بررسی تغییرات پروتئوم برگ ارقام حساس و مقاوم گوجه فرنگی در واکنش به قارچ بیمارگر *Alternaria solani*

بتول صادقی[1*]، محمد سالاری[1]، سعید میرزایی[2]، ناصر پنجه که[1] و سید کاظم صباغ[3]

[1] **ایران، زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی**

[2] **ایران، کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، پژوهشکده علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی**

[3] **ایران، یزد، دانشگاه یزد، گروه بیولوژی**

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۱۹

چکیده

بیماری لکه موجی یا پژمردگی زود هنگام گوجه فرنگی از بیماریهای مهم گوجه فرنگی است که باعث کاهش کمی و کیفی محصول می‌شود. اما اطلاعات کمی در زمینه مکانیسمهای مولکولی درگیر در دفاع میزبان موجود است. در این پژوهش به منظور درک بهتر پاسخهای مولکولی دفاعی، تغییرات پروتئوم برگ ارقام حساس و مقاوم گوجه فرنگی در تعامل با *A. solani* با استفاده از الکتروفورز دو بعدی مورد بررسی قرار گرفت. مجموعاً از ۶۱۰ لکه تکرار پذیر ، ۲۹ لکه دارای بیان معنی داری در ارقام حساس و مقاوم تیمارشده با بیمارگر بودند. شناسایی این لکه ها نشان داد که آنها در مسیرهای عملکردی استرس و دفاع، انرژی و متابولیسم، فتوسنتز و بیوسنتز پروتئین، و انتقال سیگنال دخالت داشتند. پروتئینهای درگیر در استرس و دفاع(پروتئینهای وابسته به بیماریزایی و پروتئینهای در گیر در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی) بیشترین فراوانی را داشتند. نتایج نشان داد که پروتئینهای درگیر در تقویت دیواره سلولی، متابولیتها و ترکیبات فنلی مهم ترین نقش را در پاسخهای دفاعی و افزایش مقاومت گیاه در برابر بیمارگر *A. solani* دارند. نتایج این پژوهش می تواند در به کارگیری منابع جدید ژنتیکی برای تولید ارقام مقاوم گوجه فرنگی به بیماری لکه موجی مؤثر واقع شود.

واژه های کلیدی: لکه موجی، الکتروفورز دو بعدی، مقاومت

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۵۸۶۸۷۱۸، پست الکترونیکی: batulsadeghy@gmail.com

مقدمه

بیماری لکه موجی که عمدتاً به وسیله قارچ *Alternaria solani* ایجاد می‌شود از مهم ترین بیماریهای گوجه فرنگی در دنیا است (۵۰) که باعث کاهش مقدار تولید و کیفیت محصول می‌شود. عامل این بیماری علاوه بر برگ به میوه و ساقه گوجه فرنگی نیز حمله می‌کند. در اثر این بیماری لکه‌های قهوه ای رنگ بر روی گیاهچه ها ظاهر می شود. لکه ها ممکن است به صورت دوایر متحدالمرکز نمایان شوند و سریعاً توسعه یافته و به هم برسند، درنتیجه تمامی اندامهای هوایی گیاه را فرا گرفته به طوری که گیاه ظاهری سوخته پیدا می‌کند. بیماری در دامنه وسیعی از شرایط آب و هوایی به ویژه مناطق نیمه گرم وگرم گسترش می یابد (۵۰). خسارت بیماری لکه موجی گوجه فرنگی در شرایط همه‌گیر ۷۸ درصد گزارش شده است (۳۰). قارچ بیمارگر با ترشح توکسینهای مختلف علاوه بر تجزیه سلولی بر روی پروتوپلاسم سلول نیز تأثیر گذاشته و موجب اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه می شود (۵۰).

برهمکنش بیمارگر و گیاه یک فرایند پیچیده است. در شروع برهمکنش، گیاهان مسیرهایی را برای تشخیص و شناسایی حمله بیمارگر گسترش می‌دهند. پروتئینها و مسیرهای سیگنالی زیادی در این فرایند پیچیده به طور دقیق کنترل می‌شوند و این پیچیدگی فهم آن را برای ویژگیهای آناتومیکی، متابولیتی و مسیرهای سیگنالی مشکل می کند (۴۱).

در طی سالهای گذشته روشهای زیادی برای آنالیزهای پروتئومیکی ارائه شده است که امکان تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژنها در سطح پروتئین میسر گردیده است و اطلاعات وسیعی در زمینه پیچیدگی برهمکنش بیمارگر- گیاه آشکار شده است. از پرکاربردترین این روشها می توان ژل الکتروفورز دوبعدی (2DE)، یونیزاسیون/واجذبی لیزری به کمک سطح (SELDI)، کروماتوگرافی مایع /طیف سنجی جرمی(LC-MS) ، ردیابی واکنش انتخا ب شده (SRM)، و ردیابی چندین واکنش، (MRM)، آرایه‌های پروتئین را نام برد (۳). اولین مرحله در آنالیز پروتئوم، جداسازی پروتئینهای موجود در نمونه هاست. الکتروفورز دو بعدی به عنوان یکی از رایج ترین روشهای جداسازی در این زمینه است. الکتروفورز دو بعدی ترکیب ایزوالکتریک فوکوسین در بعد اول (IEF) و SDS-PAGE در بعد دوم است که امکان جداسازی پروتئینها را براساس بار و اندازه فراهم می کند (۳۲) از دیگر روشهای جداسازی پروتئینها می توان به روشهای کروماتوگرافی همچون کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) وکروماتوگرافی تمایلی اشاره کرد که روشهای سریعی برای جداسازی می باشند .این تکنیکها ابزارهای متناوبی را جهت مطالعه پروتئینها فراهم آورده اند و مشکلات کمتری نسبت به روشهای بر پایه ژل را دارا می‌باشند (۳).

