

ORIGINAL ARTICLE

Gene network analysis and finding key genes involved in response to different bacterial strains in tomato

Seyyed Mohsen Sohrabi^{1*}, Ali Akbarabadi², Kamran Samiei³, Anahita Panji⁴

¹Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

²Horticultural Science Research Department, Khuzestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.

³Department of Agronomy and Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

⁴Genetic Engineering, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Correspondence

Seyyed Mohsen Sohrabi
Email: ms.seyyed@gmail.com

How to cite

Sohrabi, S. M., Akbarabadi, A., Samiei, K., & Panji, A. (2023). Gene network analysis and finding key genes involved in response to different bacterial strains in tomato. *Crop Biotechnology*, 12(42), 49-61.

ABSTRACT

Tomato (*Solanum lycopersicum*) is an annual, self-pollinated and diploid plant belonging to the potato family (Solanaceae). Different types of this plant form an important part of the world's diet. Bacterial diseases are one of the most important factors limiting tomato production worldwide. In the present study, by using transcriptome (RNA-seq) analysis followed by gene network analysis, the key genes involved in response to bacterial diseases were identified and their various characteristics were investigated. The results of the transcriptome analysis showed that bacterial pathogens have different effects on the transcriptome of tomato. Further analysis revealed 913 common differentially expressed genes among different bacterial treatments. Network analysis identified five key genes named large guanine nucleotide binding protein, mitogen-activated protein kinase 5, mitogen-activated protein kinase 7, heat shock protein 90 kDa and hop-interacting protein. Further analysis of identified key genes showed that all of them contain biotic stress related regulatory elements (w-box, WRE3 and WUN-motif) in their promoter region and have an important role in responding to biotic stresses. The key genes identified in this research can be used in classic breeding programs or in production of disease-resistant transgenic plants after a more detailed examination.

KEYWORDS

Plant breeding, Plant diseases, Transcriptome, Environmental stresses, Disease resistant plant.

نشریه علمی

زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

آنالیز شبکه ژنی و یافتن ژن‌های کلیدی پاسخ به سویه‌های باکتریایی مختلف در گوجه‌فرنگی

سید محسن سهرابی^{۱*}، علی اکبرآبادی^۲، کامران سمیعی^۳، آناهیتا پنجی^۴

چکیده

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* گیاهی یک‌ساله، خودگشن و دیپلوئید متعلق به خانواده سیب‌زمینی (Solanaceae) است. گونه‌های مختلف گوجه‌فرنگی بخش مهمی از رژیم غذایی مردم جهان را تشکیل می‌دهد. بیماری‌های باکتریایی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید گوجه‌فرنگی در سطح جهان هستند. در این پژوهش با استفاده از آنالیز داده‌های ترنسکریپتومی (RNA-seq) و به دنبال آن آنالیز شبکه‌های ژنی، ژن‌های کلیدی پاسخ به بیماری‌های باکتریایی در گوجه‌فرنگی شناسایی و خصوصیات مختلف آنها بررسی شد. نتایج تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ترنسکریپتوم گیاه گوجه‌فرنگی نشان داد که پاتوژن‌های باکتریایی دارای اثر متفاوتی بر ترنسکریپتوم این گیاه هستند. بررسی بیشتر تغییرات ترنسکریپتومی نشان داد که تعداد ۹۱۳ مورد ژن با بیان متفاوت وجود دارد که بین تیمارهای باکتریایی مختلف مشترک هستند. آنالیز شبکه، پنج ژن کلیدی به نام‌های پروتئین بزرگ متصل‌شونده به نوکلئوتید گوانین، پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن ۵، پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوژن ۷، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ کیلودالتونی بتا و پروتئین برهم‌کنش‌کننده با hop را مشخص کرد. آنالیز پروموتور در ناحیه‌ی بالادست ژن‌های کلیدی نشان داد که همه آنها دارای عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی (W-box، WRE3 و WUN-motif) در ناحیه پروموتوری خود هستند و نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های زیستی ایفا می‌کنند. پس از بررسی‌های بیشتر روی ژن‌های کلیدی شناسایی‌شده در این پژوهش، می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی کلاسیک و یا در تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری بهره برد.

واژه‌های کلیدی

اصلاح نباتات، بیماری‌های گیاهی، ترنسکریپتوم، تنش‌های محیطی، گیاهان مقاوم به بیماری.

^۱گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
^۲بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران.
^۳گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.
^۴گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

نویسنده مسئول:

سید محسن سهرابی

رایانامه: ms.seyyed@gmail.com

استناد به این مقاله:

سهرابی، سید محسن، اکبرآبادی، علی، سمیعی، کامران و پنجی، آناهیتا (۱۴۰۲). آنالیز شبکه ژنی و یافتن ژن‌های کلیدی پاسخ به سویه‌های باکتریایی مختلف در گیاه گوجه‌فرنگی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۲)، ۴۹-۶۱.

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* گیاهی یک‌ساله، خودگشن، دیپلوئید ($2n = 2x = 24$) از خانواده سیب‌زمینی (Solanaceae) است که سازگاری مناسبی با آب و هوای گرمسیری دارد. این گیاه در اصل بومی مناطقی از آمریکای مرکزی و جنوبی بوده و از آنجا به سایر مناطق جهان انتقال یافته است. امروزه ارقام مختلفی از گوجه‌فرنگی در سرتاسر جهان کشت داده می‌شود و این گیاه به صورت خام و فرآوری شده بخش مهمی از رژیم غذایی مردم جهان را تشکیل می‌دهد (Gerszberg et al., 2015; Kumar et al., 2021). تنش‌های محیطی و به ویژه آفات و بیماری‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده تولید گوجه‌فرنگی در سطح جهان هستند (Gatahi, 2020).

پاتوژن‌های باکتریایی عامل ایجاد بیماری‌های مهمی در گیاهان زراعی بوده و باعث ایجاد خسارت به محصولات کشاورزی می‌شوند. امروزه روش‌های جدید بیماری‌شناسی مولکولی و زیست‌شناسی مولکولی به طور عمده در پی شناسایی مکانیسم‌های کنترل کننده پاسخ گیاهان به پاتوژن‌های گیاهی و برهم‌کنش پاتوژن-گیاه هستند (Kumar & Verma, 2018; Cheng et al., 2019). اغلب برهم‌کنش‌های گیاه و پاتوژن‌های باکتریایی به صورت اختصاصی عمل کرده و وابسته به اتصال مولکول‌های سطح سلولی در پاتوژن و گیاه است. مطالعات مختلفی نشان داده‌اند که برهم‌کنش گیاه و پاتوژن‌های باکتریایی شامل مکانیسم‌های شناسایی مولکولی بین گیاه و پاتوژن است. برای مثال، ژن مقاومت *Pto* در گوجه‌فرنگی که یک پروتئین کیناز سیتوپلاسمی را تولید می‌کند، به طور مستقیم با پروتئین *Pseudomonas syringae* pv. *avrPto avr* پاتوژن باکتریایی *syringae* برهم‌کنش کرده و باعث ایجاد مقاومت گیاه در برابر باکتری می‌شود (Pedley & Martin, 2003; Agrios, 2005).

