ژنتیک نوین
دوره چهارم، شماره ٤، زمستان ١٣٨٨
صفحه٢٦-٥

بررسی روند تغییر بیان ژن‌های یونجه یکساله در پاسخ به باکتری *Ralestonia solanacearum*

احد یامچی[1]، سیدرضا زارعی[2]، آقافخر میرلوحی[3]، Laurent Gentzbittel4[4]،
بدرالدین‌ابراهیم سیدطباطبایی[5]، کتایون امیدی[6]

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه صنعتی اصفهان و دانشگاه INP-Toulouse فرانسه
۲و۵- به‌ترتیب استادیار و دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۳- استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان
۴- استاد دانشگاه INP-Toulouse فرانسه
۶- کارشناسی ارشد دانشگاه Toulouse-III فرانسه
*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mirlohi@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: - تاریخ پذیرش:)

چکیده

خانواده بقولات از لحاظ تغذیه انسان‌ها و جانوران جز گیاهان مهم زراعی هستند که قادرند با باکتری تثبیت کننده ازت در خاک و همچنین قارچ‌های میکوریزا همزیستی داشته باشند. باکتری *Ralstonia solanacearum* باکتری خاکزی است که از طریق ریشه به بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی از جمله تعدادی از بقولات حمله کرده و باعث مسدود شدن آوندهای گیاهی از یک طرف و از طرف دیگر هضم پروتئین‌ها و آنزیم‌های کلیدی سلول گیاهی از طریق سیستم ترشحی بیماریزایی نوع سوم می‌شود که نتیجه آن پژمردگی و از بین رفتن گیاهان است. در این تحقیق از گیاهان مقاوم و حساس *Medicago truncatula* به عنوان گیاه مدل جهت مطالعه تغییر بیان ژن‌ها بر علیه باکتری *R. solanacearum* استفاده گردید. مطالعات پروتئومیکس و ترانسکریپتومیکس نشان داد که بیان دو گروه از ژن‌ها در هر دو نوع گیاهان حساس و مقاوم افزایش می‌یابد. گروه اول شامل ژن‌هایی که محصول آنها بصورت مستقیم با پاتوژن واکنش می‌دهد مانند پروتئین‌های PI، PR و پراکسیداز و گروه دوم شامل ژن‌هایی که محصول آنها بعنوان فاکتورهای رونویسی یا پروتئین‌های شرکت کننده در مسیر انتقال پیام و یا به عنوان چیرون در تعیین شکل فضایی پروتئین‌های دیگر دخالت می‌کنند مانند پروتئین‌های HSP90 و peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPI). مطالعات ترانسکریپتومیکس نشان داد که افزایش بیان ژن‌ها در گیاهان مقاوم پایدار ولی در گیاهان حساس ناپایدار است به این ترتیب که بیان ژن‌ها در یک روز پس از تلقیح با باکتری در هر دو نوع گیاهان حساس و مقاوم افزایش یافت ولی در ادامه و سه روز پس از تلقیح با باکتری بیان ژن‌ها در گیاهان حساس کاهش یافته ولی در گیاهان مقاوم ثابت ویا حتی افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی

***Ralstonia solanacearum*، *Medicago truncatula*، پروتئومیکس، ترانسکریپتومیکس، ژن**

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

مقدمه

بسياري از گياهان خانواده لگوم مانند يونجه داراي ژنوم بزرگ ويلي پلوئيد و همچنين محتوي DNA تكراري زياد و سيستم گرده افشاني باز (دگرگرده افشان) هستند. به اين دلايل استفاده از اين گياهان در تشريح بيولوژي خانواده لگوم دشوار است (۱). در دهه‌هاي اخير، استفاده از گياه *Medicago truncatula* به عنوان گياه مدل براي مطالعات ژنتيكي خانواده لگوم مورد توجه قرار گرفته است. دلايل انتخاب اين گياه به عنوان مدل، شامل ژنوم ديپلوئيد كوچک، طبيعت خودگرده افشان، دوره كوتاه تجديد نسل و همچنين قابليت توليد و تكثير آسان از طريق كشت بافت است (۳،۲). علاوه بر اين، وجود نقشه ژنتيكي و تعيين توالي اكثر ژنوم (خصوصا تعيين توالي نواحي اشباع از ژن) و وجود تعداد فراوان ESTs[1] براي اين گياه از دلايل ديگر انتخاب آن به عنوان مدل براي خانواده لگوم مي‌باشد (۵،۴).

بيماري پژمردگي باكتريايي حاصل از پاتوژن خاكزي *Ralstonia solanacearum* شايع در مناطق استوايي، نيمه استوايي و ديگر نواحي گرم، كشت بيش از۲۰۰ گونه گياهي شامل بسياري از گياهان زراعي را محدود و با مشكل مواجه كرده است (۶). در گياه گوجه فرنگي، مقاومت بر عليه اين پاتوژن بصورت چند ژني گزارش شده است (۷) و در گياه آرابيدوپسيس تاليانا يک تک ژن مقاومت به اين پاتوژن را كنترل مي‌كند (۸). در گياه *M. truncatula* از مطالعات برروي جمعيت لاين‌هاي اينبرد نوتركيب[2] حاصل از تلاقي بين دو والد حساس (A17) و مقاوم (F8300.5)، يک QTL بزرگ اثر بر روي كروموزوم شماره ۵ كه به ميزان ۳۸/۵% از تغييرات فنوتيپي مقاومت به پاتوژن *R. solanacearum* را توجيه مي‌كرد گزارش شده است (۹).همچنين دو QTL كوچک اثر مرتبط با مقاومت به همين پاتوژن باكتريايي بر روي كروموزوم‌هاي شماره ۳ و۷ نيز گزارش شده است (۹). اين QTL ها تعيين توالي نشده و ژن مقاومت بر عليه باكتري شناخته نشده است. همچنين تاكنون اطلاعاتي در مورد ژن‌هاي پايين دست ژن مقاومت و مكانيزم مقاومت برعليه اين پاتوژن در گياه *M. truncatula* گزارش نشده است.

اخيرا بكارگيري تكنيک‌هاي ترانسكريپتوميكس و پروتئوميكس باعث شده است كه محققين بتوانند مكانيزم‌هاي دفاعي را در گياهان حساس و مقاوم بطور همزمان بررسي نمايند. مقايسه الگوي ترانسكريپتوم گياه تنباكو برعليه سويه‌هاي بيماريزا و غيربيماريزاي *R. solanacearum* با گياهان كنترل از طريق DD-RT-PCR نشان داد كه بيان برخي از ژن‌هاي دفاعي وهمچنين ژن‌هاي وابسته به مسير انتقال پيام بطور اختصاصي برعليه سويه‌هاي بيماريزا و غيربيماريزا تغيير يافتند (۱۰).

تاكنون دو مطالعه برروي پاسخ گياهان نسبت به پاتوژن *R. solanacearum* از طريق پروتئوميكس انجام شده است. مطالعه اول كه توسط افروز و همكاران در سال (۲۰۰۹) انجام گرفته و نشان دادند كه بيان برخي از پروتئين‌هاي چپروني[3] و همچنين آنتي ژن غشايي[4] در بافت برگي گياه گوجه‌فرنگي مقاوم به پاتوژن *R. solanacearum* افزايش معني‌داري داشتند درصورتي كه اين پروتئين‌ها در گياه حساس گوجه‌فرنگي نسبت به *R. solanacearum* تغيير بيان معني‌داري نداشتند (۱۱). از طرفي ديگر، داهال و همكاران (۲۰۰۹) با مقايسه الگوي پروتئيني بافت ساقه گياهان حساس و مقاوم گوجه‌فرنگي برعليه *R. solanacearum* نشان دادند كه پاسخ‌هاي دفاعي درهردوي گياهان حساس و مقاوم در بافت‌هاي آوندي نسبت به پاتوژن اتفاق مي‌افتد و اختلاف بين گياهان حساس ومقاوم در زمان و ميزان بيان پروتئين‌هاي دفاعي مي‌باشد. يعني زمان بيان اين پروتئين‌ها در گياهان مقاوم سريعتر از گياهان حساس مي‌باشد و همچنين ميزان بيان آنها در گياهان مقاوم بيشتر از گياهان حساس است (۱۲).

در مطالعه دوم برروي گياه *M. truncatula* نسبت پاتوژن قارچي *Aphanomyces euteiches* (۱۳) و همچنين پارازيت *Orobanche crenata* (١٤) ميزان پروتئين دفاعي PR10، پروتئين‌هاي فعال در

---

[1] -Express sequence tags

[2] - Recombinant inbred lines

[3] - Chaperones

[4] -Membrane antigen

مسیرهاي اکسیداسیون و احیا مثل گلوتاتیون- S- ترانسفراز و انتقال پیام مثل cyclophilin افزایش بیان داشتند.

بنابراین گیاهان حساس قادر هستند برخي از پاسخ‌هاي دفاعي را نسبت به پاتوژن‌هاي بیماریزا از خود نشان دهند ولي اکثر مطالعات بر روي واکنش گیاهان مقاوم نسبت به پاتوژن‌ها صورت گرفته است و تا کنون پژوهشي در ارتباط با عکس العمل گیاهان حساس نسبت به پاتوژن‌ها گزارش نشده است.در پژوهش حاضر، جهت بررسي تغییر بیان ژن‌ها در سطح پروتئین و mRNA از طریق مطالعات پروتئومیکس و ترانسکریپتومیکس در بافت ریشه گیاه مقاوم و همچنین حساس *M. truncatula* بر علیه باکتري بیماریزاي *R. solanacearum* آزمایشاتي صورت گرفت. بدین منظور محیط کشت مایعي طراحي شد که مقدار زیادي بافت ریشه براي مطالعات بعدي ترانسکریپتوم و پروتئوم تولید مي‌کرد. پروتئین‌هایي با بیان متفاوت در بافت ریشه گیاهان حساس و مقاوم پس از تلقیح با باکتري نسبت به گیاهان کنترل از طریق الکتروفورز در ژل‌هاي دو بعدي و همچنین طیف سنجي جرمي شناسایي شدند. سپس تغییر بیان ژن‌هاي تولید کننده این پروتئین‌ها در سطح mRNA مورد بررسي قرارگرفتند. ما نشان دادیم که تعدادي از ژن‌هاي دفاعي و همچنین ژن‌هاي مسیر انتقال پیام در گیاه *M. truncatula* برعلیه پاتوژن *R. solanacearum* مداخله مي‌کنند.

مواد و روش‌ها

- مواد گیاهي و شرایط رشد:

مواد گیاهي شامل جمعیت RILs (نسل F_9) حاصل از تلاقي بین والد A17 (به عنوان والد حساس به باکتري بیماریزایي *R. solanacearum*) و والد F83005.5 (به عنوان والد مقاوم به باکتري بیماریزایي *R. solanacearum*) بود. این جمعیت گیاهي در موسسه تحقیقاتي INRA و دانشگاه INP-ENSAT واقع در فرانسه تهیه شده است (۹). از حدود ۱۳۰ لینه نسل F_9 جمعیت RILs پس از تلقیح با باکتري، ۲۰ لینه شامل ۱۰ لینه مقاوم و ۱۰ لینه حساس به باکتري بیماریزا براساس آزمایشات مورفولوژیک (علائم ظاهري) انتخاب شدند. علایم بیماري توسط وایلو و همکاران (۲۰۰۷) از ۱ تا ۴ شماره گذاري شدند (۹). در این فرایند، ابتدا برگ‌ها به دورخودشان مي‌پیچند (شاخص ۱)، سپس دمبرگ‌ها به پایین خم مي‌شوند (شاخص ۲)، در ادامه توسعه بیماري برگ‌ها زرد مي‌شوند (شاخص ۳) و در نهایت کل گیاه از بین رفته و خشک مي‌شود (شاخص ۴). درکل ۹۶۰ بذر شامل ۴۸ بذر براي هر لینه و در نتیجه ۴۸۰ بذر براي لینه‌هاي حساس و ۴۸۰ بذر براي لینه‌هاي مقاوم استفاده گردید. براي شکستن خواب بذرها سطح آنها با استفاده از کاغذ سمباده تیمار گردید و در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۲ درصد به مدت ۱/۵ دقیقه ضد عفوني شدند. پس از ۷ بار آب‌شویي بذرها به مدت یک ساعت در آب استریل غوطه‌ور شدند. سپس بذرها را در سطح آگار ۰.۸(w/v) درصد ظروف پیتري پخش کرده و براي جوانه زني به مدت ۳ روز در ۴ درجه سانتي گراد و سپس ۲ روز در ۱۴ درجه سانتي گراد در محیط تاریک قرار داده شدند. بذرهاي جوانه زده از ظروف پتري آگاردار به محیط کشت مایع فارائوس (۱۵) به مدت۱۰ روز در شرایط ۱۶ ساعت روشنایي در ۲۳ درجه و ۸ ساعت تاریکي در ۲۰ درجه سانتي گراد و شدت نور ۱۷۰ μ mol m^{-2} s^{-1} منتقل شدند.