تجزیه و تحلیل الگوی بیان ژنها در سطح پروتئین علاوه بر این‌که تکمیل کننده داده‌های حاصل از ژنومیکس (Genomics)، ترانسکریپتومیکس (Transcriptomics) و متابولومیکس (Metabolomics) می‌باشد مزیتهای ویژه‌ایی دارد، زیرا پروتئینها، به عنوان اجزاء کلیدی به طور مستقیم مسئول اعمال سلولی هستند. علاوه بر این، مقدار پروتئین اغلب از روی میزان mRNA تولید شده در سلول قابل پیش‌بینی نیست و تغییرات پس از ترجمه ای که در ساختار پروتئینها رخ می‌دهد برای کنشهای بیولوژیکی آنها ضروری می‌باشد، لذا مطالعه پروتئینها برای بررسی فعالیت آنها در بافتهای خاص یا در پاسخ به شرایط تنش از اهمیت بالقوه‌ای برخوردار است (۴۱). در دو دهه اخیر مطالعات پروتئومیکس در حوزه گیاه- بیمارگر آغاز شده است و در حال پیشرفت می‌باشد. تجزیه و تحلیل پروفایل بیان پروتئینها جو در برهمکنش با بلایت فوزاریومی خوشه (۶۴)، آنالیز پروتئومیکس پاسخ گیاه آرابیدوبسیس به بیمارگر *A. brassicicola* (۶۴) و بررسی تغییرات پروتئوم برگ *Mentha arvensis* در پاسخ به بیمارگر. *A. alternata* (۵۸) نمونه‌هایی از مطالعات انجام شده در زمینه تعامل گیاه و بیمارگر قارچی با تکنیک پروتئومیکس است. در اولین مطالعه که بر روی پروتئینهای شیره آوندی گیاه گوجه فرنگی آلوده به بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* انجام گرفت ۲۱ پروتئین در طول برهمکنش گیاه با بیمارگر با استفاده از تکنیک پروتئومیکس شناسایی شد (۲۵). بررسیهای پروتئومیکس نشان داد که توکسین قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (فوزاریک اسید) سبب تغییر در بیان پروتئینها با عملکردهای مختلف (استرس و دفاع، انرژی و متابولیسم، سنتز پروتئین و ترجمه) می‌شود که این تغییرات بر روی بافت برگی گیاه اثر می گذارند و در نهایت منجر به تغییراتی در فیزیولوژی سلولها می شود (۵۷). تغییرات پروتئوم ریشه گوجه فرنگی در طول تعامل با بیمارگر *Verticillium dahlia* نشان داد که بیان پروتئینهای وابسته به مسیرهای متابولیسم مانند S-adenosylmethionine synthase و استرس و دفاع مانندSuper oxide dismutase و Cinnamyl alcohol dehydrogenase دچار افزایش بیان شدند (۶۱). بررسی

تغییرات پروتئوم برگ گوجه فرنگی در پاسخ به باکتری *Pseudomonas syringae* مؤید نقش پروتئینهای وابسته به مسیر کربوهیدارت و متابولسیم، تری کربوکسیلیک اسید، سنتز دیواره سلولی و کاهش اکسیداسیون در ایجاد مقاومت در گیاه بود (۴). پاسخهای دفاعی گیاه گوجه فرنگی در برابر *Phytophthora infestans* با استفاده از تکنیک پروتئومیکس نشان داد که پروتئینهای درگیر در مسیرهای استرس و دفاع مانند پروتئینهای *PR*، انرژی و متابولیسم مانند ATP synthase subunit beta، فتوسنتز و ترجمه در پاسخهای دفاعی گیاه نقش مؤثری دارند (۳۸).

استراتژیهای مدیریت کارآمد و مناسب نیاز به درک بهتر تعاملات بیمارگر و میزبان دارد. از آنجایی که قارچ بیمارگر *A. solani* از عوامل کاهش دهنده عملکرد گوچه فرنگی در جهان به شمار می رود، بررسی مکانیسمهای مقاومت گیاه از طریق روشهای مختلف مانند بیوشیمیایی و مولکولی از ضروریات راهبردهای اصلاحی گوجه فرنگی در برابر بیماری لکه موجی به شمار می‌رود، مطالعه الگوی بیان پروتئینها در میان ژنوتیپهای متحمل و حساس در مواجهه با بیمارگر علاوه بر درک دقیق تر ماهیت مکانیسمهای دفاعی، محققان را در شناسایی پروتئینهای درگیر در مقاومت به *A. solani* و همچنین غربالگری ژنوتیپها و ارقام گوجه فرنگی یاری خواهد نمود . پروتئومیکس علم جدیدی است که در شناسایی پروتئینها، کاربرد و چگونگی کنترل بیان آنها توانایی و دقت بالایی دارد. بنابراین می توان از آن در تجزیه و تحلیل فرآیندهای درگیر در تنشهای زیستی استفاده کرد (۲۸).

از آن جایی که تاکنون پژوهشهای انجام شده در پاتوسیستم گوجه فرنگی- Alternaria بیشتر بر تغییرات بیان ژنها و ترانسکریپتوم بوده است و اطلاعات بسیار کمی در زمینه کارکرد فراورده‌های ژنی و پروتئینهای درگیر وجود دارد لذا در این پژوهش با استفاده از تکنیک پروتئومیکس، پروتئینهای در گیر در این پاتوسیستم مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

جداسازی *Alternaria solani* کاشت گیاهان و مایه زنی گیاهان با بیمارگر: *جدایه A. solani* از برگهای گیاه گوجه فرنگی که علائم لکه موجی را نشان می دادند جداسازی گردید. شناسایی گونه بر اساس روش استاندارد شده سیمونز (۵۶) و بررسی ریخت شناسی جدایه ها صورت گرفت. اثبات بیماریزایی جدایه با اجرای اصول کخ انجام شد.

در این پژوهش از دو رقم گوجه فرنگی Super 2270 (رقم مقاوم) و Peto early ch (رقم حساس) استفاده شد. بذرهای گیاه گوجه فرنگی درون گلدانهای پلاستیکی حاوی پرلیت سترون شده کشت و در گلخانه نگهداری شدند و روزانه با محلول غذایی آبیاری شدند. برگ گیاهان ارقام حساس و مقاوم ۳۰ روزه با سوسپانسیون اسپوری با غلظت^{5}۱۰ ×۲ مایه زنی شدند (۵۹) و ۲۴ ساعت پس از مایه زنی، برگ گیاهان تیمار شده و شاهد جمع آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

استخراج پروتئین و تکنیک الکتروفورزدوبعدی: استخراج پروتئین از برگها به روش TCA- استون انجام گردید (۲۴) و غلظت پروتئین کل محلول به دست آمده به روش برادفورد اندازه گیری شد (۷). جهت تفکیک پروتئینها از الکترفورز دوبعدی استفاده شد. در این تکنیک ابتدا پروتئینها بر روی نوارهایIPG (Immobilized pH Gradient) با طول ۱۷ سانتیمتر و شیب pH ۴ تا ۷ (بعد اول) قرار داده شدند و سپس برای بعد دوم از SDS-PAGE استفاده گردید (۵۴). برای باز جذب نمودن ژلها، میزان ۳۲۰ میکرولیتر از محلول بازجذب (8M w/v Urea, 2% CHAPS, 0.002% Bromophenol Blue, 2% v/v IPG Buffer, 0.018 M DTT) که حاوی ۱۲۰ میکروگرم پروتئین بود به داخل شیار موجود در سینی بازجذب پیپت