بازسازی و بررسی شبکه‌های تنظیمی ژنی، امکان شناسایی روابط بین ژن‌های مختلف گیاه در پاسخ به تنش‌های محیطی و از جمله بیماری‌ها را فراهم کرده و تعیین ژن‌های کلیدی دخیل در این گونه پاسخ‌ها را ایجاد می‌کند (Long et al., 2008; Martinelli et al., 2013; Heidari et al., 2015). برای شناسایی ژن‌های کلیدی موجود در یک شبکه ژنی، روش‌های گوناگونی وجود دارد که یکی از بهترین آنها استفاده از رتبه‌بندی ژن‌های موجود در شبکه بر اساس الگوریتم‌های مختلف رتبه‌بندی است. در این روش با استفاده از الگوریتم‌های رتبه‌بندی مختلف موجود در نرم‌افزارهایی مانند Cytohubba، می‌توان ژن‌های

کلیدی دارای بهترین رتبه‌ها را در یک شبکه شناسایی کرد (Chin et al., 2014). بازسازی و بررسی شبکه‌های تنظیمی ژنی بر اساس داده‌های ترنسکریپتومی حاصل از روش‌های میکروآرای و توالی‌یابی نسل جدید و بررسی نواحی تنظیمی موجود در ژن‌های کلیدی، کمک قابل توجهی به محققان در شناسایی ژن‌های کلیدی و نقش آنها در فرآیندهای مختلف مانند پاسخ گیاهان به حملات پاتوژن‌ها می‌کند (Martinelli et al., 2013; Heidari et al., 2015; Nobori et al., 2020).

واکنش‌های گیاهان نسبت به حمله پاتوژن‌ها با پیچیدگی‌های زیادی همراه بوده و در آن ژن‌های زیادی که در فرآیندهای دفاعی دخیل هستند، تحریک می‌شوند (Jwa et al., 2006). گیاهانی که تحت تأثیر حمله پاتوژن قرار گرفته‌اند، در مرحله‌ی اول ممکن است موانع ساختاری مختلفی مانند لیگنین و سوبرین را برای جلوگیری از پیشرفت پاتوژن ایجاد کنند که این امر در گیاهان لوبیا و آرابیدوپسیس پس از آلودگی توسط پاتوژن‌های *P. syringae* و *Verticillium dahliae* مشاهده شده است (Milosevic & Slusarenko, 1996; Yao et al., 2015). در مراحل بعدی، گیاهان با فعال کردن مکانیسم‌هایی مانند القاء و تجمع پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) و فیتوالکسین‌ها به حملات پاتوژن‌ها پاسخ داده و با آنها مقابله می‌کنند (Henriquez et al., 2012; Derksen et al., 2013). در این بین، گیاهان در طول حملات پاتوژن‌ها گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را تولید می‌کنند که رادیکال‌های سمی هستند و به عنوان محصولات جانبی فرآیندهای مختلف در سلول‌های زنده تولید می‌شوند (Mehdy, 1994; Bolwell & Wojtaszek, 1997). این گونه‌های فعال اکسیژن در طول حملات پاتوژن‌ها می‌توانند به عنوان مولکول‌های کشنده یا پیام دهنده عمل کرده و برای فعال کردن مکانیسم‌های مقاومت اکتسابی سیستمیک عمل نمایند (Noctor & Foyer, 1998; Sharma et al., 2012; Wang et al., 2014).

اغلب پروتئین‌های R یا مقاومت میزبان به طور معمول فاکتورهای نسخه‌برداری و یا پروتئین‌های دخیل در پیام‌دهی سلولی هستند که خانواده پروتئین‌های متصل به نوکلئوتید حاوی تکرار غنی از لوسین (NB-LRR) نمونه‌هایی از آنها هستند. این پروتئین‌های کلیدی تمامی واکنش‌های گیاهان در پاسخ به حملات پاتوژن‌ها را تنظیم کرده و به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی نقش مهمی در محافظت از گیاهان بازی می‌کنند. تاکنون خانواده‌های مختلفی از فاکتورهای نسخه‌برداری و پروتئین‌های

شده نرمال بودند، خوانش‌های مربوط به هر تیمار باکتریایی در سه تکرار به طور مجزا با سه تیمار شاهد بدون باکتری با استفاده از نرم‌افزار Excel 2010 مورد مقایسه قرار گرفتند. در این مقایسه ابتدا میانگین تیمارهای باکتریایی و شاهد برای هر سویه باکتری محاسبه شد و بر اساس آن میزان تغییرات بیان هر ژن (FC) Fold change محاسبه گردید. در مرحله‌ی بعد، به منظور تعیین ژن‌های افزایش یا کاهش بیان یافته، لگاریتم در پایه ۲ تغییرات بیان (Log_2FC) محاسبه گردید. علامت منفی و مثبت مقدار Log_2FC به ترتیب به معنی کاهش بیان و افزایش بیان ژن‌های مورد نظر بود. در نهایت، به منظور بررسی آماری تغییرات بیان، از آزمون t استفاده گردید و p. value و False Discovery rate (FDR) محاسبه شدند. به منظور به دست آوردن ژن‌های با بیان متفاوت معنی‌دار بین تیمارهای باکتریایی و شاهد، فیلتر کردن بر اساس دو پارامتر FDR و Log_2FC صورت گرفت. ابتدا داده‌ها بر اساس FDR کمتر از ۰/۰۵ و فیلتر ژن‌های با تفاوت بیان معنی‌دار مشخص شدند و در مرحله‌ی بعد، فیلتر کردن بر اساس Log_2FC بیشتر از قدر مطلق ۱ صورت گرفت. پس از انجام فیلتر کردن بر اساس FDR و Log_2FC ، ژن‌های با بیان متفاوت (Differentially Expressed Genes: DEGs) معنی‌دار بین هر تیمار باکتریایی با تیمار شاهد مشخص شدند. برای به دست آوردن ژن‌های با بیان متفاوت مشترک بین تیمارهای باکتریایی مختلف از نرم‌افزار آنالیز Venn (InteractiVenn) استفاده شد (Heberle et al., 2015).

ترسیم شبکه ژنی، آنالیز شبکه ژنی و تعیین ژن‌های کلیدی شبکه ژنی

ترسیم شبکه ژنی، آنالیز شبکه ژنی و تعیین ژن‌های کلیدی شبکه ژنی با استفاده از پایگاه STRING v11 (<https://string-db.org>) و نرم‌افزار Cytoscape v3.9.1 صورت گرفت (Shannon et al., 2003; Szklarczyk et al., 2019). به این منظور، ژن‌های با بیان متفاوت مشترک بین تیمارهای باکتریایی وارد پایگاه STRING v11 شده و ژن‌های برهم‌کنش کننده با آنها با میزان اطمینان بالا شناسایی شدند. لیست ژن‌های برهم‌کنش کننده خروجی از پایگاه STRING v11 وارد نرم‌افزار Cytoscape v3.9.1 شده و شبکه برهم‌کنشی ژن‌های با بیان متفاوت ترسیم گردید. در مرحله‌ی بعد، از ۱۲ الگوریتم (شامل

دخیل در پیام‌دهی سلولی در گیاهان مختلف شناسایی شده‌اند (Zhang & Klessig, 2001; Singh et al., 2002; McHale et al., 2006). به طور مثال، در گوجه فرنگی تعداد ۳۵۵ ژن NB-LRR شناسایی شده است (Piquerez et al., 2014). با این حال، به دلیل عدم غربال‌گری و شناسایی ژن‌های کلیدی از بین این ژن‌های شناسایی شده، نقش ژن‌های مذکور به خوبی شناخته نشده است.

