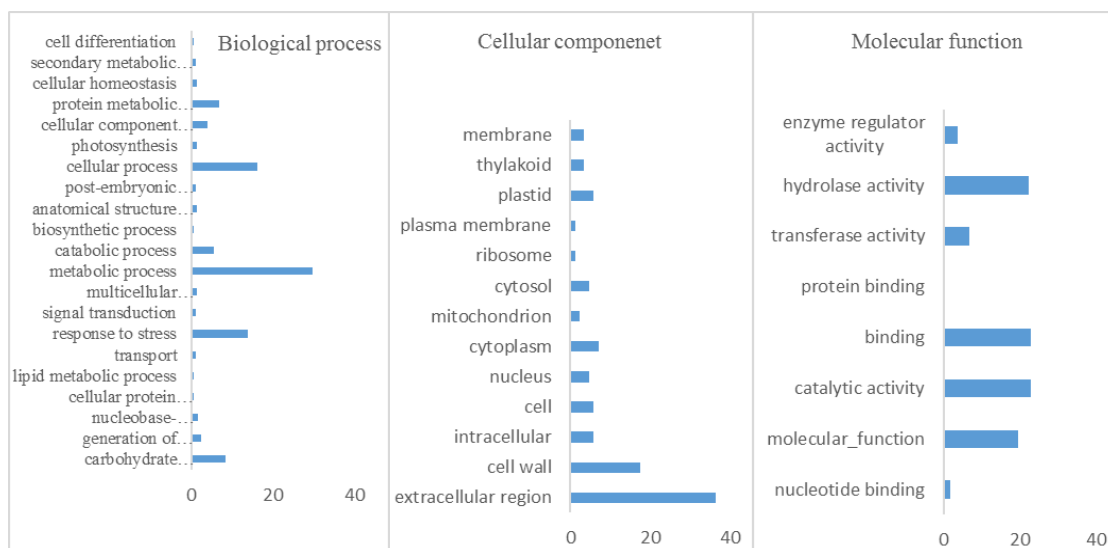
کیتیناز (لکه ۴۷)، PR پروتئین (لکه ۴۹) و بازدارنده‌های پروتئینازی (لکه ۴۸ و ۳۳) از پروتئین‌هایی هستند که در مقاومت به پاتوژن نقش دارند. کیتیناز در تیمار یک روز پس از آلودگی افزایش نشان داده و بعد از آن دچار کاهش شده‌است. همچنین بقیه پروتئین‌ها افزایش جزئی در تیمار چهار روز پس از آلودگی افزایش میزان نشان دادند و بعد از آن کاهش میزان نشان می‌دهند (جدول ۱-). بدیهی است که پروتئین‌های مرتبط با تحمل بیماری پس از اینکه افکتور پروتئین‌ها از باکتری ترشح شدند در پاسخ به پاتوژن القا می‌شوند. کیتیناز از پروتئین‌هایی است که بیان افتراقی آن در پاسخ به تنش‌های زنده و غیر زنده در بسیاری از مطالعات گزارش شده‌است (Afroz et al. 2011; Cantú et al. 2008). کیتینازها در تخریب دیواره سلولی باکتری و همچنین تولید گونه-های فعال اکسیژن به‌واسطه تولید اولیگومر کیتین نقش دارند (Delaunoy et al. 2013). القای کیتیناز در تنباکو بر علیه باکتری سودوموناس و همچنین در گیاه کلزا بر ضد پاتوژن قارچی گزارش شده‌است (Floerl et al. 2008 Petriccionea et al. 2014). بازدارنده‌های پروتئینازی بر علیه پروتئین‌های پاتوژن عمل

<sup>1</sup> PAMP-triggered immunity

<sup>2</sup> Effector triggered immunity



شکل ۲- درصد فراوانی لکه‌ها و پروتئین‌ها. الف- نمودار افزایش و کاهش بیان لکه‌ها در تیمارهای مختلف آلودگی نسبت به شاهد. ب- دسته‌بندی عملکردی پروتئین‌ها



شکل ۳- نمودار فراوانی پروتئین‌های شناسایی شده بر اساس داده‌های GO پروتئین‌ها در سه گروه عملکرد مولکولی، اجزای سلولی و فرآیند بیولوژیکی تقسیم‌بندی شدند.

دسته دیگری از پروتئین‌ها که دچار تغییر میزان یا القا شده‌اند مربوط به متابولیسم گیاه می‌باشند (جدول ۱). پروتئین‌های نظیر رایبوسکو اکتیواز (لکه ۵۹)، تریوز فسفات ایزومراز (لکه ۴۰)، بتاگالاکتوزیداز (لکه ۶۰)، گلايسین دکربوکسیلاز (لکه ۳۴)، انولاز (لکه ۳۸) و پروتئین OEE (لکه ۲۷) در این دسته‌بندی قرار می‌گیرند. بررسی روابط گیاه-پاتوژن نشان می‌دهد که پاتوژن به دنبال غلبه بر سیستم مکانیسم دفاعی گیاه می‌باشد و از آن طرف گیاه هم به دنبال غلبه بر پاتوژن و متوقف کردن توسعه بیماری می‌باشد که این امر را با ایجاد یک ذخیره انرژی و گسیل آن به سمت سیستم