شد. پس از تکمیل مرحله بازجذب الکتروفورز بعد اول انجام شد. در این تحقیق از دستگاه EttanIPGphore IIIساخت شرکتGE Healthcare برای انجام بعد اول استفاده شد. برای بارگیری پروتئینها روی ژل ۱۷ سانتیمتری به طور متوسط نیاز به ۴۲ هزار ولت هورس(KVh) بود که این میزان ولت هورس در چهار مرحله ۱۵۰ vh تا ۳۰۰v، ۳۰۰v تا ولتاژ ۵۰۰v، ۲۰۰۰v تا ولتاژ ۳۵۰۰v و ۳۹۵۰۰vh در ولتاژ ۳۵۰۰v تأمین شد (۴۸) برای انجام بعد دوم الکتروفورز، از دستگاه ProteinII Xi Cell ساخت شرکت بیورَد استفاده شد. پس از تیمار شیشه‌ها با الکل و قرار دادن اسپیسرها کاست ژل را بسته و محلول اکریل آمید (۱۲درصد) تهیه شده در آن ریخته شد. پس از ریختن محلول اکریل آمید (پیوست) روی سطح آن با n- بوتانول اشباع پوشانده شد. پس از آماده شدن ژل بعد دوم نوار ژل بعد اول به مدت ۱۵ دقیقه در محلول Equilibration (50mM Tris-HCl, pH 8.8,6M Urea, 2% SDS, 30% Glycerol, 1% DTT, 0.002% Bromophenol Blue) شناور شد. پس از تکمیل مرحله متعادل سازی ژل، نوار به آرامی روی سطح ژل بعد دوم قرار داده شد و الکتروفورز ژل با میلی‌آمپر ثابت (به صورت زیر) در چند مرحله بارگذاری گردید. در مرحله اول ۵ میلی آمپر برای ۲ ساعت، مرحله دوم ۱۰ میلی‌آمپر برای ۶ ساعت و مرحله سوم ۲۰ میلی آمپر برای ۳ ساعت. با پایان یافتن الکتروفورز بعد دوم، ژلها با نیترات نقره رنگ آمیزی شد (۵).

تصویر برداری از ژل: ژلها پس از رنگ آمیزی با استفاده از دنسیتومترGs800 ساخت شرکت بیورد اسکن شده و به فرمت خام ژلهای دو بعدی (Raw 2d) ذخیره شدند و در نهایت به وسیله نرم افزار PDQuest (نسخه۷) به فرمت تیف درآورده شدند (۵۰) .

تجزیه و تحلیل پروتئینهای شناسایی شده: الگوهای باندی به دست آمده از تکنیک الکتروفورز دو بعدی به وسیله نرم افزار Melanie نسخه۷ از نظر کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲). لکه هایی که درصد حجمی آنها بین دو تیمار به میزان ۱/۵ برابر با هم اختلاف داشتند به عنوان پروتئینهایی با تفاوت معنی دار بین دو تیمار شناخته شدند. .به منظور شناسایی احتمالی لکه‌های پروتئینی، لکه‌های کاندید از نظر وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک با استفاده از پایگاه داده ها انطباق داده شدند. برای شناسایی اختلاف بین لکه‌ها در ژلها از آزمون t- استودنت با احتمال ۵ درصد استفاده شد.

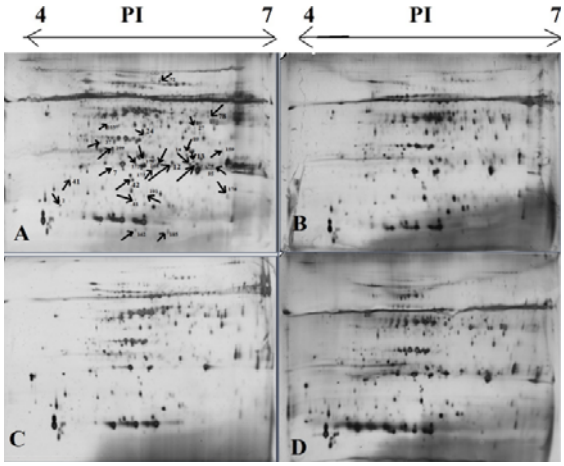
نتایج

شناسایی جدایه *Alternaria solani* و آزمون بیماریزایی: نتایج حاصل از بررسیهای ریخت شناسیAlternaria نشان داد که جدایه مورد نظر گونه *A. solani* است. آزمون بیماریزایی جدایه جداسازی شده از بافتهای آلوده با اجرای اصول کخ بر روی گوجه فرنگی به روش کخ به اثبات رسید. علائم لکه موجی روی برگ گوجه فرنگی مایه زنی شده با جدایه پدیدار گشت. در صورتی که در تیمار شاهد هیچ گونه نشانه‌ایی از علائم لکه موجی مشاهده نشد. مطالعات ریخت شناسی جدایه حاصل از مایه زنی بیماریزایی، وجود جدایه *A. solani* را تأیید نمود.

شناسایی پروتئینهای برگ وابسته به مقاومت با استفاده از تکنیک الکتروفورز دوبعدی: تکنیک پروتئومیکس برای شناسایی پروتئینهایی که در ارقام حساس و مقاوم گوجه فرنگی شاهد و مایه زنی شده با بیمارگر*A. solani* بیان شده بودند مورد استفاده قرار گرفت. بیش از ۶۰۰ لکه پروتئینی تکرار شده در هر ژل رنگ آمیزی شده شناسایی شد (شکل۱). بر اساس آنالیز آماری (بیان ۱/۵ برابر، $p < 0.05$) ۲۸ لکه به طور معنی داری بیان متمایزی در بین ارقام حساس و مقاوم داشتند. از بین ۲۸ لکه تعداد ۱۶ لکه در رقم مقاوم افزایش بیان و در رقم حساس کاهش بیان نشان دادند. سه لکه فقط در رقم مقاوم بیان شدند که شامل Heat shock 70 kDa protein ، Flavonol synthase و

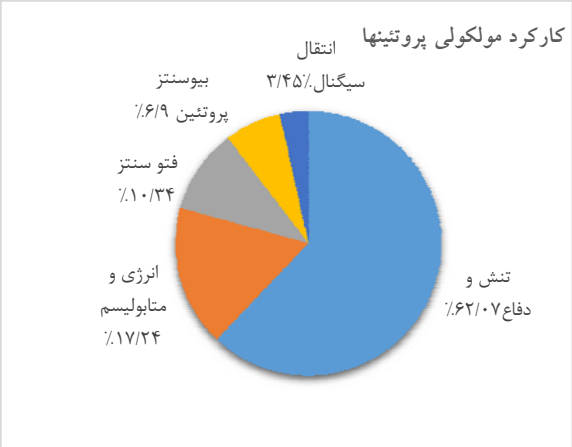
Cinnamyl alcohol dehydrogenase 1 بودند. همچنین هشت لکه در هر دو رقم دچار افزایش بیان شدند.