با توجه به موارد مذکور و نظر به اهمیت اقتصادی گوجه‌فرنگی، هدف از انجام این پژوهش، آنالیز داده‌های ترنسکریپتومی و یافتن ژن‌های دارای نقش کلیدی در پاسخ گیاه گوجه فرنگی نسبت به بیماری‌های باکتریایی است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌ها

در این مطالعه، از پنج مجموعه داده توالی‌یابی RNA بافت برگ گوجه‌فرنگی رقم RioGrande تلقیح شده با سویه‌های باکتریایی مختلف *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*، *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas fluorescens* تیمار شاهد بدون باکتری بودند استفاده شد. داده‌های مذکور که حاوی تعداد خوانش‌های مربوط به هر نمونه در ۳ تکرار بودند، از پایگاه (Tomato Functional Genomics (TFGD) Database (<http://ted.bti.cornell.edu>) دریافت شدند (Fei et al., 2010). داده‌های خام این آزمایش با شماره دسترسی PRJNA214335 در پایگاه NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) در دسترس هستند. در آزمایش مربوط به این مجموعه‌های داده، سویه باکتری *P. syringae* pv. *tomato* به میزان 5×10^6 cfu/mL و سویه‌های *P. putida* و *P. fluorescens* به میزان 10^8 cfu/mL به برگ‌های گیاهان چهار هفته‌ای تزریق شده بودند. همچنین برای تیمار شاهد بدون باکتری، کلرید منیزیم با غلظت ۱۰ میلی‌مولار برگ‌های گیاهان چهار هفته‌ای تزریق شده بود. نمونه‌برداری برای تیمارهای باکتریایی و شاهد ۶ ساعت پس از تزریق انجام گرفته بود.

تجزیه و تحلیل بیان و بدست آوردن ژن‌های با بیان متفاوت

پس از جمع‌آوری داده‌ها که حاوی خوانش‌های مستندسازی

(<https://bioinformatics.psb.ugent.be/>) PlantCare، (PlantPAN و [webtools/plantcare/html](http://webtools.plantcare/html)) <http://plantpan.itsps.ncku.edu.tw/plantpan4/index>.) (html) مورد بررسی قرار گرفت و عناصر تنظیمی موجود در آنها مشخص گردید (Higo *et al.*, 1999; Lescot *et al.*, 2002; Chow *et al.*, 2019).

بررسی بیان بافتی ژن‌های کلیدی شناسایی شده

برای تعیین میزان بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده در بافت‌های مختلف گیاه گوجه فرنگی، از پایگاه داده ژنومیکس عملکردی گوجه فرنگی (TFGD) استفاده شد (Fei *et al.*, 2010). ابتدا مجموعه داده‌های مربوط به ترنسکرپتوم بافت‌های مختلف گوجه فرنگی شامل برگ، ریشه، جوانه، گل، میوه نارس و میوه رسیده که میانگین سه تکرار بودند و به صورت RPKM موجود بودند از پایگاه TFGD دریافت شد. در مرحله‌ی بعد، میانگین میزان بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده در هر بافت محاسبه شد و نقشه حرارتی (Heatmap) تمامی ژن‌ها با استفاده از ابزار آنلاین Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca>) ترسیم گردید (Babicki *et al.*, 2016).

نتایج

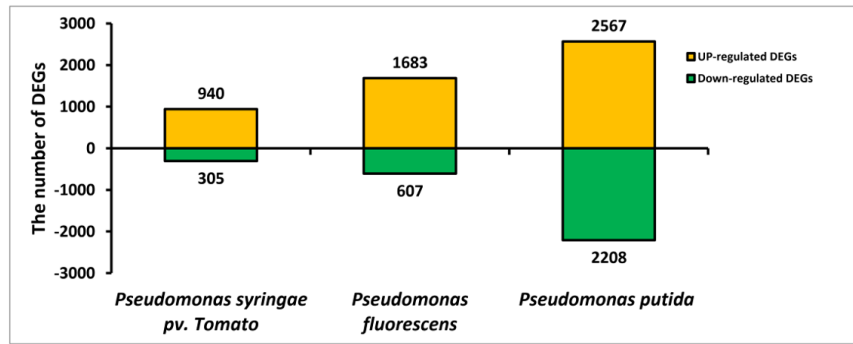
تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ترنسکرپتوم گیاه گوجه فرنگی نشان داد که پاتوژن‌های باکتریایی دارای اثر متفاوتی بر ترنسکرپتوم این گیاه هستند و آلودگی گیاه گوجه فرنگی با باکتری‌های مذکور تعداد ژن‌های متفاوتی را تحریک به افزایش یا کاهش بیان می‌کند (شکل ۱).

بررسی تغییرات ترنسکرپتومی مشخص کرد که بیشترین تعداد DEGها در آلودگی برگ گوجه فرنگی با باکتری *P. putida* است، در حالی که کمترین تعداد DEGها در آلودگی برگ گوجه فرنگی با باکتری *P. syringae* pv. *tomato* مشاهده می‌شود. بررسی تغییرات ترنسکرپتومی همچنین نشان داد که به طور کلی در تمام تیمارهای باکتریایی، تعداد DEGهای افزایش بیان یافته بیشتر از تعداد DEGهای با کاهش بیان بود (شکل ۱). بررسی بیشتر تغییرات ترنسکرپتومی، تعداد ۹۱۳ مورد DEG مشترک را بین تیمارهای باکتریایی مختلف نشان داد (شکل ۲).

.Closeness .BottleNeck .Betweenness .DMNC .Degree .ClusteringCoefficient (Stress و Radiality) MNC .MCC .EPC .EcCentricity موجود در افزونه Cytohubba نرم‌افزار v3.9.1 برای آنالیز شبکه برهم‌کنشی ترسیم شده استفاده شد (Chin *et al.*, 2014). در نهایت، بر اساس رتبه‌بندی نهایی ۱۲ الگوریتم مختلف، ۵ ژن انتخاب و به عنوان ژن‌های کلیدی در نظر گرفته شدند.