دفاعی امکان‌پذیر می‌کند و همین مسئله متابولیسم اولیه گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Bolton 2009). در دسترس بودن مواد مورد نیاز برای متابولیسم پاتوژن می‌تواند نتیجه نشت سلولی میزبان و یا دستکاری متابولیسم گیاه به وسیله پاتوژن باشد (Walters and Heil 2007). در واقع کاهش فتوسنتز در بسیاری از تقابل گیاه و پاتوژن گزارش شده است که البته این فرایند می‌تواند در نتیجه کاهش نسبی محتوی کلروفیل و تخریب پروتئین‌های مربوطه در اثر فعالیت پروتئاز پاتوژن‌ها و فعالیت اکسیداتیوی گونه‌های فعال اکسیژن باشد. هر چند که تمایل خود گیاه، تغییر



علائم بیماری شانکر، به تدریج کاهش یافته است. به نظر می‌رسد هم‌زمان با توسعه بیماری افکتورهای باکتری الگوی پروتئوم را، با تخریب پروتئازی پروتئین‌های میزبان، تحت تاثیر قرار داده‌است. انفجار اکسیداتیو به محض درک علائم پاتوژن توسط گیرنده‌های غشایی سلول گیاهی اتفاق می‌افتد که باعث راه‌اندازی مکانیسم پاسخ آنتی‌اکسیداتی برای سمیت زدایی گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. القای زود هنگام آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتی به‌همراه القای ضعیف و دیر هنگام پروتئین‌های مقاومت و بازدارنده‌های پروتئازی، شرایط را برای رشد و توسعه باکتری، با حذف سمیت گونه‌های فعال اکسیژن برضد باکتری، مهیا می‌سازد و گیاه را در شرایط سختی از نظر دفاعی قرار می‌دهد. افزایش میزان پروتئین‌های در گیر در فتوستتز به‌همراه کاهش میزان پروتئین‌های مرتبط با انرژی نشان از دستکاری سیستم هموستازی گیاه به‌وسیله پاتوژن، با استفاده از پروتئین‌های شبه گیاهی، در راستای استفاده بهینه از مواد غذایی موجود در آپوپلاست دارد. کاهش میزان پروتئین‌های درگیر در مسیر انرژی‌زایی گیاه را برای القای سیستم دفاعی از نظر میزان انرژی در تنگنا قرار می‌دهد. به‌طور کلی پاتوژن با ترشح افکتور پروتئین‌ها با دستکاری سیستم گیاهی از طرفی، و واکنش متقابل با پروتئین‌های حساسیت از طرف دیگر، رشد خود و توسعه بیماری را گسترش می‌دهد.

متابولیسم از فتوستتز به‌سمت فراهم کردن انرژی مورد نیاز سیستم دفاعی آن‌هم به خاطر مصرف زیاد انرژی توسط سیستم دفاعی باشد (Gottig et al. 2010). در این آزمایش القای پروتئین‌های مرتبط با فتوستتز و افزایش میزان آن‌ها بر خلاف گزارشات مرسوم می‌باشد. با توالی‌یابی ژنوم باکتری زانتوموناس معلوم شده است که این باکتری از یک پروتئین شبه گیاهی برای تاثیرگذاری در هموستازی میزبان استفاده می‌کند (Nembaware et al. 2004). در یک مطالعه تجزیه پروتئومیکس به‌همراه داده‌های ترنسکریپتوم نشان از القای میزان پروتئین ATP-NADH-dehydrogenase, Synthase و رایبوسکو اکتیواز داشت و در نهایت چنین نتیجه‌گیری شد که پروتئین‌های شبه گیاهی زانتوموناس با کاهش فتوستتز مقابله کرده و شرایط بهتری را در بافت آلوده برای زنده ماندن طولانی مدت باکتری تامین می‌کند (Garavaglia et al. 2010b). به‌نظر می‌رسد پاتوژن با دستکاری سیستم هموستازی گیاه و با القای پروتئین‌های مرتبط با فتوستتز، شرایط را برای رشد و تغذیه بهتر خود فراهم کرده و از طرفی تخصیص انرژی برای پاسخ دفاعی را کاهش می‌دهد.

### نتیجه‌گیری کلی

الگوی پروتئوم آپوپلاستی گیاه لیمو ترش به‌شدت تحت تاثیر آلودگی پاتوژن قرار گرفته است به طوری که تعداد لکه‌ها در فاز ابتدایی آلودگی افزایش و پس از استقرار کامل پاتوژن و ظهور