مراحل تلقیح گیاهان با باکتري بیماریزا:

مراحل تلقیح گیاهان بر اساس روش وایلو و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد (۹). گیاهچه‌هاي هر دو گروه حساس و مقاوم پس از ۱۰ روز رشد در محیط کشت مایع فارائوس از قسمت انتهایي ریشه زخم و با باکتري بیماریزاي *R. solanacearum* نژاد GMI1000 با غلظت ۱۰^8 کلوني باکتري در یک میلي لیتر آب استریل به مدت ۳۰ دقیقه تلقیح شدند. سپس گیاهان از محیط تلقیح به مدت ۱۰ دقیقه به آب استریل منتقل و به دنبال آن مجددا به محیط کشت مایع فارائوس در شرایط ۱۲ ساعت روشنایي و ۱۲ ساعت تاریکي و دماي ۲۸ درجه سانتي گراد با شدت نور ۱۰۰ μ mol m^{-2} s^{-1} منتقل شدند. گیاهان کنترل همانند گیاهان بالا ولي با حذف باکتري از مایع تلقیح تیمار شدند. نمونه‌برداري از ریشه گیاهان در یک و سه روز پس از تلقیح انجام گردید. جهت حذف اختلافات زمینه ژنتیکي گیاهان حاصل از جمعیت RILs،

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

بافت‌هاي ۱۰ لينه مقاوم با هم و ۱۰ لينه حساس با هم (و به طور جداگانه براي هر گروه) مخلوط شدند. نمونه‌برداري از گياهان در ۳ تکرار بيولوژيک انجام گرديد.

استخراج پروتئين و تعيين کميت آن:

استخراج پروتئين از نمونه‌ها بر اساس روش دامروال وهمکاران (۱۹۸۶) انجام شد (۱۶). بر اين اساس حدود ۲۰۰ ميلي گرم از بافت ريشه به کمک نيتروژن مايع در هاون چيني پودر شد و به آن يک ميلي ليتر محلول استن سرد حاوي ۱۰% TCA و ۰/۷ درصد مرکاپتواتانل اضافه گرديد و در ۰۲- درجه سانتي گراد به مدت يک شبانه روز قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها در ×g ۲۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقيقه و در ۴ درجه سانتي گراد سانتريفوژ شدند. روشناور نمونه‌ها حذف و پليت حاصل بوسيله استن سرد حاوي ۰/۷ درصد مرکاپتواتانل و يک ميلي مولار PMSF شستشو شدند. پليت‌هاي نهايي در فريزر ۸۰- درجه سانتي گراد براي آزمايشات بعدي نگهداري شدند.

در مرحله بعد از هر نمونه ۱۰ ميلي گرم برداشته و به روي آن ۳۰۰-۳۵۰ ميکروليتر محلول (2% SDS, 30 mM Tris-Cl pH 8.5, 60 Mm DTT) اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقيقه در ۱۰۰ درجه سانتي گراد حرارت داده تا پليت حل شود. محلول حاصل در ×g ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقيقه سانتريفوژ شده و ۲۰۰ ميکروليتر از روشناور حاوي پروتئين به تيوب ۱/۵ ميلي ليتر تازه منتقل شد. براي حذف SDS باقيمانده در محلول پروتئين از کيت 2D clean up (Amersham Bioscience) استفاده شد و پروتئين موجود در محلول براساس دستورالعمل کيت رسوب داده شد. پليت نهايي حاوي پروتئين خالص شده در ۳۳۰ ميکروليتر بافر ليزکننده (7M urea, 2M thio urea, 4%(w/v) CHAPS, 0.7% ASB14, 1% (v/v) carrier ampholytes pH 3-10, 65mM DTT, a trace of bromophenol blue) حل شد. براي حل کردن پليت در بافر ليزکننده، نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقيقه در ۳۰ درجه سانتي گراد در ۱۵۰ دور در دقيقه تکان داده شدند. سپس نمونه‌ها در ×g ۲۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقيقه سانتريفوژ شدند و ۳۰۰ ميکروليتر از روشناور حاوي پروتئين محلول به ويال تازه منتقل شده و در ۲۰- درجه سانتي گراد نگهداري گرديد. براي سنجش مقدار پروتئين از کيت 2-D Quant kit (Amersham Bioscience) براساس دستورالعمل کيت استفاده گرديد.

الکتروفورز دوبعدي و رنگ آميزي ژل:

نوارهاي خشک IPG (18 cm 3-10 NL, Immobline dry strip, Bio-Rad) در ۳۰۰ ميکروليتر بافر ليزکننده، حاوي يک ميلي گرم پروتئين در دستگاه IPGphor (Amersham Bioscience) در ۲۰ درجه سانتي گراد بدون جريان الکتريکي (passive form) به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. سپس دستگاه فعال شده (active form) و با ۵۰ ولت در ۲۰ درجه سانتي گراد به مدت ۱۲ ساعت عمل rehydration ادامه پيدا کرد. سپس براي تثبيت لکه‌هاي پروتئين (focusing) از برنامه زير در دستگاه IPGphor استفاده شد: ۳۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت، ۵۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت، ۱۰۰۰ ولت به مدت ۲ ساعت و افزايش تدريجي ولتاژ تا ۸۰۰۰ ولت در عرض ۵ ساعت و نهايتا در ۸۰۰۰ ولت به مدت ۶۰۰۰۰ ولت ساعت تنظيم شد. نوارهاي IPG پس از الکتروفورز بعد اول به مدت ۱۵ دقيقه در بافر اشباع (6M urea, 50 mM Tris-Cl pH 8.8,) 30% (v/v) glycerol, 2% (w.v) SDS, 1% DTT, a trace of bromophenol blue) قرار گرفته و سپس به مدت ۱۵ دقيقه ديگر در همان بافر ولي با جايگزيني iodoacetamide ۲.۵ درصد به جاي DTT قرار گرفتند. پس از آن نوارهاي IPG به بالاي ژل SDS-PAGE با غلظت ۱۲.۵ درصد اکريل آميد منتقل شده و در جريان ثابت ۱۵ ميلي آمپر به مدت ۳۰ دقيقه و سپس ۴۰ ميلي آمپر به مدت ۵ ساعت براي دو ژل SDS-PAGE در ۲۰ درجه سانتي گراد الکتروفورز شدند. در مرحله بعد ژل‌هاي SDS-PAGE در محلول رنگ‌آميزي حاوي colloidal CBB G-250 رنگ شدند (۱۷). براي اينکار ژل‌ها ابتدا در محلول تثبيت (40% methanol, 10% acetic acid) به مدت يک ساعت قرار گرفتند و پس از آن به مدت ۳۰ دقيقه با آب دوبار تقطير شده و سپس به مدت ۳۰ ساعت در محلول رنگ (10% phosphoric acid, 10% (w/v) ammonium sulfate, 20% methanol, 0.12% (w/v) CBB G-250) قرار گرفتند. ژل‌ها پس از رنگ‌آميزي، توسط اسکنر epson perfection 4990 (Epson, Japan) اسکن شده و از نرم افزار Image master 2D platenium ver.6 (Amersham

(Bioscience براي تجزيه و تحليل تصاوير استفاده گرديد. نسبت اندازه لکه‌ها در بين ژل‌ها براساس درصد حجم به کمک نرم افزار محاسبه گرديد. آزمايشات الکتروفورز دوبعدي در سه تکرار بيولوژيک انجام شدند.

شناسايي لکه‌هاي پروتئين از طريق طيف سنجي جرمي MALDI-MS و ESI-MS/MS:

لکه‌هاي ژل حاوي پروتئين‌هاي مرتبط با مقاومت به باکتري بيماريزا پس از مقايسه ژل‌ها از روي ژل‌ها بريده شدند و رنگ کوماسي بوسيله تيمار لکه‌ها با محلول استونيتريل و ۲۵ ميلي مولار بي کربنات آمونيوم به نسبت‌هاي مساوي (v/v)۱:۱ حذف شد و هر ۳۰ دقيقه اين محلول تعويض گرديد تا رنگ کوماسي از لکه‌هاي ژل حذف شود. سپس لکه‌هاي ژل با سانتريفوژ تحت شرايط خلا خشک شدند. به لکه‌هاي خشک شده ۲۰ ميکروليتر بي‌کربنات آمونيوم ۲۵ ميلي مولار اضافه گرديد و در پي آن به اين محلول آنزيم تريپسين (Sequencing grade modified trypsin, Promega) با غلظت ۱۰ نانوگرم در هر ميکروليتر واکنش اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتي گراد انکوبه شدند. جهت خاتمه واکنش هضم آنزيمي، ۸۰ ميکروليتر محلول (10% formic acid, 62.5% acetoniteile, 27.5% H_2O) به ۲۰ ميکروليتر واکنش آنزيمي اضافه گرديد. روشناور حاوي پروتئين هضم شده از پليت جدا و به دو سهم ۲۰ و ۸۰ درصدي به دو ويال جداگانه تقسيم شدند و سپس توسط سانتريفوژ تحت شرايط خلا خشک شدند. ويال سهم ۲۰ درصدي براي شناسايي پروتئين هضم شده از طريق طيف سنجي جرمي از نوع (Applied Biosystem) MALDI-MS و ويال سهم ۸۰ درصدي براي شناسايي پروتئين از طريق طيف سنجي جرمي از نوع (Applied Biosystem) ESI-MS/MS استفاده شدند.

در طيف سنجي جرمي ESI-MS/MS از يک کروماتوگرافي مايع (LC) که به يک دستگاه طيف سنجي جرمي Q-Trap جفت شده است، براي تعيين توالي پروتئين هضم شده استفاده گرديد. نتايج حاصل از طيف سنجي جرمي ESI-MS/MS به کمک نرم افزار MASCOT با پروتئين‌هاي موجود در بانک‌هاي (Viridiplantae) sport-trembl، sport-trembl (All species) و *M. truncatula* Gene Index (MtGI) مقايسه شدند و براي شناسايي پروتئين استفاده گرديد. پارامترهاي مورد استفاده براي نرم افزار MASCOT شامل: carbamidomethyl (C) به عنوان تغيير ثابت پروتئين و deamidated (NQ) وoxidation (M) به عنوان تغييرات متغير به نرم افزار معرفي شدند.

طراحي آغازگر:

بعد از شناسايي پروتئين- ژن‌ها در بانک MtGI، آغازگرهاي اختصاصي براساس توالي mRNA يا cDNA ژن‌هاي مرتبط در ناحيه 3' UTR (نواحي از mRNA که ترجمه نمي‌شود) به کمک نرم افزار primer express v.2 (Applied Biosystem) طراحي گرديد که در طراحي آغازگرها به خصوصيات لازم براي q-RT-real time PCR مد نظر قرار گرفت. همچنين توالي آغازگرها بر عليه بانک‌هاي ژني blast شد تا از اختصاصي بودن آنها نسبت به ژن‌هاي هدف اطمينان حاصل شود.

استخراج RNA و real time q-RT-PCR :

استخراج RNA به وسيله محلول Trizol (Invitrogen) و بر اساس دستورالعمل کيت انجام گرفت. حدود ۲۰۰ ميلي گرم از بافت ريشه گياه به کمک ازت مايع در هاون چيني پودر شده و سپس يک ميلي ليتر محلول Trizol (Invitrogen) به آنها اضافه شد. پس از ۱۵ ثانيه ورتکس نمونه‌ها در ۳۷ درجه سانتي گراد به مدت۱۵ دقيقه انکوبه شدند. سپس ۲۰۰ ميکروليتر کلروفورم به نمونه‌ها اضافه گرديد و ۱۵ ثانيه ديگر ورتکس شدند ودر g× ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقيقه در ۴ درجه سانتي گراد سانتريفوژ شدند. فاز آبي به ويال تازه منتقل و هم حجم آن ايزوپروپانل اضافه گرديد و به مدت ۱۵ دقيقه در يخ قرار گرفتند. نمونه‌ها درg× ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقيقه در ۴ درجه سانتي گراد سانتريفوژ شدند. روشناور نمونه‌ها حذف و پليت آنها که حاوي RNA بود با يک ميلي ليتر الکل اتانل ۷۰% شستشو شد و پس از ۵ دقيقه مجدداً به مدت ۱۰ دقيقه در g× ۸۰۰۰ و در ۴ درجه سانتي گراد سانتريفوژ شدند. پليت حاصله در دماي آزمايشگاه خشک گرديد و سپس ۵۰

میکرولیتر آب استریل عاري از RNase برروي آنها اضافه شد. یک میکرولیتر از محلول حاوي RNA آلوده به DNA جهت تعیین غلظت به کمک دستگاه Nanodrap (Germany) استفاده شد. یک میکروگرم RNA جهت تیمار با DNase (Promega) استفاده شد. جهت تعیین کیفیت RNA استخراج شده از کیت Agilent RNA 600 Nano Kit از طریق دستگاه Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Massy, France) استفاده شد. سپس براي تعیین کمیت RNA عاري از DNA از دستگاه nanodrap استفاده گردید. یک میکروگرم RNA عاري از DNA براي واکنش RT (Promega) به کمک پرایمر پلي T (Oligo(dt)$_{15}$) براساس دستورالعمل کیت استفاده شد.