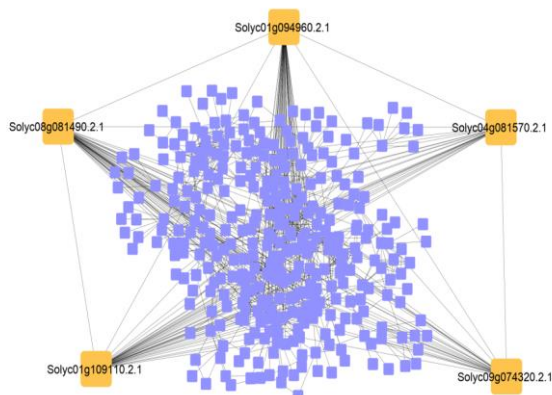
بررسی ویژگی ژن‌های کلیدی شناسایی شده

توالی ژن و پروتئینی ژن‌های کلیدی شناسایی شده از بانک ژن و پروتئین پایگاه NCBI دریافت شد. تعداد اینترون‌ها و اگزون‌های موجود در توالی ژنی، طول توالی کد کننده و توالی پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI 10.3 و نرم‌افزار آنلاین FGENESH (<http://linux1.softberry.com>) مشخص گردید (Solovyev *et al.*, 2006). وجود یا عدم وجود دمین‌های عملکردی محافظت شده در ساختار توالی پروتئینی ژن‌های کلیدی شناسایی شده با سه نرم‌افزار آنلاین Interproscan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence>)، Pfam (<http://pfam.xfam.org>) و CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) پایگاه NCBI مشخص گردید و دمین‌هایی که همزمان با سه ابزار آنلاین مورد تأیید قرار گرفته بودند، به عنوان دمین عملکردی محافظت شده نهایی در نظر گرفته شدند (Jones *et al.*, 2014; Marchler-Bauer *et al.*, 2015; El-Gebali *et al.*, 2019). وجود یا عدم وجود سیگنال پپتید و همچنین محل تجمع سلولی محصول ژن‌های کلیدی شناسایی شده با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین SignalP 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0>) و CELLO2GO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/cello2go>) مشخص گردید (Yu *et al.*, 2014; Almagro Armenteros *et al.*, 2019). به منظور آنالیز پروموتور ژن‌های کلیدی شناسایی شده، ابتدا ۱۵۰۰ جفت باز از ناحیه بالادست ژن‌های مذکور (قبل از کدون شروع ATG) از ژنوم گیاه گوجه فرنگی (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) موجود در بانک ژنوم پایگاه NCBI دریافت شد. سپس نواحی بالادست با استفاده از نرم‌افزارهای آنلاین PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>)



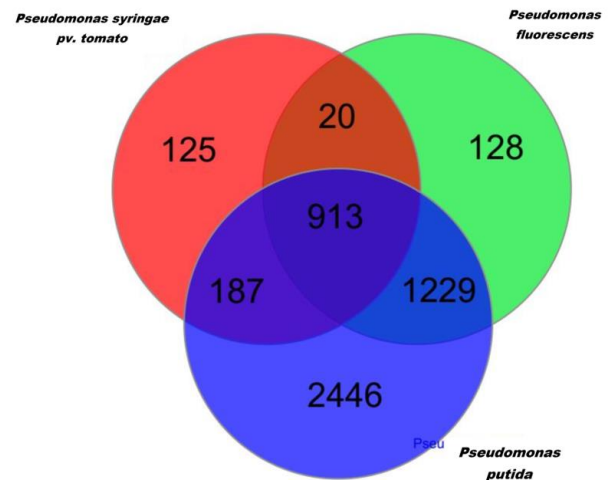
شکل ۱. تجزیه و تحلیل تغییرات بیان ترنسکریپتوم گیاه گوجه‌فرنگی در اثر آلودگی با پاتوژن‌های باکتریایی. اعداد انتهایی ستون‌ها نشان دهنده تعداد DEG های افزایش یا کاهش بیان یافته هستند.

فعال شده با میتوزن ۷ با شماره شناسایی Solyc08g081490، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ کیلودالتونی بتا با شماره شناسایی Solyc04g081570 و پروتئین برهم‌کنش کننده با hop با شماره دسترسی Solyc09g074320 بودند (شکل ۳).



شکل ۳. شبکه ژنی DEGsهای مشترک بین تمام تیمارهای باکتریایی

بررسی ساختار نوکلئوتیدی و پروتئینی ژن‌های کلیدی شناسایی شده نشان داد که ژن Solyc01g109110 دارای چارچوب خوانش بازی به طول ۲۷۱۲ جفت باز است که توسط ۷ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۹۰۳ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن فاقد توالی سیگنال پپتید بوده، در هسته سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود دارای دمین محافظت شده G-alpha است (جدول ۱). بررسی ژن Solyc08g081490 مشخص کرد که این ژن دارای چارچوب خوانش بازی به طول ۱۱۴۰ جفت باز است که توسط ۵ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۳۷۹ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن فاقد توالی سیگنال پپتید بوده، در سیتوپلاسم سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود دارای دمین



شکل ۲. نمودار Venn برای مقایسه ژن‌های با بیان متفاوت حاصل از آلودگی برگ گوجه‌فرنگی با باکتری‌های مختلف

مقایسه ژن‌های با بیان متفاوت نشان داد که آلودگی بافت برگ با باکتری *P. syringae* pv. *tomato* دارای تعداد ۱۲۵ مورد DEG اختصاصی است. برای آلودگی با باکتری *P. fluorescens* نیز تعداد ۱۲۸ مورد DEG اختصاصی مشاهده شد. در نهایت، آلودگی بافت برگ با باکتری *P. putida* دارای بیشترین میزان DEG اختصاصی و به تعداد ۲۴۴۶ بود (شکل ۲). پس از ترسیم و آنالیز شبکه ژنی DEGsهای مشترک بین تمام تیمارهای باکتریایی و بر اساس رتبه‌بندی نهایی، ۵ ژن انتخاب و به عنوان ژن‌های کلیدی در نظر گرفته شدند (شکل ۳).

پنج ژن کلیدی شناسایی شده در این پژوهش عبارت از پروتئین بزرگ متصل شونده به نوکلئوتید گوانین با شماره شناسایی Solyc01g109110، پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن ۵ با شماره شناسایی Solyc01g094960، پروتئین کیناز

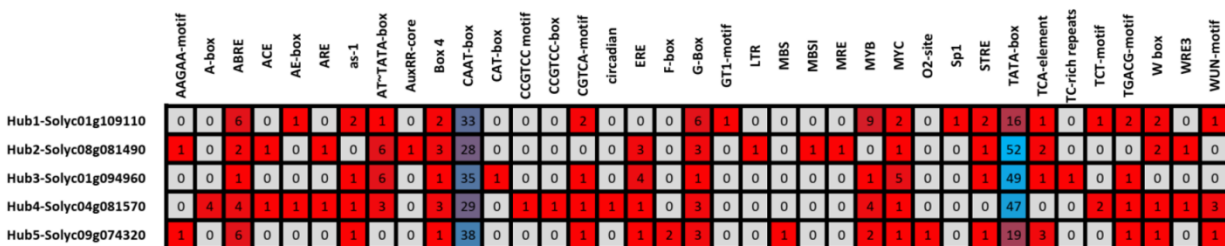
دارای زمین‌های محافظت شده MPP، PLN02153 و Kelch_4 است (جدول ۱).