پروتئینهای عملکردی تولید شده در برگ گوجه فرنگی ارقام حساس و مقاوم مایه زنی شده با بیمارگر *Alternaria solani*: تجزیه و تحلیل پروتئینهای شناسایی



شکل ۱- الگوی پروتئوم برگ گوجه فرنگی در ارقام حساس و مقاوم شاهد و مایه زنی شده با قارچ *A. solani*: A : رقم مقاوم آلوده، B: رقم حساس آلوده، C: رقم مقاوم شاهد و D: رقم حساس شاهد

پروتئینهای وابسته به تنش و دفاع بزرگترین گروه در میان پروتئینهای شناسایی شده بودند که شامل پروتئینهای زیر می باشند: Pectinesterase inhibitor 10 (لکه۴۲)، Heat shock 70 kDa protein (لکه۱۰۳)، پروتئینهای وابسته به بیماریزایی شامل گلوکان اندو-۱،۳- بتا – گلوکوزیداز (Glucan endo-1,3-beta-glucosidase) (لکه۱۷۲)، کیتیناز ۳(۱۷۶لکه)، آنزیمهای آنتی اکسیدان و پروتئینهای وابسته به تنشهای اکسیداتیو مانند پراکسیداز (لکه ۴۱) ، و گلوتانین اس ترانسفراز(Glutathione S-transferases) (لکه ۱۹۱) ، سوپر اکسید دیسموتاز(SOD=Superoxide dismutase) (لکه ۱۸۵) و آنزیم پلی فنل اکسیداز(لکه۲۱۸)، پروتئینها و آنزیمهای وابسته در مسیر سنتز ترکیبات فنلی شامل فلاونول سنتتاز (Flavonol synthase) (لکه۱۲)، Chalcone synthase (لکه۱۵۹) و Isoflavone-7-O-methyltransferase 6 (لکه۹۹)، آنزیم فنیل الانین آمونیالیاز شده در برگ نشان داد که این پروتئینها از نظر عملکردی در پنج گروه شامل: پروتئینهای درگیر در دفاع (۶۲/۰۷ درصد) ، انرژی و متابولسیم (۱۷/۲۴ درصد) ، فتوسنتز (۱۰/۳۴ درصد)، بیوسنتز پروتئین (۶/۹ درصد) و انتقال سیگنال (۳/۴۵ درصد) قرار دارند (شکل ۱).



شکل ۲- کارکرد پروتئینهای متمایز بیان شده با استفاده از نرم افزار Melanie 7

Caffeic acid 3-O-methyltransferase (لکه ۷۸) (PAL)، -coumarate--CoA ligase۴ (لکه۸۸)، (لکه۲۴)، Cinnamoyl-CoA reductase 1 (لکه۱۳) و Cinnamyl alcohol dehydrogenase (لکه ۱۷۱و ۱۶۸).

چهار پروتئین وابسته به انرژی و متابولیسم بودند که شامل ATP synthase subunit beta (لکه۳۷)، Succinate dehydrogenase subunit 5 (لکه۲)، ATP synthase epsilon chain (لکه۱۶۲)، NAD-malic enzyme (لکه ۲۷) و Malate dehydrogenase (لکه ۱۷۳) می باشند.

پروتئینهای Photosystem II D2 (لکه۱۴)، Photosystem II protein D1 (لکه ۷) و Ferredoxin-NADP reductase (لکه۹۵) در فتوسنتز نقش دارند.

سه پروتئین شامل S-adenosyl methionine synthase

(۸۹) و Serine carboxypeptidase-like 49 (۲۰۹) در مسیر بیوسنتز پروتئین بودند. پروتئین فیتوکروم در مسیر انتقال سیگنال قرار دارد (جدول۱).

جدول ۱- تغییرات بیان و ویژگیهای بیوشیمیایی پروتئینهای متمایز شده در برگ گوجه فرنگی رقم حساسCH Flat و مقاوم2270Super در واکنش به بیمارگر *A. solani*

شماره ردیف	شماره لکه	پروتئین شناسایی شده	Ac. No.	T.P.I.	T.M.W.	O.P.I.	O.M.W.	Expressio fold change	
								Super 2270	CH Flat
		Stress and defense							
۱	۱۲	Flavonol synthase	Q9ZWQ9	۵،۸۳	۳۷،۸۹	۵،۸۵	۳۶	۱،۹۷	۰،۰۷
۲	۱۳	Cinnamoyl-CoA reductase 1	Q6K9A2	۸،۲۷	۳۷،۳۶	۶،۱۳	۳۷	۵،۴۳	۰،۵۶
۳	۲۴	4-coumarate--CoA ligase	Q84P25	۸،۹۸	۶۱،۳۹	۵،۵۵	۵۸	۴،۱۲	۱،۹۸
۴	۴۱	Peroxidase	Q42964	۴،۲۶	۳۴،۵۲	۴،۷۱	۳۱	۴،۶۱	۰،۵۵
۵	۴۲	Pectinesterase inhibitor 10	Q9SI74	۵،۵۸	۳۲	۴،۷۲	۳۱	۱،۸۹	۱،۵۳
۶	۷۸	Phenylalanine ammonia-lyase	P45734	۶،۲۷	۷۸	۶،۲۵	۷۶	۲،۹۸	۱،۰۵
۷	۸۱	Superoxide dismutase [Mn]	P35017	۷،۱	۲۵،۸۸	۵،۴۴	۲۲	۳،۵	۱،۸۳
۸	۸۸	Caffeic acid 3-O-methyltransferase	Q6T1F5	۶،۰۸	۴۰،۱	۶،۰۹	۳۸	۱۴،۶۹	۳،۰۱
۹	۱۰۳	Heat shock 70 kDa protein 9	P27322	۵،۰۸	۷۱،۰۶	۵،۱۴	۶۸	۶،۶۲	۰،۰۴
۱۰	۱۱۸	Polyphenol oxidase A1	Q06215	۶	۵۸	۶	۶۰	۱،۵۵	۰،۵۲
۱۱	۱۵۹	Chalcone synthase 1B	Q6WGP9	۶،۴	۴۳،۲	۶،۴۱	۴۴	۱۸،۰۷	۰،۱۲
۱۲	۱۶۸	Cinnamyl alcohol dehydrogenase	P42734	۶،۲۱	۳۸	۵،۷	۳۷	۳،۷۲	۱،۱۸
۱۳	۱۷۰	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 1	Q6ERW9	۶،۷	۳۹،۴	۵،۵۶	۴۰	۸،۵۵	۰،۰۰۰۶
۱۴	۱۷۲	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase	Q01413	۷،۸۴	۳۹،۷۱	۵،۶۴	۳۵	۲،۵۱	۰،۷۱
۱۵	۱۷۶	class III chitinase	Q9FYR9	۵،۴	۳۱	۴،۶۶	۳۲	۳،۳۵	۱،۳۴
۱۶	۱۸۵	Superoxide dismutase [Cu-Zn] 2	P14831	۵،۷	۲۲،۲۲	۶،۱	۱۵	۱،۶۷	۰،۲۷
۱۷	۱۹۱	Glutathione S-transferase	P30109	۹،۳۳	۲۳،۵۸	۵،۵۴	۲۳	۲،۰۶	۱،۷۶
		Energy and metabolism							
۱۸	۲	Succinate dehydrogenase subunit 5	Q9SX77	۴،۶۲	۲۸،۱	۴،۶۱	۲۰	۱،۸۵	۱،۶
۱۹	۲۷	NADP-dependent malic enzyme	P16243	۵،۳۶	۶۳،۳۳	۶،۱	۶۴	۳،۰۴	۰،۲۲
۲۰	۳۷	ATP synthase subunit beta	Q2MI93	۴،۹۵	۴۳،۶۴	۵،۰۶	۵۱	۱،۲۲	۰،۷۹
۲۱	۱۶۲	ATP synthase epsilon chain	Q2MI94	۵،۴۲	۱۴،۵۷	۵،۴۷	۱۶	۲،۱۸	۰،۵۵
۲۲	۱۷۳	Malate dehydrogenase	K4CW40	۵،۹۱	۳۵،۷	۵،۶۴	۳۵	۳،۹۷	۰،۹۳
۲۳		**Photosinthesis**							
	۷	Photosystem II protein D1.	Q20ET2	۵،۵۲	۳۷،۸۷	۵،۲	۳۷	۵،۰۱	۰،۶۵
۲۴	۱۴	Photosystem II D2 protein.	Q20EU7	۶،۰۵	۳۹،۲۶	۶،۳	۳۶	۳،۷۵	۰،۵۶
۲۵	۹۵	Ferredoxin--NADP reductase	Q4KQT2	۷،۷۱	۳۵،۵۶	۶،۳	۳۶	۱۰،۰۶	۰،۶۳
		Protein biosynthesis							
۲۶	۸۹	S-adenosylmethionine synthase 2	Q307Y9	۵،۸	۴۲،۶	۶،۰۱	۴۲	۳،۰۱	۰،۵۲
۲۷	۲۰۹	Serine carboxypeptidase-like 49	P32826	۵،۴۳	۴۸،۷۲	۵،۱۹	۴۷	۱،۱۳	۰،۳۴
		Signal transduction and transcription							
۲۸	۷۲	Phytochrome	Q41046	۵،۷۲	۱۲۶،۲۵	۵،۷۱	۱۲۷	۲،۷۶	۲،۳۲