واکنش q-RT-PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر حاوي ۵ نانوگرم cDNA، ۰/۶ میکرومولار آغازگرهاي جلورونده و پس رونده و ۵ میکرولیتر SYBER green PCR master mix (Applied Biosystem) انجام گردید. برنامه ترموسایکلر در سه مرحله به شرح زیر بود: مرحله اول در یک سیکل شامل ۵۰ درجه سانتي گراد به مدت ۲ دقیقه و ۹۵ درجه سانتي گراد به مدت ۱۰ دقیقه، مرحله دوم شامل ۴۰ سیکل، ۹۵ درجه سانتي گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتي گراد به مدت یک دقیقه و مرحله سوم (dissociation step) شامل ۹۵ درجه سانتي گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتي گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۹۵ درجه سانتي گراد به مدت ۱۵ ثانیه. تکثیر نمونه‌ها در پلیت ۳۸۴ خانه در دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystem) ABI 7900 انجام گردید و داده‌هاي PCR از طریق نرم افزار (Applied Biosystem) SDS 2.2 تجزیه و تحلیل شدند. براي نرمال کردن داده‌ها از آغازگرهاي استاندارد که cDNA مرتبط با ژن elongation facctor 1α را تکثیر مي‌کنند، استفاده شد. محاسبه بازدهي PCR از سه طریق انجام شد: ۱- از cDNA تمام تیمارها مخلوطي در سه غلظت یک، ۵ و ۱۰ نانوگرم درسه تکرار جهت انجام q-RT-PCR تهیه شد و سپس بازدهي PCR به کمک نرم افزار SDS 2.2 براي هر آغازگر براساس فرمول $(E+1)^{slop}=1$ محاسبه گردید. ۲- بازدهي PCR براي هر آغازگر و براي هر cDNA مستقل از طریق نرم افزار LinReg v.4 محاسبه گردید. ۳- فرض برابر بودن بازدهي PCR براي آغازگرهاي ژنهاي هدف و آغازگرهاي استاندارد مورد ارزیابي قرار گرفت (Applied Biosystems User Bulletin #2, http://docs.appliedbiosystems.com/search).

آزمایشات q-RT-PCR در سه تکرار بیولوژیک و سه تکرار تکنیکي انجام گردید. جدول ANOVA براي داده‌هاي q-RT-PCR در قالب آزمایش فاکتوریل کاملأ تصادفي تهیه و تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

تعیین شاخص بیماریزایي در گیاهان حساس و مقاوم *M. truncatula*

از دو دامنه مقاوم و حساس یک نسل F$_9$ جمعیت RILs حاصل از تلاقي دو والد حساس و مقاوم (مراجعه به مواد و روش ها) پس از ارزیابي فنوتیپي گیاهان بر علیه باکتري بیماریزاي *R. solanacearum*، ده لینه مقاوم و حساس انتخاب شدند. علایم بیماري در گیاهان حساس از روز سوم ظاهر شدند (شکل ۱). علایم بیماري از ۱ تا ۴ بر اساس روش وایلو و همکاران (۲۰۰۷) شماره گذاري شدند (۹) و این علایم در بین ۳ تا ۴۱ روز پس از تلقیح با باکتري در گیاهان حساس قابل شناسایي بودند (شکل ۱). شکل یک نشان مي‌دهد که باکتري بیماریزا در گیاه حساس قادر به تولید علایم پیشرفته بیماري تا شاخص ۴ یا مرگ کامل گیاه است ولي گیاهان مقاوم حداکثر تا علامت شماره یک را از خود نشان مي دهند.

نتایج آزمایشات الکتروفورز دوبعدي

براي شناسایي تفاوت بیان پروتئین‌هاي مرتبط با مقاومت به پاتوژن باکتریایي، ریشه ۱۰ گیاه حساس و مقاوم تلقیح شده با باکتري به همراه گیاهان کنترل (تیمار گیاهان در آب استریل) در دو مرحله روزهاي اول و سوم پس از تلقیح نمونه‌گیري و بطور جداگانه براي گیاهان حساس و مقاوم با هم مخلوط شدند. مقدار ۲۰۰ میلي گرم از بافت‌ها، براي استخراج پروتئین استفاده شد. نقشه پروتئوم (2D-PAGE) گیاهان حساس و مقاوم در دو شرایط تلقیح و کنترل و دو مرحله نمونه‌گیري با هم مقایسه شدند.

لکه‌هاي تکرارپذير نقشه پروتئوم هر گروه (حدود ۱۰۰۰ لکه واضح در هر ژل) در سه تکرار بیولوژیک با استفاده از نرم افزار Image master 2D platenium ver.6 در دو بعد براي خصوصيات p*I* از محدوده ۳ تا ۱۰ و وزن مولکولي از محدوده ۱۰ تا ۱۰۰ کیلودالتون قابل مشاهده هستند. مقایسه لکه‌ها در بین ژل‌ها پس از نرمال‌سازي به کمک همین نرم افزار به دو صورت انجام گرفت:

۱- مقایسه لکه‌ها در بین ژل‌هاي گیاهان تلقیح شده با گیاهان کنترل (شکل‌هاي ۲ تا ۷) نشان داد که در هر دو گروه گیاهان حساس و مقاوم در نمونه‌گیري روز اول پس از تلقیح و در بافت ریشه، بیان پروتئین‌هاي شماره ۶، ۷، ۸ و ۱۱ افزایش یافته است (شکل ۲ و ۳) که افزایش بیان پروتئین‌هاي شماره ۷ و ۸ در گیاه مقاوم بیشتر از حساس و پروتئین‌هاي شماره ۶ و ۱۱ در گیاه حساس بیشتر از مقاوم بود (جدول ۱). در نمونه‌گیري روز سوم پس از تلقیح، در بافت ریشه بیان پروتئین شماره ۹ در هر دو گیاهان حساس و مقاوم نسبت به گیاهان شاهد (mock-inoculation) افزایش یافت (شکل‌هاي ۵ و ۶). افزایش بیان لکه شماره ۹ در گیاهان مقاوم بیشتر از گیاهان حساس بود (جدول ۱). همچنین بیان پروتئین شماره ۱۰ در گیاهان مقاوم پس از تلقیح نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافت (شکل ۵ و ۷، جدول ۱)، ولي بیان این پروتئین در گیاهان حساس، پس از تلقیح نسبت به گیاهان شاهد تغییر پیدا نکرد (شکل ۶، جدول ۱).

۲- از طرف دیگر مقایسه لکه‌ها در بین ژل‌هاي گیاهان حساس و مقاوم پس از تلقیح نشان داد که در نمونه‌گیري روز اول و در بافت ریشه پروتئین‌هاي شماره ۲، ۳، ۴ و ۵ فقط در گیاهان مقاوم وجود دارند و در گیاهان حساس این پروتئین‌ها دیده نمي‌شوند (شکل ۴، جدول ۱) .

در مجموع از ۱۱ لکه مورد مطالعه در این آزمایش ۶ لکه بصورت کمي در بین دو شرایط تلقیح وکنترل تغییر کردند که شامل لکه‌هاي ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ در شکل‌هاي ۲ تا ۷ بود (جدول ۱). لکه‌هاي شماره ۱، ۲ و۳ که هر سه پروتئین peptidyl-prolyl cis-trans isomerase هستند که لکه شماره یک با p*I* 8.5 و وزن مولکولي ۱۷/۳ کیلو دالتون در موقعیت یکساني در نقشه پروتئوم هر دو گیاهان مقاوم و حساس قرار دارد ولي دو لکه ۲ و۳ فقط در گیاه مقاوم با p*I* هاي به ترتیب ۸ و ۷/۵ بصورت position shift نسبت به لکه شماره یک به طرف pH اسیدي تغییر مکان کرده‌اند. لکه‌هاي ۴ و ۵ هر دو پروتئین inhibitor ST1-like kunitz (Proteinase inhibitor 20) با p*I* هاي به ترتیب ۸ و ۷/۵ فقط درگیاه مقاوم موجود هستند (شکل ۴ و جدول ۱).

نتايج حاصل از طيف سنجي جرمي

تعداد ۲۴ لکه با بیان متفاوت از مقایسه نقشه پروتئوم گیاهان مقاوم و حساس در دو شرایط تلقیح و کنترل و روزهاي نمونه‌گیري اول و سوم انتخاب و ابتدا از طریق MALDI-TOF اقدام به شناسایي پروتئین‌ها شد و پروتئین‌هایي که از طریق انگشت‌نگاري جرمي (Mass finger printing) قابل شناسایي نبودند از طریق ESI-MS/MS بخشي از آنها تعیین توالي گردید. براي اطمینان از تکرارپذیري پروتئین‌هاي شناسایي شده توسط طیف سنجي جرمي، آزمایشات برروي لکه‌هاي مشابه در دو تکرار از ۳ تکرار بیولوژیک انجام شد که در هر دو تکرار نتایج طیف سنجي جرمي کاملاً مشابه هم بودند. نتایج طیف سنجي جرمي نشان داد که ۱۱ لکه از ۲۴ لکه‌ها مرتبط با پروتئین‌هاي گیاه *M. truncatula*، ۶ پروتئین مرتبط با پروتئین‌هاي باکتري *R. solanacearum*، ۲ پروتئین به عنوان کراتین و ۵ پروتئین بصورت ناشناخته باقي ماندند (جدول‌هاي ۱ و ۲). همچنین با مقایسه نتایج ESI-MS/MS برعلیه بانک اطلاعاتي گیاه *M. truncatula* (MtGI) ژن‌هاي مرتبط با این پروتئین‌ها شناسایي و محل کروموزومي آنها مشخص گردیدند (جدول ۱). براي لکه‌هایي که مشخصاتي براي آنها در بانک اطلاعاتي *M. truncatula* وجود نداشت ژن‌هاي مرتبط به این لکه‌ها (پروتئین‌ها) از گونه‌هاي دیگر گیاهي در بانک اطلاعاتي NCBI شناسایي ولي محل کروموزومي آنها در گیاه *M. truncatula* مشخص نگردید (جدول ۱).