آنالیز پروموتور، وجود عناصر هسته پروموتوری، تشدید کننده، پاسخ به نور، پاسخ به تنش‌های محیطی و پاسخ به هورمون‌ها را در ناحیه پروموتوری ژن‌های کلیدی شناسایی شده نشان داد (شکل ۴). در بین عناصر تنظیمی عمومی، عناصر تنظیمی هسته پروموتوری (TATA-box و CAAT-box) دارای بیشترین فراوانی در تمامی ژن‌های کلیدی شناسایی شده بودند (شکل ۴). عناصر تنظیمی پاسخ به هورمون‌های آبسازیک اسید (ABRE)، اتیلن (ERE)، سالیسیلیک اسید (TCA-element)، متیل جاسمونات (TGACG-motif و CGTCA-motif) در ناحیه پروموتوری همه یا اغلب ژن‌های کلیدی وجود داشتند (شکل ۴). عناصر تنظیمی پاسخ به نور (Box 4 و G-Box) نیز جزء فراوان‌ترین عناصر تنظیمی در ناحیه پروموتوری همه یا اغلب ژن‌های کلیدی بودند (شکل ۴). عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی (WRE3، w-box و WUN-motif) و تنش‌های غیرزیستی (STRE و MYC) نیز در ناحیه پروموتوری همه یا اغلب ژن‌های کلیدی وجود داشتند (شکل ۴).

محافظت شده STKc-TEY-MAPK است (جدول ۱). ژن Solyc01g094960 دارای چارچوب خوانش بازی به طول ۱۱۲۲ جفت باز است که توسط ۵ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۳۷۳ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن فاقد توالی سیگنال پپتید بوده، در سیتوپلاسم سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود دارای زمین محافظت شده STKc-TEY-MAPK است (جدول ۱). ژن Solyc04g081570 دارای چارچوب خوانش بازی به طول ۲۴۳۹ جفت باز است که توسط ۱۴ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۸۱۲ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن دارای توالی سیگنال پپتیدی به طول ۲۳ اسید آمینه بوده، در شبکه اندوپلاسمی سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود دارای زمین‌های محافظت شده HSP90 و HATPase است (جدول ۱). ژن Solyc09g074320 چارچوب خوانش بازی به طول ۲۶۳۷ جفت باز است که توسط ۲۰ اینترون قطع شده و پروتئینی به طول ۸۷۸ اسید آمینه را تولید می‌کند. این ژن فاقد توالی سیگنال پپتید بوده، در سیتوپلاسم سلول تجمع پیدا کرده و در ساختار پروتئینی خود

جدول ۱. مشخصات ساختاری ژن‌های کلیدی شناسایی شده

نام ژن	طول چارچوب خوانش باز (جفت باز)	تعداد اینترون	تعداد اگزون	طول توالی پروتئینی (اسید آمینه)	سیگنال پپتید	طول سیگنال پپتید (اسید آمینه)	تجمع سلولی	زمین‌های محافظت شده
Solyc01g109110	۳۷۱۲	۷	۸	۹۰۳	ندارد	-	هسته	G-alpha
Solyc08g081490	۱۱۴۰	۵	۶	۳۷۹	ندارد	-	سیتوپلاسم	STKc-TEY-MAPK
Solyc01g094960	۱۱۲۲	۵	۶	۳۷۳	ندارد	-	سیتوپلاسم	STKc-TEY-MAPK
Solyc04g081570	۲۴۳۹	۱۴	۱۵	۸۱۲	دارد	۲۳	شبکه اندوپلاسمی	HSP90 and HATPase
Solyc09g074320	۲۶۳۷	۲۰	۲۱	۸۷۸	ندارد	-	سیتوپلاسم	MPP, PLN02153 and Kelch_4



شکل ۴. آنالیز نواحی پروموتوری ژن‌های کلیدی شناسایی شده. اعداد نشان دهنده تعداد عناصر تنظیمی شناسایی شده هستند.

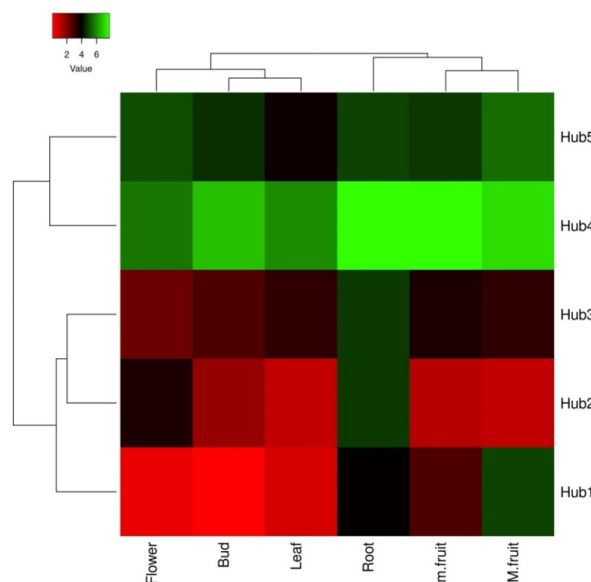
بحث

نتایج تحلیل ترنسکریپتوم بیشترین و کمترین تعداد DEGها را به ترتیب برای باکتری‌های *P. putida* و باکتری *P. syringae* pv. *tomato* مشخص کرد و همچنین نشان داد که فراوانی DEGهای افزایش بیان یافته نسبت به DEGهای کاهش بیان بیشتر است. باکتری‌های *P. putida* و *P. fluorescens* هر دو باکتری غیربیماری‌زای گیاهی و از عوامل بیوکنترلی هستند و به احتمال زیاد در مواجهه با میزبان‌های گیاهی با روش متفاوتی نسبت به عوامل بیماری‌زا مانند باکتری *P. syringae* pv. *tomato* عمل می‌کنند. این مواجهه متفاوت باعث ایجاد پاسخ‌های رشدی و ترنسکریپتومی متفاوت و تفاوت در تعداد DGEهای تحریک شده خواهد شد. بررسی بیشتر تغییرات ترنسکریپتومی نشان داد که تعداد ۹۱۳ مورد DEG وجود دارد که بین تیمارهای باکتریایی مختلف مشترک هستند. این نشان می‌دهد که با وجود تفاوت در باکتری‌ها، گیاه میزبان از مکانیسم‌های تقریباً یکسانی برای مواجهه با آنها استفاده کرده و ژن‌های مشترکی را بیان می‌کند.

آنالیز شبکه ژنی DEGهای مشترک تعداد پنج ژن کلیدی پروتئین بزرگ متصل شونده به نوکلئوتید گوانین با شماره شناسایی Solyc01g109110، پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن ۵ با شماره شناسایی Solyc01g094960، پروتئین کیناز فعال شده با میتوژن ۷ با شماره شناسایی Solyc08g081490، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ کیلودالتونی بتا با شماره شناسایی Solyc04g081570 و پروتئین برهم کنش کننده با hop با شماره دسترسی Solyc09g074320 را مشخص کرد.