محفف های استفاده شده در جدول: .Ac. No : شماره دسترسی؛T.P.I نقطه ایزوالکتریک تئوری؛.T.M.W : وزن مولکولی تئوری، .O.P.I نقطه ایزوالکتریک مشاهده شده؛ .O.M.W وزن مولکولی مشاهده شده؛ :Expressio fold change نسبت میزان بیان پروتئینهای رقم حساس و مقاوم آلوده در مقایسه با شاهد هر رقم

بحث

پروتئینهای درگیر در دفاع و تنش: از گروه پروتئینهای وابسته به دفاع و تنش سه لکه (۴۱،۱۷۱،۱۷۶) متعلق به پروتئینهای وابسته به بیماریزایی (PR) هستند. پروتئینهای وابسته به بیماریزایی وزن مولکولی کمی داشته و غنی از سیستین هستند. این پروتئینها در طول تعامل گیاه با بیمارگر تولید می‌شوند و به طور موضعی در محل آلودگی تجمع پیدا کرده و بافت آلوده را احاطه می‌کنند (۲۲). کیتیناز کلاس III (PR-8) و گلوکان اندو-۱،۳- بتا – گلوکوزیداز (PR-2) از فراوان‌ترین آنزیمهای هیدرولیز در گیاهان آلوده به قارچهای بیمارگر هستند و نقش مهمی را در واکنشهای دفاعی گیاه از طریق تجزیه دیواره سلولی قارچها بازی می کنند(۳۱). نتایج پروتئومیکس نشان داد که این دو پروتئین در واکنش به بیمارگر *A. solani* در ارقام گوجه فرنگی افزایش پیدا کردند ولی میزان بیان آنها در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود به طوری که بیان پروتئین کیتیناز و گلوکان اندو-۱،۳- بتا –گلوکوزیداز در رقم مقاوم به ترتیب ۲/۵و ۳/۵ برابر بیشتر از رقم حساس بود. گزارشات متعددی از افزایش پروتئینهای PR-8 و PR-2 در گیاه در پاسخ به حمله بیمارگرهای قارچی وجود دارد (۱۲، ۱۹، ۴۰ و ۵۲) که با نتایج این تحقیق سازگار است.

برخی از پروتئینهای متمایز بیان شده در این پژوهش از گروه آنزیمهای آنتی اکسیدانت و پروتئینهای وابسته به تنشهای اکسیداتیو هستند که شامل پراکسیداز، آنزیم SOD و Glutathione S-transferases و پلی فنل اکسیداز می‌شوند. پلی فنل اکسیدازها مونو و دی فنلها را اکسید کرده و آنها را به کوئینون که فعالیت ضد میکروبی دارد تبدیل می کنند. پلی فنل اکسیدازها و پراکسیدازها در فرایند چوبی شدن دیواره سلولی در طول برهمکنش بافت گیاه با بیمارگر دخالت دارند (۳۶ و ۴۸). در این پژوهش میزان بیان آنزیمهای پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در رقم مقاوم بعد از مایه زنی با بیمارگر به طور معنی داری افزایش یافته است و به ترتیب به میزان ۴/۶۱ و ۱/۵ برابر نسبت به تیمار شاهد رسید در حالی که بیان این آنزیمها در رقم حساس به میزان ۰/۵ برابر گیاه شاهد افزایش داشت. بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز می تواند یکی از مکانیسمهای مقاومت گیاه در برابر بیمارگر باشد.

آنزیم SOD از مؤثرترین آنزیمهای درون سلولی است که نقش مثبتی در کنترل رادیکالهای آزاد اکسیژن دارد. در واقع SOD اولین صف دفاعی در مقابل تنشهای اکسیداتیو است و در دیسموتاز کردن O_2^- به H_2O_2 و O_2 دخالت دارد و توسعه علائم بیماری و شدت بیماریزایی را کاهش می دهند (۹). مطالعات نشان می دهد که میزان این آنزیم در گیاهان در مواجهه با قارچهای نکروتروف افزایش می‌یابد (۱۹). نتایج نشان داد که میزان بیان دو ایزوآنزیم SOD در واکنش به بیمارگر *A. solani* در رقم مقاوم در مقایسه با رقم حساس افزایش یافت. سیلوا و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که میزان آنزیم SOD در گیاه گوجه فرنگی در پاسخ به بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp *lycopersici* افزایش یافت که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (۵۵).

آنزیم Glutathione S-transferases مسئول فعالیتهای آنتی اکسیدانتی در گیاهان هستند که در کاهش خسارت بیمارگرها از طریق حذف هیدرو پراکسیدازهای چربی که از طریق پراکسید شدن غشاها تولید شده اند نقش دارند (۲۱). در این تحقیق بیان آنزیم Glutathione S-transferases در رقم حساس و مقاوم افزایش یافته است ولی این افزایش در رقم مقاوم به میزان ۱/۱۷برابر بیشتر بوده است. مانزو و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهشی نشان

دادند که Glutathione S-transferases نقش مؤثری در فرایند مقاومت به بیمارگر *F. oxysporium* در گیاه گوجه فرنگی دارد (۴۲).

گونه‌های فعال اکسیژن ROS=Reactive Oxygen (Species) به عنوان محصولات فرعی متابولیسم در گیاهان تولید می‌شوند و به صورت یک عامل سیگنالی در توسعه و فرایندهای تنظیمی گیاه عمل می کنند (۲۲). ROS به ویژه H_2O_2 به عنوان یک مولکول سیگنال در برابر بیمارگرها در پاسخهای دفاعی گیاه شرکت می کند. قارچهای نکروتروف مانند *Alternaria* سطوح بالای ROS را برای پیشرفت و بیماریزایی در گیاهان استفاده می کنند (۲۷) در این پژوهش آنزیمهای آنتی اکسیدانت که در سم زدایی H_2O_2 ،کاهش اکسیداتیو و بازسازی سلول نقش دارند بعد از مایه زنی گیاه با بیمارگر در رقم مقاوم نسبت به حساس به طور چشمگیری افزایش یافتند که نشان می‌دهد این آنزیمها می توانند در حفظ تعادل سلول و نیز سرکوب رشد بیمارگر نقش مهمی داشته باشند.