### منابع

Afroz A, GM Ali, A Mir and S Komatsu (2011) Application of proteomics to investigate stress-induced proteins for improvement in crop protection. *Plant cell reports*, 30: 745-763.  
 Agüero CB, ET Thorne, AM Ibanez, WD Gubler and A M Dandekar (2008) Xylem sap proteins from *Vitis vinifera* L. Chardonnay. *American journal of enology and viticulture*.  
 Alizadeh A and H Rahimian (1990) Citrus canker in Kerman Province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 26.  
 Bindschedler LV, J Dewdney, KA Blee, JM Stone, T Asai, J Plotnikov, C Denoux, T Hayes, C Gerrish and DR Davies (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, 47: 851-863.  
 Blum H, H Beier and HJ Gross (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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 487-497.  
 Bolwell GP, LV Bindschedler, KA Blee, VS Butt, DR Davies, SL Gardner, C Gerrish and F Minibayeva (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1367-1376.  
 Bowles DJ (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Annual review of biochemistry*, 59: 873-907.  
 Brunings AM and DW Gabriel (2003) *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology*, 4: 141-157.  
 Cantú M, A Mariano, MS Palma, E Carrilho and N Wulff (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.

- Cheng F-y, K Blackburn, Y-m Lin, MB Goshe and JD Williamson (2008) Absolute protein quantification by LC/MSE for global analysis of salicylic acid-induced plant protein secretion responses. *Journal of proteome research*, 8: 82-93.
- Chisholm ST, G Coaker, B Day and BJ Staskawicz (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124: 803-814.
- Dahal D, A Pich, HP Braun and K Wydra (2010) Analysis of cell wall proteins regulated in stem of susceptible and resistant tomato species after inoculation with *Ralstonia solanacearum*: a proteomic approach. *Plant molecular biology*, 73: 643-658.
- Damerval C, D De Vienne, M Zivy and H Thiellement (1986) Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 7: 52-54.
- Delaunoy B, T Colby, N Belloy, A Conreux, A Harzen, F Baillieul, C Clément, J Schmidt, P Jeandet and S Cordelier (2013) Large-scale proteomic analysis of the grapevine leaf apoplastic fluid reveals mainly stress-related proteins and cell wall modifying enzymes. *BMC plant biology*, 13: 1.
- Edreva A (2005) Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. *Gen Appl Plant Physiol*, 31: 105-124.
- Elvira MI, MM Galdeano, P Gilardi, I García-Luque and MT Serra (2008) Proteomic analysis of pathogenesis-related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. *Journal of Experimental Botany*, 59: 1253-1265.
- Floerl S, C Druebert, A Majcherczyk, P Karlovsky, U Kües and A Polle (2008) Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology*, 8: 1.
- Garavaglia BS, L Thomas, N Gottig, G Dunger, CG Garofalo, LD Daurelio, B Ndimba, EG Orellano, C Gehring and J Ottado (2010a) A eukaryotic-acquired gene by a biotrophic phytopathogen allows prolonged survival on the host by counteracting the shut-down of plant photosynthesis. *PLoS One*, 5: e8950.
- Garavaglia BS, L Thomas, T Zimaro, N Gottig, LD Daurelio, B Ndimba, EG Orellano, J Ottado and C Gehring (2010b) A plant natriuretic peptide-like molecule of the pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* causes rapid changes in the proteome of its citrus host. *BMC plant biology*, 10: 51.
- Gottig N, B Garavaglia, C Garofalo, T Zimaro, G Sgro, F Ficarra, G Dunger, L Daurelio, L Thomas and C Gehring (2010) Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 196-204.
- Graham JH, TR Gottwald, J Cubero and DS Achor (2004) *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker. *Molecular Plant Pathology*, 5: 1-15.
- Hartl FU and M Hayer-Hartl (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295: 1852-1858.
- Jorin-Novo JV (2014) Plant proteomics methods and protocols. *Plant Proteomics: Methods and Protocols*, 3-13.
- Kadota Y and K Shirasu (2012) The HSP90 complex of plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1823: 689-697.
- Kotchoni SO and EW Gachomo (2006) The reactive oxygen species network pathways: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and the acquired disease resistance in plants. *Journal of biosciences*, 31: 389-40.
- Laskowski M, M Qasim and S Lu (2000) Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with serine proteinases. *Protein-protein recognition*, 228-279.
- Liu JZ and SA Whitham (2013) Overexpression of a soybean nuclear localized type-III DnaJ domain-containing HSP40 reveals its roles in cell death and disease resistance. *The Plant Journal*, 74: 110-121.
- Mehta A and YB Rosato (2003) A simple method for in vivo expression studies of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Current microbiology*, 47: 400-403.
- Nembaware V, C Seoighe, M Sayed and C Gehring (2004) A plant natriuretic peptide-like gene in the bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* may induce hyper-hydration in the plant host: a hypothesis of molecular mimicry. *BMC evolutionary biology*, 4: 10.
- Petriccionea M, AMS, IDC, A Scaloni and MS (2014) Proteomic analysis of the *Actinidia deliciosa* leaf apoplast during biotrophic colonization by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *JO URNAL OF P ROTE OMICS*, 101: 43-62.
- Ryan RP, F-J Vorhölter, N Potnis, JB Jones, M-A Van Sluys, AJ Bogdanove and JM Dow (2011) Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium-plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 9: 344-355.
- Tyers M and M Mann (2003) From genomics to proteomics. *Nature*, 422: 193-197.
- Walters D and M Heil (2007) Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71: 3-17.