نتایج Real time q-RT-PCR

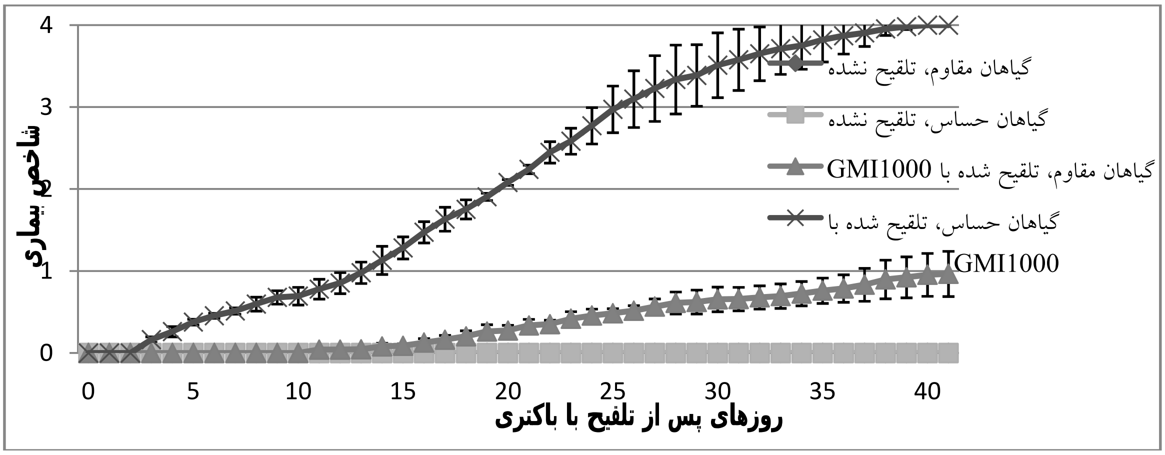
پس از تهیه cDNA آزمایش q-RT-PCR بوسیله پرایمرهاي طراحي شده (جدول ۳) بر اساس توالي ژن‌هاي شناسایي شده از

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

طريق آزمايشات پروتئوم انجام گرفت. براي بررسي معني‌دار بودن اختلاف بيان ژن‌ها در سطح mRNA جدول تجزيه واريانس برروي ميانگين داده‌هاي حاصل از نتايج q-RT-PCR تهيه شد. نتايج q-RT-PCR نشان داد که تغيير بيان ژن‌ها در سطح mRNA را بطوركلي مي‌توان به پنج گروه طبقه‌بندي کرد. در گروه اول ژن‌هاي peptidyl-prolyl cis-trans isomerase و Kunitz trypsin protease inhibitor قرار دارند که ميزان بيان اين ژن‌ها در گياهان حساس و مقاوم پس از تلقيح با باکتري نسبت به گياهان شاهد تغيير بيان معني‌داري نشان ندادند (جدول ۴). در گروه دوم، ژن peroxidase قراردارد که پس از تلقيح در هر دو گروه گياهان مقاوم و حساس و در هر دو dpi[5] بيان اين ژن افزايش يافت و اين افزايش بيان در بين گياهان حساس و مقاوم و در بين دو dpi اختلاف معني‌داري نداشتند (جدول ۴). در گروه سوم، ژن‌هاي PR5، cold stress response و Proteinase inhibitor 20 قرار دارند که بيان آن‌ها در هر دو گروه گياهان مقاوم و حساس و در هر دو dpi پس از تلقيح با باکتري افزايش يافته است. به طوري که افزايش بيان ژن‌هاي PR5، cold stress response درگياهان مقاوم در dpi3 بيشتر از dpi1 بود ولي در گياهان حساس تغيير معني‌دار نداشت. از طرف ديگر افزايش بيان ژن Proteinase inhibitor 20 درگياهان مقاوم بين دوdpi تغيير معني‌داري نداشت ولي در گياهان حساس افزايش بيان اين ژن در dpi3 کمتر از dpi1 بود (جدول ۴). در گروه چهارم، ژن PR10 قرار دارد که پس از تلقيح گياهان با باکتري در dpi1 بيان اين ژن در هر دو گياهان حساس و مقاوم افزايش يافت و اين افزايش بيان در گياهان مقاوم در dpi3 به طور معني‌داري بيشتر از dpi1 شد ولي در گياهان حساس مقدار بيان اين ژن به اندازه گياهان شاهد تنزل پيدا کرد (جدول ۴). در گروه پنجم، ژن pprg2 قرار دارد که پس از تلقيح گياهان با باکتري در dpi1 بيان اين ژن در گياهان حساس افزايش معني‌داري داشت ولي در dpi3 بيان اين ژن نسبت به گياهان شاهد تغيير معني‌داري نداشت. در گياهان مقاوم بر عکس، در dpi1 بيان اين ژن نسبت به گياهان شاهد تغييري نداشت ولي درdpi3 بيان اين ژن افزايش معني‌داري پيدا کرد (جدول ۴).

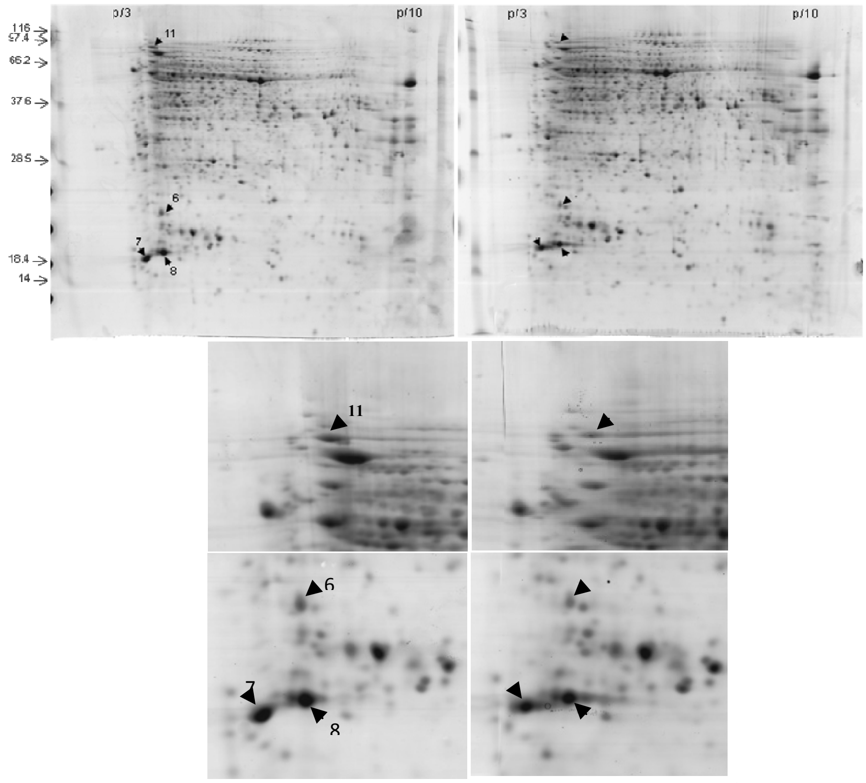
---

[5] -days post inoculation

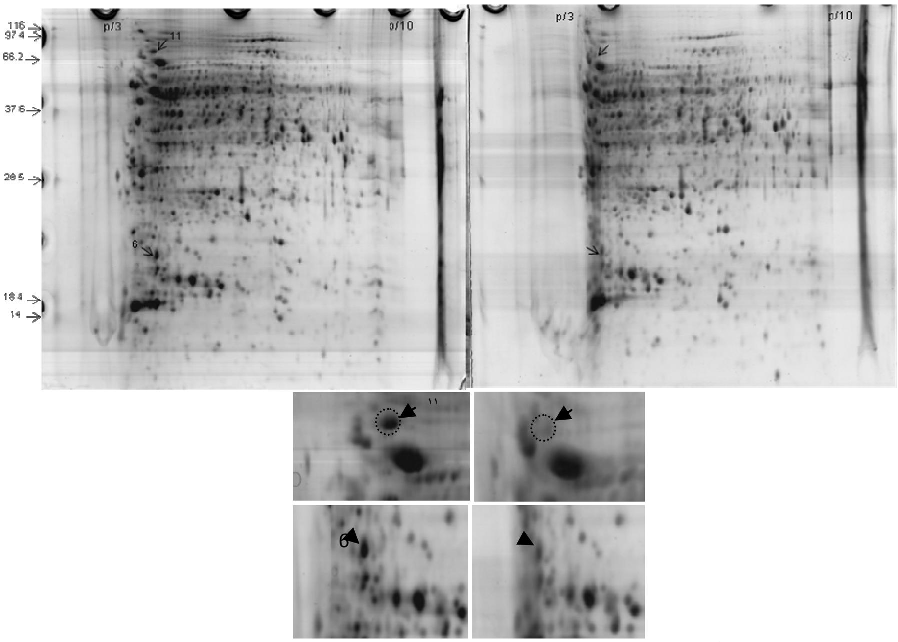


شکل ۱ - توسعه و ظهور علايم بيماري باکتريايي *R. solanacearum* در گياهان حساس و مقاوم M. truncatula. علايم بين يک تا ۴ بر حسب شدت بيماري بين ۳ تا ۴۱ روز پس از تلقيح با باکتري در گياهان حساس قابل شناسايي است ولي گياهان مقاوم حداکثر تا شاخص يک را از خود نشان دادند. گياهان حساس و مقاوم شاهد که با باکتري آلوده نشده اند هيچ علايمي از خود نشان ندادند. آزمايش شامل سه تکرار به همراه محاسبه انحراف معيار بود.

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

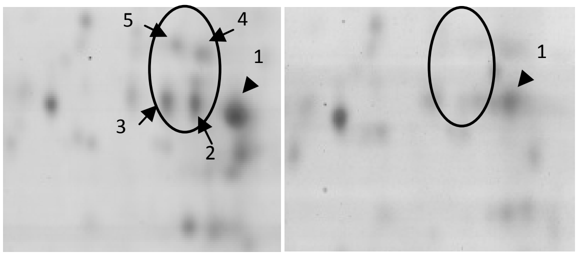


شکل ۲- الگوي پروتئوم بافت ریشه گیاه مقاوم M. truncatula. ژل دو بعدي حاصل از پروتئین ریشه، یک روز پس از تلقیح با باکتري *R. solanacearum* (سمت چپ) در مقایسه با گیاه شاهد (سمت راست). لکه‌هاي نام گذاري شده پروتئینهاي هستند که بیان آنها در گیاه مقاوم پس از تلقیح با باکتري افزایش یافته است.

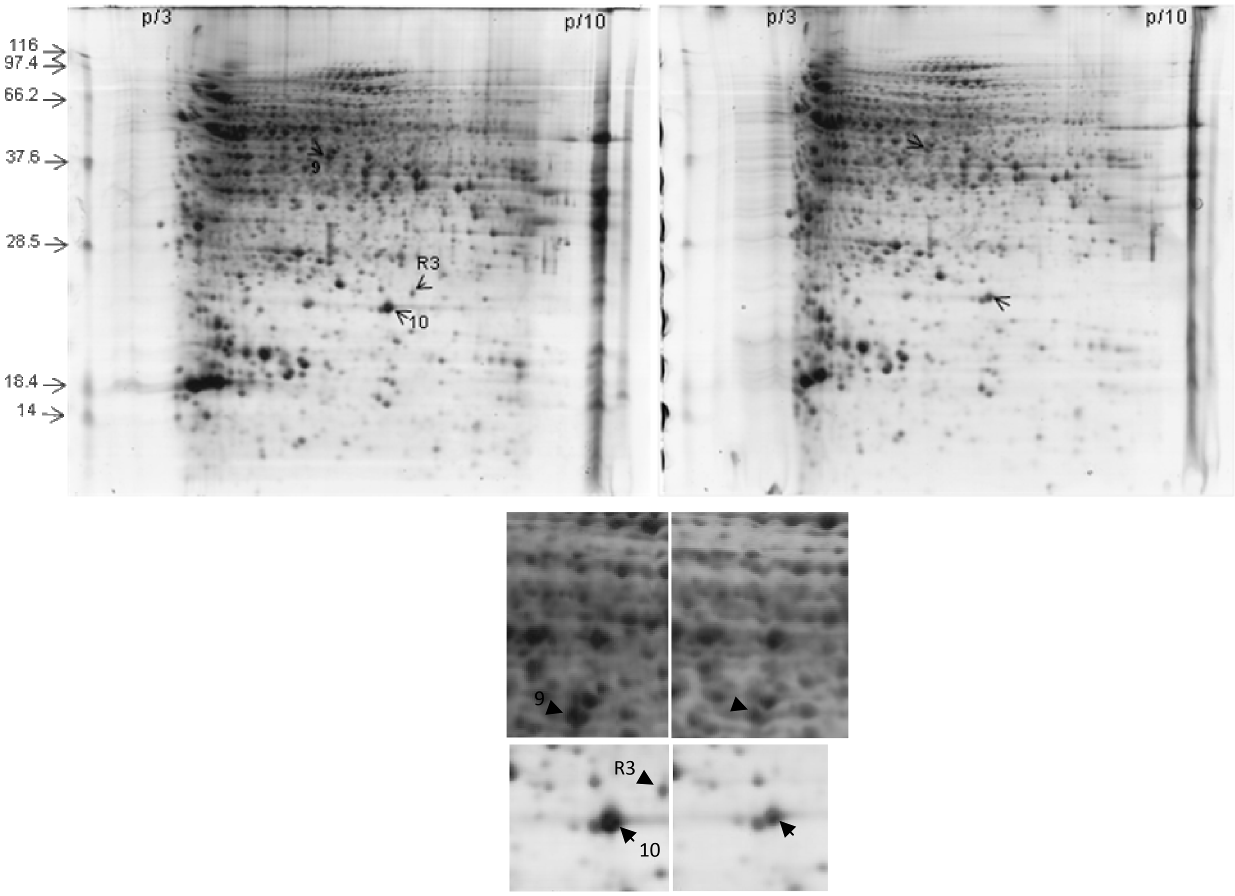


شکل ۳- الگوي پروتئوم بافت ریشه گیاه حساس M. truncatula. ژل دو بعدي حاصل از پروتئین ریشه، یک روز پس از تلقیح با باکتري *R. solanacearum* (سمت چپ) در مقایسه با گیاه شاهد (سمت راست). لکه‌هاي نام گذاري شده پروتئینهاي هستند که بیان آنها در گیاه حساس همانند گیاه مقاوم پس از تلقیح با باکتري افزایش یافته است.