در میان پروتئینهای تنش و دفاع بیان آنزیمها و متابولیتهای ثانویه فنلی که در مسیر فنیل پروپانوئیدها و فلاونوئیدها قرار داشتند در مقایسه با سایر پروتئینها از فراوانی بیشتری (در حدود ۵۷ درصد) برخوردار بودند. نقش متابولیتهای ثانویه فنلی در ایجاد مقاومت به بیمارگرهای گیاهی در چند دهه اخیر مورد بررسی قرار گرفته است. ترکیبات فنلی علاوه بر تعامل با پروتئینهای وابسته به بیماریزایی و آنزیمهای دفاعی و فیتوالکسین‌ها به علت دارا بودن خواص آنتی بیوتیکی و آنتی اکسیدانتی و همچنین تقویت دیواره سلولی نقش مهمی را در پاسخهای دفاعی گیاه بر عهده دارند (۱۱ و ۲۳). در این میان مسیر فنیل پروپانوئید نقش بسیار مهمی را در پاسخهای دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها بازی می کند (۱). دراین پژوهش، برخی از آنزیمها در مسیر فنیل پروپانوئید مانندآنزیمهای PAL، Caffeic acid 3-O-methyltransferase، 4-Coumarate-CoA ligase (4CCL) و Cinnamoyl CoA reductase (CCR) که منجر به تشکیل لیگنین و تقویت دیواره سلولی می‌شوند. در پاسخ به بیمارگر در رقم مقاوم به شدت افزایش نشان دادند. افزایش حساسیت گیاه سورگوم در برابر *F. oxysporum* به دنبال خاموشی ژن *Cinnamyl alcohol dehydrogenase* گزارش شده است. همچنین در پژوهشی سلیم و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که قارچ تریکودرما با افزایش بیان ژنهای مرتبط با متابولیتهای ثانویه مانند فنیل پروپانوئیدها و Coumarate-CoA ligase در گوجه فرنگی سبب افزایش مقاومت این گیاه به بیمارگر *A.solani* شد (۵۴) که با نتایج این پژوهش سازگار هستند.

در برخی از گزارشات سطح آنزیم PAL در پاسخ دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها مهم شمرده شده است (۲). در حالی که بیان این آنزیم در زمان حمله بیمارگرهای قارچی در گیاه القاء می‌شود و در گیاهانی که این آنزیم سرکوب شده است حساسیت گیاه در برابر بیمارگر قارچی افزایش پیدا می کند (۱). در این پژوهش میزان بیان آنزیم PAL در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس ۲/۸۳ برابر بیشتر بود. تفاوت در القای سطوح آنزیم PAL در ارقام حساس و مقاوم هندوانه در پاسخ به بیمارگر *Podosphaera fusca* سبب تجمع بیشتر لیگنین و افزایش مقاومت در رقم مقاوم شد (۵۱). بنابراین می توان چنین استنباط کرد که افزایش بیان آنزیم PAL در رقم مقاوم سبب تجمع بیشتر لیگنین شده و به دنبال آن مقاومت بیشتر رقم Super 2270 را به همراه داشته است. یانگ و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه ایی نشان دادند که افزایش سطوح PAL و افزایش تجمع لیگنین سبب افزایش مقاومت گیاه گوجه فرنگی به بیمارگر *Botrytis cinerea* شد که با نتایج این پژوهش سازگار است (۶۳).

فلانوئیدها خانواده بزرگی از متابولیتهای ثانویه هستند که از مسیر متابولیکی فنیل الانین مشتق می‌شوند. این ترکیبات اکثراً در سلسله گیاهان وجود داشته و بیشتر نقش

فیتوالکسینی دارند که گیاه را در برابر بیمارگرها محافظت می‌کنند (۶۰). آنزیمهای Chalcone synthase و Flavonol synthase آنزیمهای کلیدی در مسیر فنیل پروپانوئید هستند که منجر به بیوسنتز مشتقات فلاونوییدی در گیاه می‌شوند. در پژوهشهای متعددی گزارش شده است که میزان آنزیم Flavonol synthase در تعامل گیاه با قارچهای بیمارگر به طور معنی داری افزایش یافته است که منجر به تسهیل و سنتز ایزوفلانوییدها شده است (۳۵). مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات فنلی به ویژه فلانوئیدها در ایجاد مقاومت گیاه در برابر بیمارگرهای قارچی نقش مؤثری دارند (۸). در پژوهشی کومار و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تغییرات پروتئوم و متابولوم ارقام حساس و مقاوم نخود به بیمارگر *F. oxysporum* دریافتند که متابولیتهای ثانویه در مسیر فنیل پروپانویید که منجر به تولید فلاونویید، ایزو فلانوئیدها و بیوسنتز فنلها می‌شوند در افزایش مقاومت گیاه نقش ویژه ایی دارند (۳۷) در پژوهشی آرفاو و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که میزان آنزیم Chalcone synthase در گیاه در مواجهه با بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* در گیاه سویا افزایش یافت و این افزایش سبب بالا بردن سطح ترکیبات فلاونوییدی در گیاه و در نتیجه منجر به افزایش مقاومت گیاه در برابر بیمارگر شده است (۱). در این پژوهش میزان بیان آنزیمهای Chalcone synthase و Flavonol synthase به شدت در رقم مقاوم افزایش یافت و میزان بیان آنها به ترتیب ۱۸ برابرو ۱/۹۷برابر نسبت به گیاه شاهد رسید در حالی که در رقم حساس بیان این آنزیمها نسبت به گیاه شاهد کاهش یافت و یا اصلا بیان نشد(Flavonol synthase) بنابراین می توان چنین استنباط کرد که ترکیبات فنلی ازجمله متابولیتهای ثانویه از گروه فنیل پروپانوئیدها و فلانوئیدها نقش بسیار مهمی در ایجاد مقاومت گیاه گوجه فرنگی در برابر *A. solani* دارند که با نتایج پژوهشهای آرفاو و همکاران (۲۰۱۶) و کومار و همکاران (۲۰۱۶) سازگار است (۱ و ۳۷).