بررسی عملکردی نشان داد که ژن کلیدی شناسایی شده Solyc01g109110 یک پروتئین G است و عضوی از خانواده‌ای است که پروتئین‌های اتصال به نوکلئوتید گوانین نیز نامیده می‌شوند. پروتئین‌های G متعلق به گروه بزرگتری از آنزیم‌ها به نام GTPase هستند. پروتئین‌های این خانواده به عنوان سوئیچ‌های مولکولی در داخل سلول عمل می‌کنند و در انتقال پیام محرک‌های خارج سلولی به درون سلول نقش دارند (Urano & Jones, 2014). پروتئین‌های G نقش مهمی در پاسخ ایمنی ذاتی گیاه دارند. هنگام حمله عوامل بیماری‌زای پروتئین‌های G فعال شده و مجموعه‌ای از رویدادها را آغاز می‌کنند که در نهایت منجر به فعال شدن پاسخ‌های دفاعی در گیاهان می‌شود. این فرآیند شامل تنظیم کانال‌های یونی،

بررسی بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده، روند بیان متفاوتی را برای این ژن‌ها در بافت‌های مختلف گیاه گوجه‌فرنگی نشان داد (شکل ۵). ژن کلیدی Solyc01g109110 (Hub 1) بیشترین میزان بیان را در بافت میوه رسیده و کمترین میزان بیان را در بافت جوانه نشان داد (شکل ۵). ژن کلیدی Solyc08g081490 (Hub 2) بیشترین و کمترین میزان بیان را به ترتیب در بافت‌های ریشه و برگ نشان داد (شکل ۵). ژن کلیدی Solyc01g094960 (Hub 3) دارای بیشترین میزان بیان در بافت ریشه و کمترین میزان بیان در بافت گل بود (شکل ۵). ژن کلیدی Solyc04g081570 (Hub 4) دارای میزان بیان نسبتاً بالایی در اغلب بافت‌های گیاه گوجه‌فرنگی بود ولی بیشترین میزان بیان آن در بافت‌های ریشه و میوه نارس و کمترین میزان بیان آن در بافت گل مشاهده شد (شکل ۵). در نهایت، بیشترین و کمترین میزان بیان ژن کلیدی Solyc09g074320 (Hub 5) به ترتیب در بافت‌های میوه رسیده و برگ مشاهده شد (شکل ۵). نتایج بررسی بیان نشان داد که ژن‌های کلیدی Solyc01g109110 (Hub 1)، Solyc08g081490 (Hub 2) و Solyc01g094960 (Hub 3) با هم دارای روند بیان نسبتاً یکسانی بودند و ژن‌های کلیدی Solyc04g081570 (Hub 4) و Solyc09g074320 (Hub 5) با هم روند بیان نسبتاً مشابهی را نشان دادند (شکل ۵).



شکل ۵. نمودار حرارتی میزان بیان ژن‌های کلیدی شناسایی شده در بافت‌های مختلف گیاه گوجه‌فرنگی. میزان بیان بر اساس میانگین Log2RPKM در سه تکرار محاسبه شده است.

بیماری کپک خاکستری *Botrytis cinerea* شد (Zhang et al., 2018).

پروتئین‌های شوک حرارتی (HSPs)، خانواده‌ای از پروتئین‌ها هستند که به چاپرون‌ها معروف بوده و توسط گیاهان و در پاسخ به قرار گرفتن در معرض شرایط تنش تولید می‌شوند. این پروتئین‌ها ابتدا در رابطه با شوک حرارتی شناسایی شدند اما بعدها مشخص شد که در سایر تنش‌های غیر زیستی و همچنین تنش‌های زیستی نقش بازی می‌کنند (Lindquist & Craig, 1988; Waters & Vierling, 2020). پروتئین‌های شوک حرارتی در گیاه فلفل با برهم‌کنش با فاکتورهای بیماری‌زایی *X. campestris* pv *vesicatoria* باعث القای مرگ سلولی و ایجاد مقاومت نسبت به آلودگی پاتوژن مذکور می‌شوند (Kim & Hwang, 2015). القای پروتئین‌های شوک حرارتی در گیاه توتون باعث القای مقاومت علیه باکتری عامل بیماری پژمردگی باکتریایی *Ralstonia solanacearum* می‌شود (Maimbo et al., 2007). در گیاه کاساوا، پروتئین‌های مرتبط با اتوفازی با برهم‌کنش با پروتئین‌های شوک حرارتی باعث ایجاد مقاومت در برابر پاتوژن عامل بلایت *X. axonopodis* pv *manihotis* می‌شوند.

بررسی عملکردی نشان داد که ژن کلیدی شناسایی شده Solyc09g074320 یک پروتئین اسید متالوفسفاتاز ارغوانی است. پروتئین‌های این خانواده بزرگترین گروه اسید فسفاتازها بوده و به دلیل وجود یون‌های فلزی مانند آهن در ساختار آنها باعث ایجاد رنگ ارغوانی یا بنفش در محلول آبی شده و اسید متالوفسفاتاز ارغوانی نامیده می‌شوند (Bhadouria & Giri, 2022). پروتئین‌های این گروه به طور عمده در حفظ هموستازی فسفات در سلول نقش داشته، با این حال، نقش آنها در فرآیندهای متعدد گیاهی مانند گل‌دهی، توسعه ریشه، توسعه بذر، پیری، متابولیسم کربن، انتقال پیام‌های سلولی، پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی سیگنال دهی نیز اثبات شده است (Olczak et al., 2003; Bhadouria & Giri, 2022). در گوجه فرنگی، اسید متالوفسفاتاز ارغوانی باعث تولید ROS شده و با ایجاد انفجار اکسیداتیو باعث ایجاد مقاومت علیه حمله پاتوژن می‌شود (Bozzo et al., 2002; Bhadouria & Giri, 2022). گزارشی مشخص شد که یک اسید متالوفسفاتاز ارغوانی برای ایجاد مقاومت علیه باکتری *P. syringae* pv *syringae* آراییدوپسیس مورد نیاز بوده و جهش یافته‌های مربوط به ژن مذکور حساسیت بالایی را نسبت به این پاتوژن باکتریایی نشان

پروتئین‌های کینازها و سایر اجزای انتقال پیام است. پروتئین‌های G برای عملکرد مناسب سیستم ایمنی ذاتی گیاه ضروری هستند و اختلال در تنظیم آنها می‌تواند منجر به افزایش حساسیت به عوامل بیماری‌زا شود (Trusov & Botella, 2016). در مطالعه‌ای که روی گیاه آراییدوپسیس صورت گرفت مشخص شد که پروتئین‌های G برای مقاومت کامل بیماری در برابر سویه‌های مختلف باکتری *P. syringae* مورد نیاز بوده و فقدان آن باعث ایجاد حساسیت نسبت به این سویه‌ها خواهد شد (Torres et al., 2013). در مطالعات مشابهی گیاه آراییدوپسیس جهش یافته برای پروتئین‌های G مقاومت خود را در برابر پاتوژن‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی مختلفی مانند CMV، TuMV، *Fusarium Agrobacterium tumefaciens*، *syringae* از دست داد (Ishikawa, 2009; Torres et al., 2013; Maruta et al., 2015; Brenya et al., 2016).