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

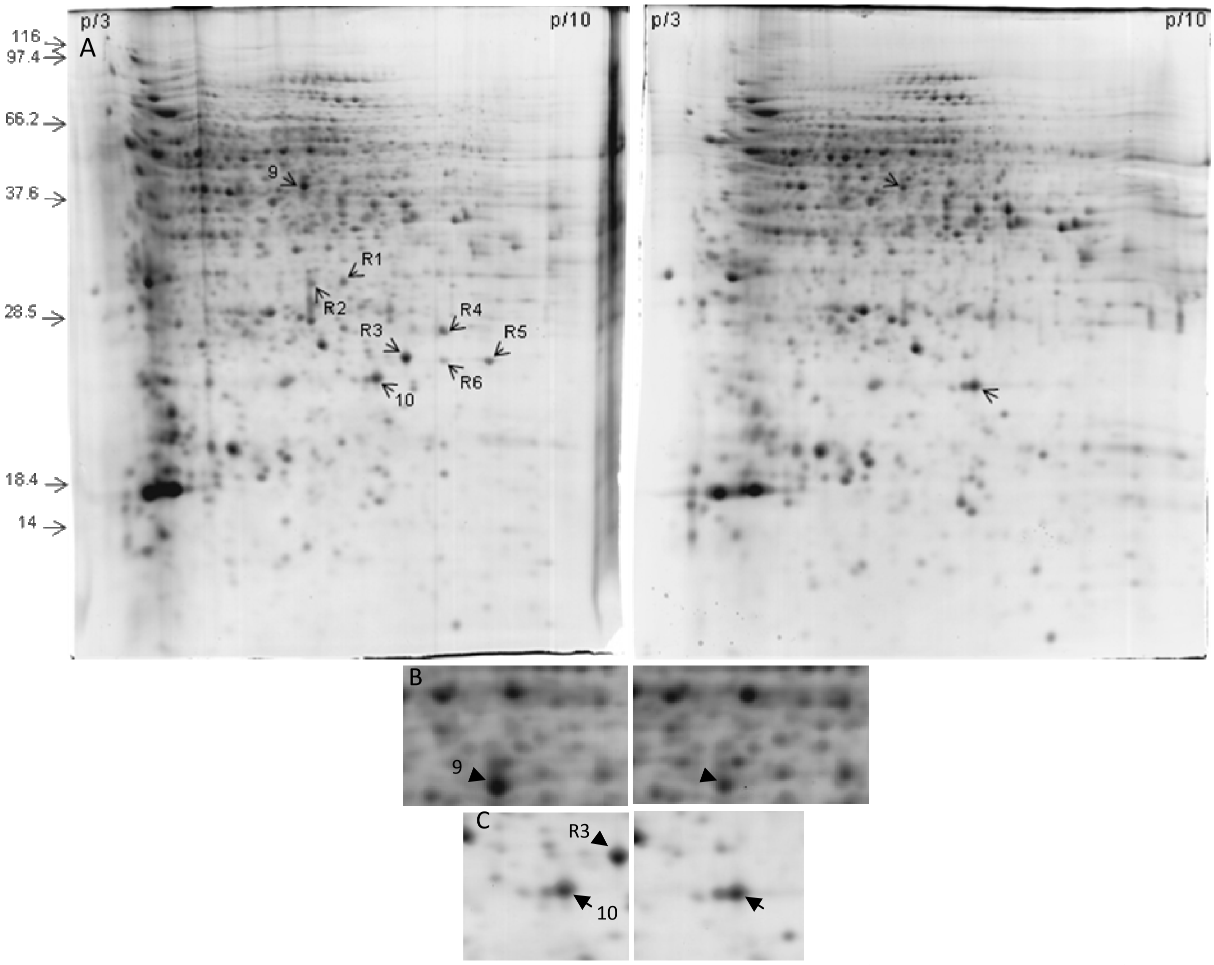


شکل ۴- مقایسه الگوي پروتئوم بافت ریشه در گیاهان مقاوم (سمت چپ) و حساس (سمت راست) M. truncatula یک روز پس از تلقیح با باکتري R. solanacearum. لکه‌هاي شماره ۱، ۲ و۳ که هر سه پروتئین peptidyl-prolyl cis-trans isomerase هستند که لکه شماره ۱ با ۸.۵ pI و وزن مولکولي ۲۰ کیلو دالتون در موقعیت یکساني در نقشه پروتئوم هر دو گیاهان مقاوم و حساس قرار دارد ولي دو لکه ۲ و۳ فقط در گیاهان مقاوم با pI هاي به ترتیب ۸ و ۷/۵ بصورت position shift نسبت به لکه شماره یک به طرف pH اسیدي تغییر مکان کرده‌اند. لکه‌هاي ۴ و ۵ هر دو پروتئین kunitz inhibitor ST1-like (Proteinase inhibitor 20) با pI هاي به ترتیب ۸ و ۷/۵ فقط درگیاهان مقاوم بصورت position shift تغییر کرده‌اند.

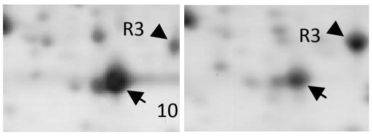


شکل ۵- الگوي پروتئوم بافت ریشه گیاهان مقاوم M. truncatula. ژل دو بعدي حاصل از پروتئین ریشه، سه روز پس از تلقیح با باکتري R. solanacearum (سمت چپ) در مقایسه با گیاه شاهد (سمت راست). لکه‌هاي نام گذاري شده پروتئین‌هاي هستند که بیان آنها در گیاهان مقاوم پس از تلقیح با باکتري افزایش یافته است. لکه R3 پروتئین باکتریایي R. solanacearum است که فقط در گیاهان تلقیح شده با باکتري دیده مي‌شود.

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]



شکل ۶– الگوي پروتئوم بافت ریشه گیاهان حساس M. truncatula. ژل دو بعدي حاصل از پروتئین ریشه، سه روز پس از تلقیح با باکتري R. solanacearum (سمت چپ شکل A) در مقایسه با گیاه شاهد (سمت راست شکل A)، لکه‌هاي پروتئین R1 تا R6 که فقط در گیاهان تلقیح شده با باکتري قابل ردیابي هستند پس از طیف سنجي جرمي به عنوان پروتئین‌هاي باکتریایي R. solanacearum شناسایي شدند. بیان پروتئین شماره ۹ (Peroxidase) در گیاهان حساس همانند گیاهان مقاوم (شکل ۵) پس از تلقیح با باکتري افزایش یافته است (سمت چپ شکل B) ولي پروتئین شماره ۱۰ (PR-5) بر خلاف گیاهان مقاوم (شکل ۵) در گیاهان حساس پس از تلقیح با باکتري تغییر بیان نداشت (شکل C). لکه R3 پروتئین باکتریایي R. solanacearum است که فقط در گیاهان تلقیح شده با باکتري دیده مي‌شود (سمت چپ شکل C).



شکل ۷– مقایسه الگوي پروتئوم بافت ریشه در گیاهان مقاوم (سمت چپ) و حساس (سمت راست) M. truncatula سه روز پس از تلقیح با باکتري *R. solanacearum*. سه روز پس از تلقیح با باکتري، بیان پروتئین شماره ۱۰ (PR-5) در گیاهان مقاوم نسبت به گیاهان حساس اختلاف محسوسي دارد. لکه R3 پروتئین باکتریایي *R. solanacearum* است و بیان آنها در گیاهان حساس نسبت به گیاهان مقاوم پس از تلقیح با باکتري بیشترشده است. .

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

Spot[a]	Best matching gene product[b]	Chromosome[c]	MW (KD)Theoretical	pI Theoretical	MW(KD) on gel	pI on gel	Inductions ratios postinoculation[d]				*M. truncatula*(Accession Number)	Identified peptide sequences[e]	Protein Score (MASCOT) LC-MS/MS[f]	% Coverage[g]
							Susceptible Plant		Resistant Plant					
							Day 1	Day 3	Day1	Day 3				
1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	?	18.١	8.3	١٧.٣	8.5	-	-	-	-	TC127550	FDMSVGGNPAGR-GGESIYGSKFADENFIK-KHTGPGILSMANAGPGTNGSQFFICTAKTEWLDGKHVVFGQ	335	41
2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	?	18.1	8.3	١٧.٣	8	Absent	Absent	Present	Present	TC127550	FADENFIK-VVEGLDIVKEIEKVGSGSGKTSKPVVIAD	191	22
3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	?	18.1	8.3	١٧.٣	7.5	Absent	Absent	Present	Present	TC127550	IIFELFADVTPRTAENFRALCTGEKGVGRSGKPL-FADENFIK	260	25
4	Proteinase inhibitor 20	6	23.4	7.6	١٩.٨	8	Absent	Absent	Present	Present	AC122730_2	CPVTVLQDR	40	4
5	Proteinase inhibitor 20	6	23.4	٧.٦	١٩.٨	7.5	Absent	Absent	Present	Present	AC122730_2	CPVTVLQDR	40	4
6	Kunitz trypsin protease inhibitor	3	٢٣	5.1	٢٠.٧	4.8	4.21±0.18	-	2.01±0.15	-	CU019604_15	TCPLDVIR-NPDAIGTPVYFSASGLDYIPTLTDLTIEIPILGSPCNEPK-LAGEHAYEIYSFK-FCPSVPGVLCAPVGTFVDTDGTK-VMAVGDGIEEPYYVR	155	46
7	PR10 protein	?	١٦.٦	4.5	١٤.٣	4.3	1.42±0.09	-	2.39±0.17	-	gi|1616609	GVFNFEDETTSIVAPAR-ALVTDSDNLIPK-VIDAIQSIEIVEGNGGAGTIK-TFVEGGETK-LSAGPDGGSIAK-GDAAPSEEEIK-ALEGYVLANPDY	523	60
8	Pprg2 protein	?	١٦.٥	5.٨	١٤.٨	4.8	1.68±0.13	-	2.78±0.16	-	gi|22266001 *M. sativa*	GVFTFNDEHVSTVAPAK-VISAAQSVEIVEGNGGPGTIK-TNFVLHK	219	28
	Cold responsive protein	?	١٦.٥	5.٨	١٤.٨	4.8	1.68±0.13	-	2.78±0.16	-	gi|37542526 *T. repens*	DADEIVPK-LTVVEDGK	102	10
9	Peroxidase	?	٣٨.٢	5.8	٣٦.٩	5.8	-	2.25±0.19	-	3.52±0.20	gi|537317 *M. sativa*	DTCPNVHSIVR-GLDVVNQIK-VLTGSQGEIR	195	8
10	Thaumatin-like protein PR-5	5	٢٦.٢	5.8	٢١.٩	6	-	1.02±0.09	-	3.25±0.12	CU326391_11	GQTWNLWVNPGTAMAR-TGCNFDGSGR-ISCTADINGQCPNELR-TQGGCNNPCTVFK-CHDSYSYPQDDPTSTFTCPAGSNYK	487	40
11	Molecular chaperone Hsp90	5	80.5	4.9	٨٤.٣	4.7	8.72±0.34	-	4.5±0.28	-	CT573078_38	ELISNASDALDK-FEGLTDK-LDSQPELFIHIIPDK-TNNTLTIIDSGIGMTK-ADLVNNLGTIAR-DTTGEALGR-EDQLEYLEER-EVSNEWSLVNK-SLTNDWEEHLAVK-APFDLFDTK-VFIMDNCEELMPEYLSFVK-GIVDSEDLPLNISR-FYEAFSK-LGIHEDSQNK-EGQNDIYYITGESK-AVENSPFLEK-LGLSIDEDAAEADADMPPLEEADADAEGSK	450	31

a- لکه‌هاي پروتئيني شماره‌گذاري شده بر روي ژل‌هاي دو بعدي گياهان حساس و مقاوم شاهد (گياهان حساس و مقاوم تلقيح نشده با باكتري) و تلقيح شده با باكتري *R. solanacearum*.

b- نام پروتئين شناسايي شده از طريق طيف سنجي جرمي (ESI-MS/MS) به کمک بانک اطلاعاتي ژنوم گياه M. truncatula (MtGI) و بانک اطلاعاتي NCBI.

c- محل کروموزومي مرتبط با پروتئين‌هاي شناسايي شده به کمک بانک اطلاعاتي ژنوم گياه M. truncatula (MtGI).

d- محاسبه شاخص افزايش بيان پروتئين در گياهان حساس و مقاوم پس از تلقيح با باكتري نسبت به گياهان شاهد در سه تکرار به همراه محاسبه انحراف معيار: - = نشان دهنده عدم تغيير بيان، present و absent به ترتيب نشان دهنده وجود و عدم وجود پروتئين در ژل‌هاي دو بعدي است.

e- توالي پپتيدي شناسايي شده از طريق طيف سنجي جرمي (ESI-MS/MS).

f- امتياز داده شده به پروتئين‌هاي شناسايي شده از طريق طيف سنجي جرمي (ESI-MS/MS) به کمک نرم افزار MASCOT در بانک اطلاعاتي ژنوم گياه M. truncatula (MtGI) و بانک اطلاعاتي NCBI.

g- درصد پروتئين شناسايي شده.