پروتئینهای Heat Shock (HSP) به عنوان چاپرونهای مولکولی در فرایندهای متعددی همچون فولدینگ پروتئینها، تجمع و انتقال آنها، عبور و مرور پپتیدها و همچنین در ایمنی سلولی در برابر تنشهای زنده و غیر زنده دخالت دارند (۲۹ و ۳۴). نوئل و همکاران نشان دادند پروتئین HSP70 در گیاه آرابیدوبسیس در پاسخ به عامل بیماری سفیدک پودری افزایش یافت و همچنین بیش افزایی ژن HSP70 در این گیاه سبب افزایش مقاومت آن در برابر سویه های بیماریزای بیمارگر شد (۴۶). بیش افزایی فاکتورهای رونویسی مرتبط با HSP سبب افزایش مقاومت گیاه آرابیدوبسیس در برابر انواع تنشها شد (۲۹). افزایش بیان پروتئینهای HSP در برگ گوجه فرنگی بعد از مایه زنی با بیمارگر *Oidium neolycopersici* گزارش شده است (۴۹). در این تحقیق بیان پروتئین HSP70 در رقم مقاوم ۶ برابر افزایش یافت در حالی که در رقم حساس بیان نشد. بنابراین با توجه به افزایش این پروتئین در رقم مقاوم و بیان نشدن آن در رقم حساس می توان چنین نتیجه گرفت که این پروتئین در ایجاد مقاومت در برابر بیمارگر نکروتروف *A. solani* در گیاه گوجه فرنگی از اهمیت ویژه ایی برخوردار است که با سایر پژوهشهای ذکر شده نیز مطابقت دارد (۴۶).

میزان آنزیم Pectinesterase inhibitor در هر دو رقم بعد از مایه زنی با بیمارگر افزایش نشان داد. این آنزیم در اصلاح و بازسازی دیواره سلولی نقش دارد (۱۶). افزایش فعالیت پروتئینهای Pectinesterase inhibitor در گیاه *Coffea arabica* آلوده به بیمارگر *Colletotrichum kahawae* (۲۲) و گیاه آرابیدوبسیس آلوده به *A. brassicicola* (۴) نیز گزارش شده است که با نتایج این پژوهش سازگار است.

پروتئینهای درگیر در انرژی و متابولیسم: رابطه بسیار نزدیکی بین انرژی قابل دسترس و تحمل تنش در گیاهان وجود دارد. از این رو گیاهان برای حفظ انرژی و

هموستازی متابولیکی بسیار تلاش می‌کنند (۶). افزایش ATP در گیاهان تحت تنش برای تجزیه و بیوسنتز پروتئینها لازم است (۱۴). تحقیقات نشان می‌دهد که پروتئینهایی که جزء ترکیبات ATP سنتاز هستند، شامل چندین زیر واحدند که در بیوسنتز ATP نقش دارند (۴۴). ATP سلولی نقش مهمی به عنوان مولکول سیگنال در پاسخ دفاعی گیاه در برابر تنشها از جمله بیمارگرها دارند (۴۲). تغییرات متابولیکی یکی از عمومی ترین روش‌های دفاعی گیاه جهت حفاظت خود در برابر تنشهای زنده و غیر زنده است (۱۳). در این تحقیق متابولیسم سلولی در هر دو رقم گوجه فرنگی که با *A. solani* مایه زنی شده بودند تغییر کرد. این تغییرممکن است یک سیگنال متابولیکی باشد که سبب فعال شدن پاسخهای دفاعی شود. علاوه بر این در این پژوهش دو نوع ATP سنتاز شامل ATP synthase epsilon chain (لکه ۱۶۲) و ATP synthase subunit beta (لکه ۳۷) شناسایی گردید. پروتئین ATP synthase epsilon chain در واکنشهای بیوشیمیایی که به عنوان یک پاسخ سیگنالی در برابر حمله قارچ فعالیت می‌کنند مشارکت دارد (۵۰). داتا و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی گزارش کردند که بیان پروتئین ATP synthase subunit beta در برگ باقلا بعد ازمایه زنی با *A. alternate* افزایش یافت که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (۱۵).

ATP ها به طور عمده از طریق متابولیسم کربوهیدرات‌ها تولید می شوند. کربوهیدرات نه تنها جزء اساسی پلیمرهای ساختاری و ذخیره انرژی در گیاهان هستند بلکه به عنوان بستر و نیز منبع انرژی در تمام مسیرهای بیوشیمیایی سلولهای گیاهی دخالت دارند. همچنین آنها انرژی لازم برای واکنشهای دفاعی گیاه را تأمین و بیان ژنهای مربوط به دفاع را در طول تعاملات گیاه –بیمارگر به طور مثبتی تنظیم می‌کنند (۵۹). در پژوهش حاضر میزان آنزیم Succinate dehydrogenase (لکه شماره ۲) در رقم مقاوم بعد از مایه زنی با بیمارگر به میزان ۱/۸۵ برابر نسبت به شاهد افزایش داشت در حالی که در رقم حساس به طور معنی داری کاهش یافت. این آنزیم در متابولیسم کربوهیدرات‌ها دخالت دارد. همچنین با تولید ROS سبب فعال شدن بیان ژنهای دفاعی و به دنبال آن القای پاسخهای آنتی اکسیدانتی و در نتیجه ایجاد تحمل گیاه در برابر بیمارگرها می شود (۳۰). کومار و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی تغییرات پروتئوم گیاه نخود پس از مایه زنی با بیمارگر *F. oxysporum* دریافتند که میزان این آنزیم در رقم مقاوم نسبت به رقم حساس افزایش معنی داری داشته است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (۳۷).

متابولیسم اسیدهای آلی اهمیت اساسی در چندین مسیر بیوشیمیایی از جمله تولید انرژی و همچنین تشکیل پیش سازها برای بیوسنتز آمینو اسیدها و همچنین در پاسخهای گیاهی به تنشها دارد. مالات به عنوان یک سوبسترا درتنفس است که از طریق چرخه TCA با استفاده از malate dehydrogenase و NAD-malic enzyme عمل می کند (۴۷). چرخه تری کربوکسیل اسید نقش مهمی در پاسخهای دفاعی بازی می کند. در این چرخه NADPH تولید می‌شود که در سم زدایی گونه‌های اکسیژن (ROS)، فرایند تعمیر غشا و بیوسنتز متابولیتهای ثانویه نقش دارد (۱۸). آنزیم NAD-malic در چندین مسیر متابولیکی در گیاه دخالت دارد نقش تخصصی این آنزیم تثبیت کردن کربن در فتوسنتز است. علاوه بر این در بیوسنتز لیگنین ، فلاونوییدها و همچنین تولید ROS بعد از حمله بیمارگر به گیاه دخالت دارد (۲۰ و ۶۵). دراین پژوهش بعد از مایه زنی گیاه با بیمارگر، میزان آنزیمهای NAD-malic و Malate dehydrogenase در رقم مقاوم به ترتیب به میزان۳/۰۲ و ۳/۹۷ برابر در مقایسه با گیاه شاهد افزایش یافت در حالی که میزان بیان این آنزیمها در رقم حساس کاهش یافت. بنابراین می توان گفت که کاهش در میزان پروتئینهای وابسته به متابولیسم بعد از مایه زنی گیاه با بیمارگر سبب افت شدید در بیوسنتز متابولیتهای ثانویه و سایر مواد ساختمانی در رقم حساس شده است و زمینه را برای تخریب سلولها به وسیله بیمارگر مهیا نموده است

(۶۵). در بررسی تغییرات پروتئوم گیاهان در برابر بیمارگرها میزان این آنزیمها در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس بیشتر بیان شده است (۳۸ و ۴۵). افزایش بیان آنزیمهای وابسته به انرژی و متابولیسم در رقم مقاوم نشان دهنده این است که آنها از طریق تولید مواد ساختمانی و انرژی در نقش دفاعی گیاه در برابر بیمارگر *A. solani* مؤثر هستند که با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد.