بررسی عملکردی نشان داد که ژن‌های کلیدی شناسایی شده Solyc01g094960 و Solyc08g081490، هر دو از خانواده پروتئین‌های کیناز فعال شده با میتوژن بودند. پروتئین‌های کینازهای فعال شده با میتوژن (MAPKs) خانواده‌ای از پروتئین‌های کینازها هستند که به طور اختصاصی اسیدهای آمینه سرین و ترئونین را فسفریله می‌کنند و در واقع سرین-ترئونین کیناز هستند (Zhang & Klessig, 2001; Bigeard & Hirt, 2018). این پروتئین‌ها در موجودات مختلف وجود داشته و نقش مهمی در عملکردهای سلولی (از جمله تقسیم سلولی، تنظیم بیان ژن، تمایز، میتوز، آپوپتوز و غیره) و پاسخ به محرک‌ها و تغییرات محیطی بازی می‌کنند (Zhang & Klessig, 2001; Meng & Zhang, 2013). پروتئین‌های کیناز MPK3، MPK4 و MPK6 در گیاهان آراییدوپسیس و گوجه فرنگی واسطه‌های کلیدی پاسخ به تنش‌های غیر زیستی اسمزی، اکسیداتیو، سرما و تنش‌های زیستی هستند (Göhre & Robatzek, 2008; Pitzschke et al., 2009; Cristina et al., 2010; Sinha et al., 2011). پروتئین کیناز MPK6 گیاه برنج تنظیم کننده‌ی منفی مقاومت نسبت به بیماری‌های باکتریایی بوده و به طور منفی مقاومت گیاه برنج را در برابر پاتوژن‌های باکتریایی تنظیم می‌کند. سرکوب یا حذف کیناز MPK6، مقاومت برنج را در برابر سویه‌های مختلف باکتری *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae* عامل بلایت باکتریایی افزایش داد (Yuan et al., 2007). حذف کیناز MAPK3 از گیاه گوجه فرنگی، مقاومت این گیاه نسبت به

پاسخ این ژن‌ها به پاتوژن‌های مختلف ضروری بوده و در صورت عدم وجود این عناصر تنظیمی، ژن‌های کلیدی شناسایی شده فاقد عملکرد مناسب در مواجهه با پاتوژن‌ها خواهند بود.

در این پژوهش با استفاده از یک رویکرد مبتنی بر زیست‌شناسی سامانه‌ای ژن‌های کلیدی پاسخ به بیماری‌های باکتریایی در گوجه‌فرنگی شناسایی و مورد بررسی قرار گرفتند. ژن‌های کلیدی شناسایی شده در این پژوهش می‌توانند با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی مورد بررسی دقیق‌تری قرار گرفته و نقش کلیدی احتمالی آنها در پاسخ به پاتوژن‌ها و یا سایر تنش‌های محیطی مورد بررسی قرار گیرد. در صورت اثبات نقش کلیدی ژن‌های شناسایی شده در این پژوهش، می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی کلاسیک و یا در تولید گیاهان تراریخت مقاوم به بیماری استفاده کرد.

References

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5th eds, Department of Plant Pathology. *University of Florida. United States of America*.
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature biotechnology*, 37(4), 420-423.
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A., & Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic acids research*, 44(W1), W147-W153.
- Bhadouria, J., & Giri, J. (2022). Purple acid phosphatases: roles in phosphate utilization and new emerging functions. *Plant Cell Reports*, 41(1), 33-51.
- Bigéard, J., & Hirt, H. (2018). Nuclear signaling of plant MAPKs. *Frontiers in Plant Science*, 9, 469.
- Blancard, D. (2012). *Tomato diseases: identification, biology and control: a colour handbook*. CRC Press.
- Bolwell, G. P., & Wojtaszek, P. (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 51(6), 347-366.
- Bozzo, G. G., Raghothama, K. G., & Plaxton, W. C. (2002). Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *European Journal of Biochemistry*, 269(24), 6278-6286.
- Brenya, E., Trusov, Y., Dietzgen, R. G., & Botella, J. R. (2016). Heterotrimeric G-proteins facilitate resistance to plant pathogenic viruses in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant signaling & behavior*, 11(8), e1212798.
- Cheng, Y. T., Zhang, L., & He, S. Y. (2019). Plant-microbe interactions facing environmental challenge. *Cell Host & Microbe*, 26(2), 183-192.
- Chin, C.-H., Chen, S.-H., Wu, H.-H., Ho, C.-W., Ko, M.-T., & Lin, C.-Y. (2014). cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC systems biology*, 8(4), 1-7.
- Chow, C.-N., Lee, T.-Y., Hung, Y.-C., Li, G.-Z., Tseng, K.-C., Liu, Y.-H., Kuo, P.-L., Zheng, H.-Q., & Chang, W.-C. (2019). PlantPAN3. 0: a new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from ChIP-seq experiments in plants. *Nucleic acids research*, 47(D1), D1155-D1163.
- Cristina, M. S., Petersen, M., & Mundy, J. (2010). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 61, 621-649.
- Derksen, H., Rampitsch, C., & Daayf, F. (2013). Signaling cross-talk in plant disease resistance. *Plant science*, 207, 79-87.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., & Smart, A. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1), D427-D432.

دادند (Ravichandran *et al.*, 2013). در پژوهش دیگری مشخص شد که یک اسید متالوفسفاتاز ارغوانی هیچ تغییر بیانی در پاسخ به تغییرات و کمبود فسفات در گیاه نداشته ولی در پاسخ به آلودگی قارچی القا شده و بیان آن به طور قابل توجهی در بافت‌های آوندی افزایش پیدا می‌کند (Zamani *et al.*, 2014).

آنالیز پروموتور ژن‌های کلیدی شناسایی شده، وجود عناصر تنظیمی پاسخ به تنش‌های زیستی (WUN- و WRE3, w-box) و تنش‌های غیرزیستی (MYC و STRE) را در ناحیه پروموتوری همه یا اغلب ژن‌های کلیدی نشان داد. این مورد نشان دهنده‌ی نقش ژن‌های کلیدی شناسایی شده در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیرزیستی مختلف است. وجود چنین عناصر تنظیمی در نواحی پروموتوری ژن‌های کلیدی شناسایی شده برای