جدول ۲: لکه‌هاي پروتئيني متعلق به باكتري *R. solanacearum* شناسايي شده از گياهان حساس و مقاوم در سومين روز پس از تلقيح.

Spot [a]	Best matching gene product [b]	Susceptible Plant[c]		Resistant Plant[c]		*R. solanacearum* Accession Number	Identified peptide sequencese[d]	Protein Score MASCOT LC-MS/MS[f e]	% Coverage[f]
		Pre- Inoculation d	Post- Inoculationd	Pre- Inoculationd	Post- Inoculationd				
R1	Putative uncharacterized protein	Absent	++	Absent	+	gi|17544951	DTLDVLAK - LINSIVGLYDGVSQQDK- YLVLSSLIR – FELCFP ELAYETV	311	42
R2	Putative uncharacterized protein	Absent	++	Absent	+	gi|17544951	SVFLAEQTSFDSAAAVGDFLGK- GEAIYSDPR DTLDVLAK- YV EEIDNTP FFHLLTHDGNER-LINSIVGLYDGVSQQ DK-YLVLSS LIR-QTIIGWTK-FELCFPE L AYETV	423	44
R3	Putative uncharacterized protein	Absent	++	Absent	+	gi|17546446	WHAVEHAVMTVEQR-ALASLAEKQLADAPQIK	79	16
R4	Alkyl hydroperoxide reductase (Subunit c) oxidoreductase protein	Absent	++	Absent	+	gi|17548466	FVEVTEQNLK-AGAEVYIVTTDTHFSHK-GTFVINPEGVVKTSE VHDNAIAR-AAQYVASNPGQVCPAK	199	35
R5	Polyhydroxybutyrate granule-associated protein (Phasin) phap1	Absent	++	Absent	+	gi|17546324	MLTQEQIAAAQKANLETFFGLTNK-DA QELLAVHTA AVQP LAEK-HLYEIFS DTQTEFGKVAETQIAEGSR-NAPAGSESAVA LVKSALSAANNAYDSVQK	118	51
R6	Polyhydroxybutyrate granule-associated protein (Phasin) phap1	Absent	++	Absent	+	gi|17546324	MLTQEQIAAAQKANLETFFGLTNK-DAQELLAVHTAAV QPL AEKVLAYNRHLYEIFSDTQTEFGKVAETQIAEGSR-SALSA AN NAYDSVQK-QAVELAESNFHAAANAASK	451	56

a- لکه‌هاي پروتئيني شماره گذاري شده بر روي ژل‌هاي دو بعدي گياهان حساس و مقاوم تلقيح شده با باكتري *R. solanacearum*.

b- نام پروتئين شناسايي شده از طريق طيف سنجي جرمي (ESI-MS/MS) به كمک بانک اطلاعاتي NCBI.

c- شاخص ميزان بيان پروتئين‌هاي باكتريايي در گياهان حساس و مقاوم در سومين روز پس از تلقيح Absent = :عدم وجود لكه پروتئين باكتريايي، + = بيان كم پروتئين باكتريايي، ++ = بيان بالاي پروتئين باكتريايي.

d- توالي پپتيدي شناسايي شده از طريق طيف سنجي جرمي (ESI-MS/MS).

e- امتياز داده شده به پروتئين‌هاي شناسايي شده از طريق طيف سنجي جرمي (ESI-MS/MS) به كمک نرم افزار MASCOT در بانک اطلاعاتي NCBI.

f- درصد پروتئين شناسايي شده.

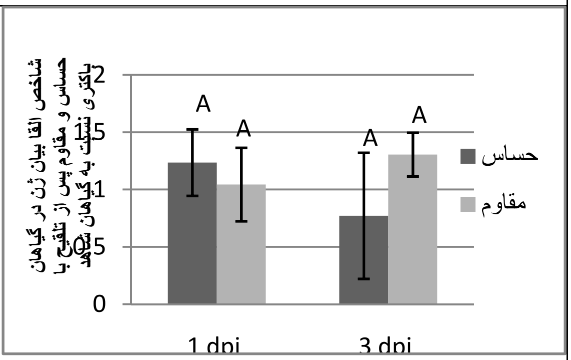
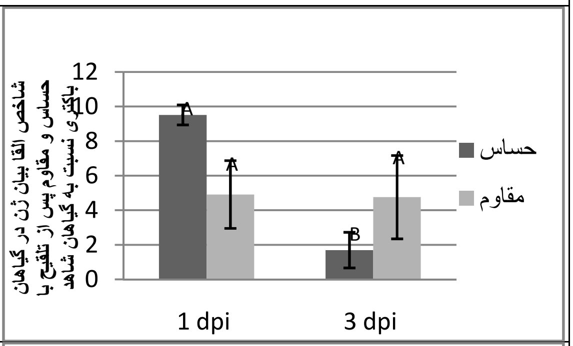
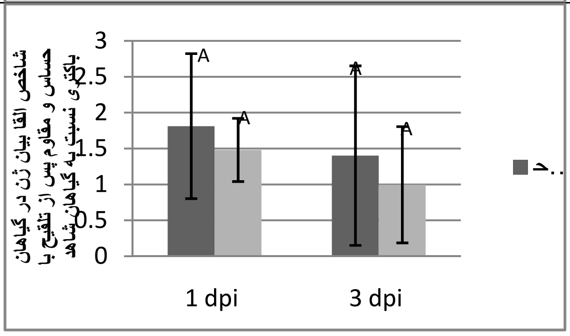
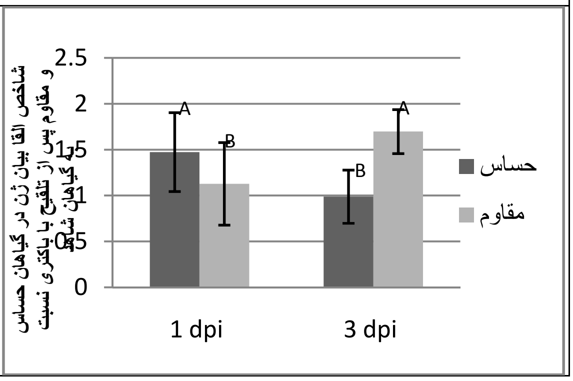
[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

جدول ۳: آغازگرهاي طراحي شده از ژنهاي مرتبط با پروتئين هاي شناسايي شده به کمک بانک اطلاعاتي ژنوم گياه M. truncatula (MtGI) و بانک اطلاعاتي NCBI.

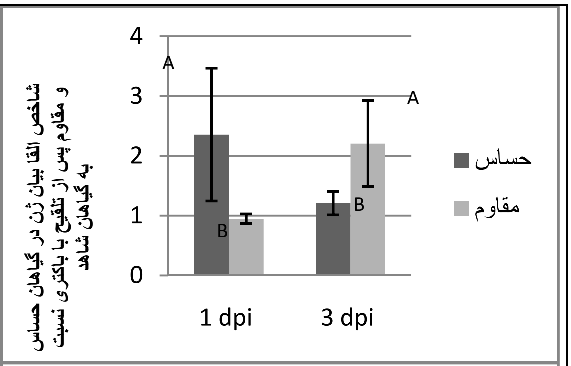
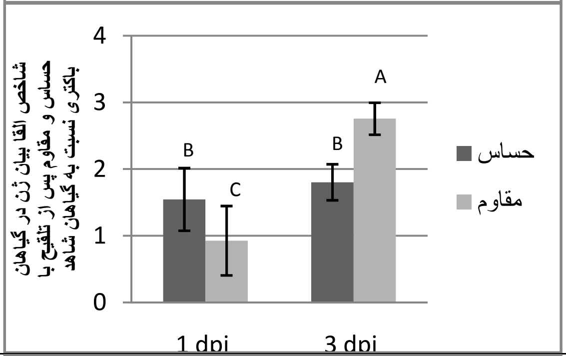
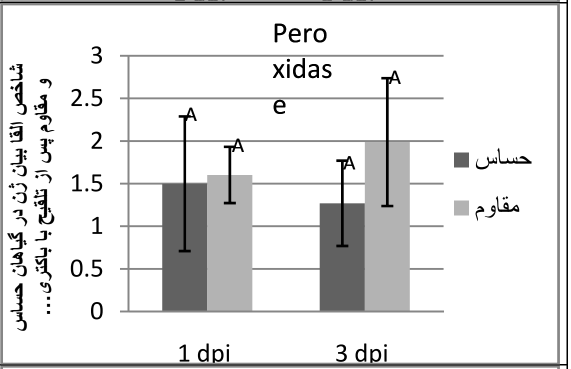
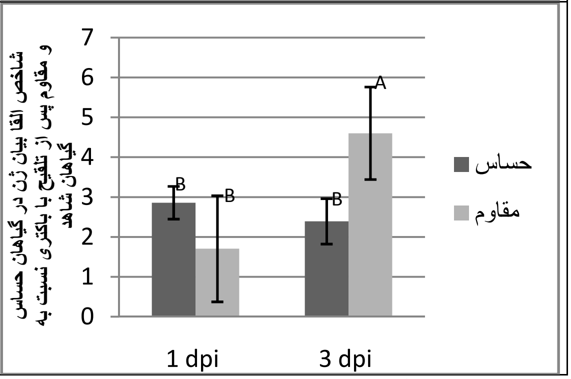
Name	Accession no.	Forward primers	Reverse primers
Thaumatin-like protein PR-5	CU326391_11	TCAATGGTGTGTTCTTTCAATAAGTTG	CACACAATACACACAGCAAAATACAGTAA
Kunitz trypsin protease inhibitor	CU019604_15	GCCCAAATCAGACGAGGTATGT	GAGACTTCCTGCATGAGACACAA
Proteinase inhibitor 20	AC122730_2	TGCTGCATCAACAAAATGGTTAA	TTTTCAGGACCACCAATACCAAT
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	TC127550	TCTTCCTTCCACCGTGTGATC	ATTCCAGGACCGGTGTGCTT
Pprg2 protein	gi|22266001	CACACCAAAGGTGATGCAGCTC	ATGGCCTTGATAAGTCCAGTTCC
Cold responsive protein	gi|37542526	GGAACAGGGTTGGATGAAAGTTT	CACTGAAATCTTAACAATGGATCCA
Molecular chaperone Hsp90	CT573078_38	TATTAGATGCAATTTTCTTGACCAGTGT	CGAACCAACAACAGTCAACAAATAA
PR10 protein	gi|1616609	CACAGTGGAGAAGATCTCCTTTGA	ACAGTAAGCTTTGCAATGGATCCT
Peroxidase	TC114533	TAGAGGTCAATGCAGATTCTTCGTT	GTTGAGAGTTGGATCGGGATTTC
Elongation factor 1α[a]	gi|217072267	GAGGTTGGTTCGTGAAATTGC	CAGCATGGCTCTGGAAACG

a- آغازگرهاي طراحي شده از ژن Elongation factor 1α جهت استفاده از آن به عنوان استاندارد داخلي در real time q-RT- PCR.

جدول۴- جدول مقایسه میزان افزایش بیان ژن‌ها در سطح mRNA در بافت ریشه گیاهان حساس و مقاوم M. truncatula پس از تلقیح با باکتري *R. solanacearum* نسبت به گیاهان شاهد.

Spot[a]	Best matching gene product	q-RT-PCR[b]
1,2,3	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	
4,5	Proteinase inhibitor 20	
6	Kunitz trypsin protease inhibitor	
7	PR10 protein	

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

8	Pprg2 protein Cold responsive protein	 
9	Peroxidase	
10	Thaumatin-like protein PR-5	

a- لکه هاي پروتئيني شماره گذاري شده بر روي ژل هاي دو بعدي گياهان حساس و مقاوم شاهد (گیاهان حساس و مقاوم تلقيح نشده با باكتري) و تلقيح شده با باكتري.R. solanacearum

b- شاخص ميزان افزايش بيان ژنها در سطح mRNA مرتبط با پروتئين هاي مقاومت شاسايي شده از گياهان حساس و مقاوم M. truncatula در روزهاي اول و سوم پس از تلقيح با باكتري *R. solanacearum* نسبت به گياهان شاهد، در آزمايش real time q-RT- PCR .ميانگين‌هاي مشخص شده با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنيدار (p< ۰.۵) درميزان بيان mRNA ژن كانديد در بين گياهان حساس و مقاوم در سه تكرار بيولوژيكي مي‌باشد. ميله خطا بر روي هيستوگرام معرف انحراف معيار است.

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

بحث

در این پژوهش براي استخراج پروتئین از بافت ریشه گیاه روش دامروال و همکارانش (۱۶) استفاده شد ولي از آنجائیکه حلالیت بعضي از پروتئین‌ها شامل پروتئین‌هاي هیدروفوب غشایي و پروتئین‌هاي بازي در این روش و روش‌هاي مرسوم دیگر براي آزمایش 2D-PAGE پائین است (۱۹،۱۸). لذا براي افزایش حلالیت چنین پروتئین‌ها از دترجنت SDS با غلظت ۲ درصد و دترجنت سولفوبتائین ASB14 با غلظت ۰/۷ در صد استفاده گردید. پس از حذف SDS از محلول پروتئین (با استفاده از کیت 2D clean up) که به دلیل بار منفي مي‌تواند در بعد اول الکتروفورز ایجاد اختلال کند توانستیم پروتئین‌هاي مهم با pH بازي ۸ مانند پروتئین لکه‌هاي ۱، ۲، ۳، ۴ و۵ را با وضوح بالا که در مقاومت نسبت به پاتوژن باکتریایي دخالت دارند شناسایي کنیم (شکل ۲ لکه‌هاي ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵). همچنین به علت عدم آگاهي از بار الکتریکي پروتئین‌هاي گیاهي کاندید علیه پاتوژن باکتریایي از نوارهاي ژلي با *pI* 3-10 NL براي بعد اول الکتروفورز استفاده شد.

در منابع گزارش شده است که باکتري *R. solanacearum* ابتدا در مدت یک روز پس از تلقیح از طریق ریشه در فضاهاي بین سلولي تکثیر شده و به آوندهاي چوبي حمله مي‌کند و پس از گذشت ۳ تا ۵ روز از شروع تلقیح تولید اگزوپلي ساکارید در آوندهاي گیاهي کرده که باعث مسدود شدن آوندها و در این زمان (۳ تا ۵ روز) اولین علایم بیماري ظاهر مي‌شود (۱۰، ۹). بنابراین در این تحقیق، نمونه‌گیري روز اول و سوم که مطابق با تکثیر باکتري در فضاهاي بین سلولي بافت ریشه و تولید اگزوپلي ساکارید در آوندها است براي تغییر بیان ژن‌ها در دو سطح پروتئین و mRNA انتخاب شدند.

در مقایسه لکه‌هاي R1 تا R6 بین ژل‌هاي گیاهان مقاوم و حساس پس از تلقیح در بافت ریشه و در نمونه‌گیري روز سوم (شکل ۶) مشخص گردید که درصد حجم و همچنین شدت تراکم[6] این لکه‌ها در گیاه حساس بیشتر از گیاه مقاوم است. قابل ذکر است که در نمونه‌گیري روز اول پس از تلقیح این لکه‌ها قابل ردیابي نبودند. پس از شناسایي این لکه‌ها از طریق طیف سنجي جرمي (جدول ۳) مشخص شد که این لکه‌ها متعلق به باکتري *R. solanacearum* هستند و افزایش حجم این لکه‌ها در گیاهان حساس نسبت به گیاهان مقاوم پس از تلقیح مي‌تواند نشانگر میزان تکثیر بیشتر باکتري پاتوژن و یا بیان بیشتر این ژن‌ها در باکتري موجود در گیاهان حساس باشد و احتمالا این لکه‌ها مرتبط با فاکتورهاي بیماریزایي از باکتري پاتوژن است. اخیرا، داهال و همکاران (۲۰۰۹) نشان داده‌اند که در بخاطر اثر متقابل در بین باکتري *R. solanacearum* و گیاهان مقاوم و حساس گوجه‌فرنگي، دو لکه R3 و R4 بدست آمده در تحقیق حاضر در گیاهان حساس گوجه‌فرنگي نیز نسبت به گیاهان مقاوم بیشتر بیان شده‌اند (۱۲). باید خاطرنشان کرد که این لکه‌ها فقط در ژل‌هاي دو بعدي مرتبط با گیاهان تلقیح شده با باکتري دیده شد و در گیاهان کنترل این لکه‌ها وجود نداشتند (شکل‌هاي ۵ تا ۷).

در این تحقیق نتایج حاصل از q-RT-PCR نزدیك به ۲۵ درصد هماهنگي با نتایج بررسي پروتئوم داشت که این نتیجه موافق نتیجه گایقي و همکاران (۱۹۹۹) (۲۰) ومخالف با نتیجه گزارش شده توسط فوشر و همکاران (۱۹۹۹) بود (۲۱).

عدم هماهنگي کامل (۱۰۰ درصد) بین بیان mRNA و پروتئین با توجه به گزارشات قبلي داراي دلایل متعدد است که از جمله میتوان به سرعت تغییر و تبدیل و از بین رفتن متفاوت پروتئین‌ها نسبت به mRNA (۲۲)، تغییرات پس از ترجمه پروتئین‌ها (از جمله فسفریلاسیون، استیلاسیون و گلیکوزیلاسیون که مي‌توانند بار الکتریکي یا وزن مولکولي پروتئین را تغییر دهند که در این صورت در ژل دو بعدي لکه‌هاي متفاوتي از یک پروتئین ظاهر مي‌شوند که همه آنها مرتبط با یک mRNA هستند) (۲۳)، کنترل ترجمه ژن از طریق ترجیح کدوني[7] (۲۴) و عدم وجود دنباله پلي A در mRNA هاي رونویسي شده از ژن‌هاي کلروپلاستي اشاره کرد (۲۵). در مورد آخر، mRNA ها به پروتئین تبدیل مي‌شوند ولي از طریق آغازگر پلي T به cDNA تبدیل نشده و لذا قابل

---

[6] -intensity

[7] -codon bias

ردیابي از طریق q-RT-PCR نیستند. علاوه بر این در آزمایشات دو بعدي شناسايي لکه پروتئيني که در اثر عامل تنش (زنده و یا غیر زنده) تغییر بیان داشته، برخي از لکه‌ها شامل بیش از یک پروتئین هستند و در طیف سنجي جرمي، پپتیدهاي پروتئيني که بیشتر یونیزه شود خود بهتر شناسايي شده و مانع شناسايي پروتئین‌هاي دیگر مي‌شود در حالي که ممکن است پروتئین اصلي که تحت تاثیر تنش تغییر بیان داشته مرتبط با پروتئین شناسايي شده نباشد. لذا با طراحي آغازگر براي پروتئین شناسايي شده ممکن است نتیجه q-RT-PCR مطابق با نتیجه حاصل از ژل‌هاي دوبعدي نباشد.

در تحقیق حاضر پس از شناسايي ژن‌هاي کاندید براي مقاومت و تعیین محل کروموزومي آنها (جدول ۱) مشخص شد که این ژن‌ها بر روي کروموزوم‌هاي ۳، ۵ و ۶ قرار گرفته‌اند. در همین رابطه وایلو و همکاران (۲۰۰۷) (۹) از طریق تهیه نقشه QTL محل کروموزومي یک QTL بزرگ اثر براي مقاومت به باکتري *R. solanacearum* و چند QTL کوچک اثر را در روي کروموزوم‌هاي شماره ۳، ۵ و ۷ ردیابي نمودند. با توجه به تطابق زیاد نتایج مکان‌یابي ژني در این دو تحقیق شاید بتوان نتیجه گرفت که ژن‌هاي شناسايي شده برروي کروموزوم‌هاي ۳ و ۵ تحقیق حاضر همان QTL هاي شناسايي شده توسط وایلو و همکاران (۲۰۰۷) (۹) و یا ژن‌هاي پیوسته به آنها مي‌باشند. براي تایید این مطلب نیاز به تعین توالي QTL هاي مذکور و تطابق توالي‌ها با توالي ژن‌هاي شناسايي شده در این تحقیق مي‌باشد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که به طور کلي مي‌توان ژن‌هايي که بیان آنها برعلیه پاتوژن باکتریايي تغییر کرده است را به دو گروه طبقه‌بندي کرد. گروه اول شامل ژن‌ها یا پروتئین‌هاي مقاومت که محصول آنها بصورت مستقیم با پاتوژن واکنش مي‌دهد مانند ژن‌هاي شماره ۴، ۶، ۷، ۹ و ۱۰ که مشخصات آنها در جدول شماره ۱ آمده است و گروه دوم شامل ژن‌هايي که محصول آنها بعنوان فاکتورهاي رونویسي[8] یا پروتئین‌هاي شرکت کننده در مسیر انتقال پیام و یا به عنوان چپرون در تعیین شکل فضايي پروتئین‌هاي دیگر دخالت مي‌کنند مانند ژن‌هاي شماره ۱، ۲، ۳ و ۱۱ از جدول۱.

در مورد نقش پروتئین HSP90 درمقاومت به تنش زنده گزارش شده است که اکثر ژن‌ها- پروتئین‌هاي مقاومت (R-genes) حاوي ناحیه LRR(leucine rich repeat) به تنهايي قادر به شناسايي الیسیتور پاتوژن و شروع فعالیت مسیر انتقال پیام نیستند (۳۰، ۲۹، ۲۸، ۲۷، ۲۶) و براي این کار کمپلکس R پروتئین وابسته به مولکول HSP90 است. نقش HSP90 برروي فعالیت R فراورده ژن *pto* براي مقاومت نسبت به پاتوژن باکتریايي *Pseudomonas syringae* در توتون و آرابیدوپسیس (۳۱، ۳۰، ۲۹)، و برروي R پروتئین ژن *Rx* براي مقاومت برعلیه ویروس X درسیب‌زمیني (۳۰، ۲۹، ۲۷) و برروي R پروتئین ژن *N* برعلیه ویروس موزائیک توتون (۳۰، ۲۹، ۲۸) ثابت شده است. براي شناسايي نقش مولکولي و مکانیزم عمل HSP90، سانگستر و همکاران (۳۱) و بوتر و همکاران (۲۸) به ترتیب در آرابیدوپسیس و توتون مدلي را ارائه کردند که در شرایط عدم وجود الیسیتورپاتوژن مولکول RIN4 گیاهي به کمپلکس R پروتئین چسبیده و آن را غیرفعال مي‌کند. با واکنش فاکتور غیر بیماریزاي[9] پاتوژن به کمپلکس R پروتئین، مولکول RIN4 از کمپلس R پروتئین جدا مي‌شود. R پروتئین در این حالت دو سرنوشت خواهد داشت به این صورت که در حضور کمپلکس HSP90-SGT1-RAR1 این کمپلکس از طریق مولکول SGT1 مي‌تواند به ناحیه LRR از R پروتئین بچسبد و به این طریق R پروتئین به شکل فضايي مطلوب خود رسیده و مسیر انتقال پیام را فعال کند و یا در عدم حضور کمپلکس HSP90-SGT1-RAR1، کمپلکس R پروتئین بوسیله ماشین هضمي که یکي از اجزا آن SGT1 است تجزیه مي‌شود که نتیجه آن حساس شدن گیاه نسبت به پاتوژن علیرغم وجود R پروتئین مي‌باشد.

با توجه به شکل ۴ و جدول ۱ مي‌توان دریافت که لکه‌هاي شماره ۲، ۳، ۴ و۵ فقط در گیاهان مقاوم مشاهده شدند ولي در گیاهان حساس قابل مشاهده نیستند. لکه‌هاي ۴ و ۵ هر دو پس از

---

[8] -Transcription factor

[9] -avirulence factor

شناسايي از طريق طيف سنجي جرمي به پروتئين kunitz inhibitor ST1-like (Proteinase inhibitor20) تعلق دارند که با استفاده از نرم افزار signal P3.0 server مشخص شد که يک توالي bp ۲۵ به عنوان signal peptide در ناحيه N ترمينال پروتئين مسئول ترشح اين پروتئين از غشاهاي سلولي است. با حذف اين ناحيه که شامل دو اسيدآمينه ليزين و هيستيدين ، شارژ بار مثبت اين پروتئين کم شده و پروتئين خاصيت اسيدي پيدا مي‌کند و p*I* آن کم شده که در شکل ۴ (لکه‌هاي ۴ و ۵) اين موضوع قابل مشاهده است.