- Fei, Z., Joung, J.-G., Tang, X., Zheng, Y., Huang, M., Lee, J. M., McQuinn, R., Tieman, D. M., Alba, R., & Klee, H. J. (2010). Tomato Functional Genomics Database: a comprehensive resource and analysis package for tomato functional genomics. *Nucleic acids research*, 39(suppl_1), D1156-D1163.
- Gatahi, D. M. (2020). Challenges and opportunities in tomato production chain and sustainable standards. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 7(3), 235-262.
- Gerszberg, A., Hnatuszko-Konka, K., Kowalczyk, T., & Kononowicz, A. K. (2015). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) in the service of biotechnology. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120, 881-902.
- Göhre, V., & Robatzek, S. (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 189-215.
- Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., & Minghim, R. (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC bioinformatics*, 16, 1-7.
- Heidari, P., Ahmadizadeh, M., & Najafi-Zarrini, H. (2015). In silico analysis of Cis-regulatory elements on co-expressed genes. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 9(25).
- Henriquez, M. A., Adam, L. R., & Daayf, F. (2012). Alteration of secondary metabolites' profiles in potato leaves in response to weakly and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57, 8-14.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M., & Korenaga, T. (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research*, 27(1), 297-300.
- Ishikawa, A. (2009). The Arabidopsis G-protein β -subunit is required for defense response against *Agrobacterium tumefaciens*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(1), 47-52.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H.-Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., McWilliam, H., Maslen, J., Mitchell, A., & Nuka, G. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Jwa, N.-S., Agrawal, G. K., Tamogami, S., Yonekura, M., Han, O., Iwahashi, H., & Rakwal, R. (2006). Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5-6), 261-273.
- Kim, N. H., & Hwang, B. K. (2015). Pepper heat shock protein 70a interacts with the type III effector AvrBsT and triggers plant cell death and immunity. *Plant physiology*, 167(2), 307-322.
- Kumar, A., & Verma, J. P. (2018). Does plant—microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? *Microbiological research*, 207, 41-52.
- Kumar, M., Tomar, M., Bhuyan, D. J., Punia, S., Grasso, S., Sa, A. G. A., Carciofi, B. A. M., Arrutia, F., Changan, S., & Singh, S. (2021). Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed: A review on bioactives and biomedical activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112018.
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., Rouzé, P., & Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research*, 30(1), 325-327.
- Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. *Annual review of genetics*, 22(1), 631-677.
- Long, T. A., Brady, S. M., & Benfey, P. N. (2008). Systems approaches to identifying gene regulatory networks in plants. *Annual review of cell and developmental biology*, 24, 81-103.
- Maimbo, M., Ohnishi, K., Hikichi, Y., Yoshioka, H., & Kiba, A. (2007). Induction of a small heat shock protein and its functional roles in *Nicotiana glauca* plants in the defense response against *Ralstonia solanacearum*. *Plant physiology*, 145(4), 1588-1599.
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L. Y., Geer, R. C., He, J., Gwadz, M., & Hurwitz, D. I. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research*, 43(D1), D222-D226.
- Martinelli, F., Reagan, R. L., Uratsu, S. L., Phu, M. L., Albrecht, U., Zhao, W., Davis, C. E., Bowman, K. D., & Dandekar, A. M. (2013). Gene regulatory networks elucidating huanglongbing disease mechanisms. *PLoS one*, 8(9), e74256.
- Maruta, N., Trusov, Y., Brenya, E., Parekh, U., & Botella, J. R. (2015). Membrane-localized extralarge G proteins and G $\beta\gamma$ of the heterotrimeric G proteins form functional complexes engaged in plant immunity in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 167(3), 1004-1016.
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P., & Michelmore, R. W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome biology*, 7, 1-11.
- Mehdy, M. C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant physiology*, 105(2), 467.

- Meng, X., & Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology*, 51, 245-266.
- Milosevic, N., & Slusarenko, A. (1996). Active oxygen metabolism and lignification in the hypersensitive response in bean. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(3), 143-158.
- Nobori, T., Wang, Y., Wu, J., Stolze, S. C., Tsuda, Y., Finkemeier, I., Nakagami, H., & Tsuda, K. (2020). Multidimensional gene regulatory landscape of a bacterial pathogen in plants. *Nature Plants*, 6(7), 883-896.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Olczak, M., Morawiecka, B., & Watorek, W. (2003). Plant purple acid phosphatases-genes, structures and biological function. *Acta Biochimica Polonica*, 50(4), 1245-1256.
- Pedley, K. F., & Martin, G. B. (2003). Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annual review of phytopathology*, 41(1), 215-243.
- Piquerez, S. J., Harvey, S. E., Beynon, J. L., & Ntoukakis, V. (2014). Improving crop disease resistance: lessons from research on Arabidopsis and tomato. *Frontiers in Plant Science*, 5, 671.
- Pitzschke, A., Schikora, A., & Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current opinion in plant biology*, 12(4), 421-426.
- Ravichandran, S., Stone, S. L., Benkel, B., & Prithiviraj, B. (2013). Purple Acid Phosphatase5 is required for maintaining basal resistance against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *BMC plant biology*, 13(1), 1-12.
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research*, 13(11), 2498-2504.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany*, 2012.
- Singh, K. B., Foley, R. C., & Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current opinion in plant biology*, 5(5), 430-436.
- Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *3 Biotech*, 7, 1-10.
- Sinha, A. K., Jaggi, M., Raghuram, B., & Tuteja, N. (2011). Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant signaling & behavior*, 6(2), 196-203.
- Solovyev, V., Kosarev, P., Seledsov, I., & Vorobyev, D. (2006). Automatic annotation of eukaryotic genes, pseudogenes and promoters. *Genome biology*, 7(1), 1-12.
- Szklarczyk, D., Gable, A. L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N. T., Morris, J. H., & Bork, P. (2019). STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic acids research*, 47(D1), D607-D613.
- Topcu, Y., Nambeesan, S. U., & van der Knaap, E. (2022). Blossom-end rot: a century-old problem in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and other vegetables. *Molecular Horticulture*, 2(1), 1.
- Torres, M. A., Morales, J., Sánchez-Rodríguez, C., Molina, A., & Dangl, J. L. (2013). Functional interplay between Arabidopsis NADPH oxidases and heterotrimeric G protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(6), 686-694.
- Trusov, Y., & Botella, J. R. (2016). Plant G-proteins come of age: breaking the bond with animal models. *Frontiers in chemistry*, 4, 24.
- Urano, D., & Jones, A. M. (2014). Heterotrimeric G protein-coupled signaling in plants. *Annual review of plant biology*, 65, 365-384.
- Wang, C., El-Shetehy, M., Shine, M., Yu, K., Navarre, D., Wendehenne, D., Kachroo, A., & Kachroo, P. (2014). Free radicals mediate systemic acquired resistance. *Cell Reports*, 7(2), 348-355.
- Waters, E. R., & Vierling, E. (2020). Plant small heat shock proteins—evolutionary and functional diversity. *New Phytologist*, 227(1), 24-37.
- Yao, Z., Islam, M. R., Badawi, M. A., El-Bebany, A. F., & Daayf, F. (2015). Overexpression of StRbohA in Arabidopsis thaliana enhances defence responses against *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 90, 105-114.
- Yu, C.-S., Cheng, C.-W., Su, W.-C., Chang, K.-C., Huang, S.-W., Hwang, J.-K., & Lu, C.-H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOcalization prediction with functional gene ontology annotation. *PloS one*, 9(6), e99368.

- Yuan, B., Shen, X., Li, X., Xu, C., & Wang, S. (2007). Mitogen-activated protein kinase OsMPK6 negatively regulates rice disease resistance to bacterial pathogens. *Planta*, 226, 953-960.
- Yuqing, W., Zhang, Y., Zhipeng, G., & Wencai, Y. (2018). Breeding for resistance to tomato bacterial diseases in China: challenges and prospects. *Horticultural Plant Journal*, 4(5), 193-207.
- Zamani, K., Lohrasebi, T., Sabet, M. S., Malboobi, M. A., & Mousavi, A. (2014). Expression pattern and subcellular localization of Arabidopsis purple acid phosphatase AtPAP9. *Gene Expression Patterns*, 14(1), 9-18.
- Zhang, S., & Klessig, D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in plant science*, 6(11), 520-527.
- Zhang, S., Wang, L., Zhao, R., Yu, W., Li, R., Li, Y., Sheng, J., & Shen, L. (2018). Knockout of SIMAPK3 reduced disease resistance to *Botrytis cinerea* in tomato plants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(34), 8949-8956.