همچنين سه لکه ۱، ۲ و ۳ با p*I* هاي متفاوت در شکل‌هاي ۴ هر سه مرتبط به پروتئين peptidyl-prolyl cis-trans isomerase هستند. نقش اين آنزيم در تبديل فرم سيس به ترانس گروه‌هاي پپتيد حول پيوند پپتيدي است. ترايف و همکاران (۲۰۰۹) فسفريله شدن اين پروتئين را در گياه *M. truncatula* رقم A17 در اثر تلقيح با قارچ *Aphanomyces euteiches* را با استفاده از آنتي بادي آنتي فسفوسرين نشان دادند (۱۳) ولي ما در تحقيق حاضر نشان داديم که در گياهان RILs حساس به باکتري بيماريزاي *R. solanacearum* (والد حساس اين گياهان رقم A17 است رجوع به بخش مواد و روش‌ها) پس از تلقيح با اين باکتري لکه پروتئيني جابجا شده به طرف p*I* اسيدي ديده نمي‌شود. از طرف ديگر ما در اين تحقيق نشان داديم که در گياهان RILs مقاوم به باکتري (والد مقاوم اين گياهان رقم F83005.5 است رجوع به بخش مواد و روش‌ها) در هر دو شرايط تلقيح و عدم تلقيح با باکتري، لکه‌هاي ۲ و ۳ مربوط به اين پروتئين به طرف p*I* اسيدي‌تر جابجا شده‌اند (شکل ۴). قابل ذکر است که توالي پروتئين peptidyl-prolyl cis-trans isomerase بدست آمده در اين تحقيق با توالي گزارش شده توسط ترايف و همکاران (۲۰۰۹) کاملا يکسان و با p*I*، ۸/۳ و وزن مولکولي ۱۸/۱ کيلو دالتون بودند. همچنين در گياه آرابيدوپسيس گزارش شده است که اين آنزيم باعث فعال شدن فاکتورغير بيماريزاي AvrRpt2 پاتوژن باکتريايي *P. syringae* در داخل سلول گياهي و در نتيجه باعث افزايش مقاومت گياه به اين باکتري مي‌شود (۳۲). توالي اين پروتئين با استفاده از نرم افزار Net phos 2.0 server براي احتمال فسفريله شدن مورد ارزيابي قرار گرفت و ۴ اسيدآمينه سرين با احتمال ۸۷ درصد براي فسفريله شدن شناسايي شدند. از طرف ديگر، همانطور که در قسمت نتايج اشاره شد ميزان بيان اين ژن در سطح mRNA در بين گياهان حساس و مقاوم و همچنين نسبت به گياهان شاهد اختلاف معني‌داري نداشتند (جدول ۴). لذا مي‌توان فهميد که تغيير در اين ژن در بين گياهان حساس و مقاوم به صورت تغييرات پس از ترجمه است و اين تغيير فقط از طريق آزمايشات پروتئوميکس قابل شناسايي مي‌باشد.

نتايج حاصل از اين تحقيق نشان داد که گياه حساس *M. truncatula* نيز قادر است نسبت به پاتوژن *R. solanacearum* واکنش نشان دهد و خيلي از ژن‌هايي که در ارقام مقاوم ميزان بيانشان نسبت به پاتوژن باکتريايي بيشتر مي‌شوند در گياهان حساس نيز بيان اين ژن‌ها بيشتر مي‌شوند و اين نوع مقاومت اوليه در مقالات محققين قبلي نيز تحت عنوان مقاومت PAMP-triggered immunity (PTI) گزارش شده است (۲۶،۳۳). نتايج حاصل از اين تحقيق نشان داد که تفاوت اساسي بين ارقام مقاوم و حساس پس از تلقيح با پاتوژن باکتريايي را در دو موضوع مي‌توان خلاصه کرد:

۱- ميزان افزايش بيان ژن‌هاي مرتبط با مقاومت که در ارقام مقاوم ميزان بيان چنين ژن‌هايي بالاتر از ارقام حساس است (ژن‌هاي شماره ۴، ۸، و ۱۰ از جدول ۱). مشابه اين نتايج در کارهاي محققين ديگر نيز گزارش شده است (۳۴).

۲- پايداري بيان ژن‌هاي مقاومت مثل ژن‌هاي شماره ۴، ۷ و ۸ از جدول شماره ۱ که در گياهان حساس در نمونه‌گيري روز اول پس از تلقيح افزايش بيان و سپس در نمونه‌گيري روز سوم کاهش بيان داشتند ولي همين ژن‌ها در گياهان مقاوم در نمونه‌گيري روز اول پس از تلقيح افزايش بيان و اين افزايش بيان در نمونه‌گيري روز سوم ادامه پيدا کرده و سطح آن از نمونه‌گيري روز اول بيشتر مي‌شوند. اين يافته تاکنون در گزارشات قبلي به روشني اين تحقيق به آن اشاره نشده است. نويسندگان اين مقاله اين موضوع را مرتبط با شکسته شدن مقاومت اوليه (PTI) گياهان حساس *M. truncatula* از طريق توليد فاکتورهاي بيماريزا[10] از طرف پاتوژن

---

[10] -virulence

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

R. solanacearum مي‌دانند كه پاتوژن باكتريايي به كمک اين فاكتورها مي‌تواند مقاومت اوليه گياه را خاموش كند. اين مكانيزم قبلاً نيز بوسيله ديگر محققين در واكنش بين پاتوژن‌هاي موفق و گياه حساس گزارش شده است (۳۶، ۳۵، ۳۳). درصورتي كه در ارقام مقاوم *M. truncatula* محصول R-gene (گيرنده گياهي) فاكتورهاي غير بيماريزاي پاتوژن را شناسايي و مقاومت ثانويه و اختصاصي[11] فعال مي‌شوند كه نتيجه آن پايداري و افزايش بيان ژن‌هاي مرتبط با مقاومت در نمونه‌گيري روز سوم مي‌باشد.

منابع

1. Samaj J, Thelen J (2007). Plant proteomics. Springer-Verlag, New York

2. May G, Dixon R (2004) *Medicago truncatula*. Curr Biol 14:R180–181

3. Frugoli J, Harris J (2001) *Medicago truncatula* on the move! Plant Cell 13:458–463

4.Choi H-K, Kim D, Uhm T, Limpens E, Lim H, Mun J-H, Kalo P, Penmetsa RV, Seres A, Kulikova O, Roe BA, Bisseling T, Kiss GB, Cook DR (2004). A sequence-based genetic map of *Medicago truncatula* and comparison of marker colinearity with *M. sativa.* Genetics 166:1463–1502

5. Young N D, Cannon, SB, Sato, S, Kim, D, Cook, DR, Town, CD, Roe, BA, and Tabata, S (2005). Sequencing the gene spaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. Plant Physiol. 137:1174-1181

6. Hayward AC (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 29:65-87

7.Thoquet P Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Laterrot H, Grimsley N (1996a) Quantitative trait loci determining resistance to bacterial wilt in tomato cultivar Hawaii 7996. Mol Plant- Microbe Interact 9: 826–836

8. Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J, Marco Y (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. Proc Natl Acd Sci USA 99: 2404–2408

9. Vailleau F, Sartorel, E, Jardinaud, MF, Chardon, F, Genin, S, Huguet, T, Gentzbittel, L, Petitprez1, M (2007). Characterization of the Interaction Between the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum* and the Model Legume Plant *Medicago truncatula*. MPMI. 20: 159–167

10. Kiba A, Maimbo, M, Kanda, A, Tomiyama, H, Ohnishi, K, Hikichi, Y (2007). Isolation and expression analysis of candidate genes related to *Ralstonia solanacearum*–tobacco interaction. Plant Biotechnol. 24: 409–416

11. Afroz A, Khan MR, Ahsan N, Komatsu S (2009) Comparative proteomic analysis of bacterial wilt susceptible and resistant tomato cultivars. Peptides 30: 1600-1607

12. Dahal D, Heintz, D, Dorsselaer, AV, Braun, H.P, Wydra, K (2009). Pathogenesis and stress related as well as metabolic proteins are regulated in tomato stems infected with *Ralstonia solanacearum.* Plant Physiol. Biochem. 47**:** 838-846

13. Trapphoff T, Beutner, C, Niehaus, K, Colditz, F (2009). Induction of Distinct Defence-Associated Protein Patterns in Aphanomyces euteiches (Oomycota)-Elicited and –Inoculated Medicago truncatula Cell-Suspension Cultures: A Proteome and Phosphoproteome Approach. MPMI 22:421-436

14. Castillejo M, Maldonado AM, Dumas-Gaudot E, Fernández-Apariciol M, Susín R, Diego R, Jorrín JV (2009) Differential expression proteomics to investigate responses and resistance to Orobanche crenata in *Medicago truncatula*. BMC Genomics 10: 294-311

15. Fahraeus G (1957). The infection of white clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple slide technique. J. Genet. Microbiol. 16:374-381

16. Damerval C, de Vienne D., Zivy M., Thiellement H (1986). Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis 7: 52–54

17. Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis 25: 1327–1333

18. Chinnasamy G, Rampitsch C (2006). Efficient solubilization buffers for two-dimensional gel electrophoresis of acidic and basic proteins extracted from wheat seeds. Biochim. Biophy. Acta 1764: 641 – 644

19. Song J, Braun G, Bevis E, Doncaster K (2006). A simple protocol for protein extraction of recalcitrant fruit tissues suitable for 2-DE and MS analysis. Electrophoresis. 27: 3144–3151

20. Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol. Cell. Biol. 19:1720–1730

21. Futcher B, Latter GI, Monardo P, McLaughlin CS, Garrels JI (1999). A sampling of the yeast proteome. Mol. Cell. Biol. 19: 7357–7368

22. Varshavsky A (1996). The N-end rule: functions, mysteries, uses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12142–12149

23. Harford JB, Morris D. R (1997). Post-transcriptional gene regulation. Wiley-Liss, Inc., New York

24. Wang R, Prince JT, Marcotte EM (2008). Mass spectrometry of the M. smegmatis proteome: Protein expression levels correlate with function, operons, and codon bias. Genome Res. 15: 1118-1126

---

[11] -Effectors-triggered immunity

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]

25. Urlinger S, Kuchler K, Meyer TH, Uebel S, Tamp'e R (1997). Intracellular location, complex formation, and function of the transporter associated with antigen processing in yeast. Eur. J. Biochem. 245:266–272
26. Altenbach D, Robatzek S (2007). Pattern Recognition Receptors: From the Cell Surface to Intracellular Dynamics. MPMI. 20: 1033-1039
27. Muskett P, Parker J (2003). Role of SGT1 in the regulation of plant R gene signalling. Microb. Infec. 5: 969–976
28. Boter M, Amigues B, Peart J, Breuer C, Kadota Y, Casais C, Moore G, Kleanthous C, Ochsenbein F, Shirasu K, Guerois R (2007). Structural and Functional Analysis of SGT1 Reveals That Its Interaction with HSP90 Is Required for the Accumulation of Rx, an R Protein Involved in Plant Immunity. The Plant Cell. 19: 3791–3804
29. Azevedo C, Betsuyaku S, Peart J, Takahashi A, Noel L, Sadanandom A, Casais C, Parker, J, Shirasu K (2006). Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. EMBO J. 25: 2007–2016
30. Peart JR (2002). The ubiquitin ligase-associated protein SGT1is required for host and nonhost disease resistance in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 10865–10869
31. Sangster TA, Queitsch C (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. Curr. Opin. Plant Biol. 8:86–92

32. Coaker G, Falick A, Staskawicz B (2005). Activation of a Phytopathogenic Bacterial Effector Protein by a Eukaryotic Cyclophilin. Science 308 : 548-550
33. Zipfel C (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. Curr. Opin. Immunol. 20:10–16
34. Desender S, Andrivon D, Val F (2007). Activation of defence reactions in Solanaceae: where is the specificity? Cellular Microbiol. 9: 21–30
35. Nomura K, Melotto M, He SY (2005). Suppression of host defense in compatible plant–*Pseudomonas syringae* interactions. Curr Opin Plant Biol. 8:361–368
36. Musser RO, Hum-Musser SM, Eichenseer H, Peiffer M, Ervin G, Murphy JB, Felton GW (2002). Caterpillar saliva beats plant defences. A new weapon emerges in the evolutionary arms race between plants and herbivores. Nature 416:599-600

[DOR: 20.1001.1.20084439.1388.4.4.1.1]