پروتئینهای درگیر در فتوسنتز: فتوسنتز یک فرایند متابولیکی مهم برای فراهم کردن انرژی سلولی از طریق NADPH، ATP و کربن است و سبب رشد گیاه می شود. علاوه بر این فتوسنتز سبب تحریک پاسخهای دفاعی در برابر تنشها می شود (۳۳). پروتئینهای D1 و D2 و همچنینFerredoxin-NADP reductase که آخرین آنزیم در انتقال الکترون از فتوسنتز I به NADPH است و جزء ضروری فتوسنتز در گیاهان عالی هستند و نقش مهمی را در محافظت از سیستم فتوسنتز در برابر صدمات اکسیداتیو ناشی از تنشها دارند (۵۹). در این پژوهش، پروتئینهای Photosystem II D1، Photosystem II D2 و Ferredoxin-NADP reductase به ترتیب به میزان ۵/۰۱، ۳/۷۵ و ۱۰/۰۶ برابر در رقم مقاوم آلوده نسبت به تیمار شاهد افزایش داشتند در حالی که بیان این پروتئینها در رقم آلوده حساس در مقایسه با گیاهان شاهد کاهش نشان داد. بنابراین می توان چنین نتیجه گیری کرد که کاهش شدید بیان پروتئینهای D1 و D2 در رقم حساس آلوده منجر به خسارت سیستم فتوسنتزی در برابر واکنشهای اکسیداتیو ناشی از حضور بیمارگر در بافت گیاهی شده و این امر موجب شده که کارایی سیستم فتوسنتز به شدت کاهش یابد و منجر به حساسیت بیشتر گیاه به بیمارگر شود که با تحقیقات اشاره شده مطابقت دارد (۲۶).

پروتئینهای وابسته به بیوسنتز پروتئین: آنزیم S-adenosylmethionine synthase تنها دهنده گروههای متیل در بسیاری از واکنشهای متیلاسیون است که هیستون‌ها، اسیدهای نوکلئیک و فسفولیپیدها را اصلاح می‌کند. متیلاسیون چربیها سبب ذخیره انرژی و مقاومت گیاه در برابر حمله بیمارگرها می شود (۵۳). مقدار پایین این پروتئین سبب تجمع چربیها و صدمه زدن به بافت گیاهی شود (۱۷). آنزیم Serine carboxypeptidase نقش مهمی در رشد و نمو و همچنین در پاسخهای دفاعی گیاه دارد. این آنزیم در مسیرهای مختلف بیوشیمیایی کار می‌کند و برای رشد و نمو طبیعی گیاه حیاتی است و از طریق سنتز ترکیبات مختلف، گیاهان را در مقابل بیمارگرها و سایر تنشها محافظت می کند (۴۳ و ۶۶). همچنین این پروتئین در پراکسیداسیون چربیها نقش دارد و از طریق مسیر سیگنالی اسیدجاسمونیک تولید ROS می کند که سبب مقاومت گیاه در برابر بیمارگرها می‌شود (۶۶). میزان بیان آنزیمهای S-adenosylmethionine synthase و Serine carboxypeptidase در رقم Super2270 آلوده نسبت به تیمار شاهد به ترتیب ۱۳/۱۳و ۳ برابر افزایش یافت در حالی که در رقم حساس CH آلوده مقدار این آنزیمها در مقایسه با گیاه شاهدکاهش یافت. کاهش میزان بیان پروتئینهای درگیر در بیوسنتز پروتئین در رقم حساس می‌تواند ناشی از تخریب مسیرهای بیوسنتز سلولی باشد بنابراین گیاه نمی تواند پاسخهای دفاعی در برابر بیمارگر *A. solani* را حفظ کند که با سایر تحقیقات انجام شده مطابقت دارد (۱۷).

پروتئینهای درگیر در انتقال سیگنال: پروتئین فیتوکروم (لکه ۷۱) یک گروه از کلاس گیرنده‌های نوری هستند که نور قرمز را درک می کنند و همچنین در دفاع سلولی نقش دارند. مطالعات نشان می‌دهد که فیتوکرومها به عنوان واسطه‌های کلیدی در تنشهای زنده و غیر زنده دخالت دارند (۱۰). خاموشی ژنهای فیتوکروم در گیاهان سبب سرکوب بیان پروتئینهای وابسته به بیماریزایی و افزایش حساسیت گیاه به بیمارگرها می شود (۶۲). در این پژوهش میزان بیان این پروتئین در رقم حساس و مقاوم تیمار در مقایسه با شاهد بیش از ۲ برابر افزایش نشان داد. ولی

میزان افزایش به طور معنی داری در رقم مقاوم بیشتر بود. نتایج پژوهشهای انجام شده در این تحقیق نشان داد که این پروتئین در دفاع سلولی و همچنین افزایش مقاومت گوجه فرنگی در برابر بیمارگر *A. solani* نقش دارد که با نتایج پژوهشهایی که فیتوکرومها را برای دفاع سلولی در برابر انواع بیمارگرها ضروری گزارش کرده اند مطابقت دارد (۳۹ و ۶۲).

در این پژوهش پروتئینهای مختلفی در تعامل گیاه گوجه فرنگی با بیمارگر *A. solani* با استفاده از تکنیک پروتئومیکس شناسایی شدند. بیان این پروتئینها در مسیرهای مختلف در طول برهمکنش گوجه فرنگی با قارچ *A. solani* دستخوش تغییرات شدند ولی در این میان فراوانی پروتئینهای درگیر در مسیر سنتز متابولیتها و ترکیبات فنلی مانند فلانوییدها و فنیل پروپانوئیدها در مقایسه با سایر پروتئینها بیشتر بود. برخی از این دسته پروتئینها مانند آنزیم Isoflavone synthase که در مسیر سنتز فلاونوییدها هستند منجر به افزایش فیتوالکسین‌ها می‌شوند و برخی دیگر که در مسیر فنیل پروپانوئید هستند در سنتز لیگنین دخالت دارند. به نظر می‌رسد که تقویت دیواره سلولی و نقش ضد میکروبی ترکیبات فنلی از مهم ترین فرایندهای مقاومت در برابر قارچ بیمارگر *A. solani* باشد. نتایج این پژوهش اطلاعات ارزشمندی را در زمینه مسیرهای درگیر در تعاملات گیاه با بیمارگر *A. solani* ارائه می‌دهد و می تواند با به کارگیری ژنهای مقاومت مانند Flavonol synthase و HSP70 (که در این پژوهش فقط در رقم مقاوم بیان شدند) برای تولید ارقام مقاوم گوجه فرنگی به منظور کنترل بیماری لکه موجی مؤثر واقع شوند.

منابع

1. Arfaoui, A., El Hadrami, A., Adam, L.R., and Daayf, F., 2016. Pre-treatment with calcium enhanced defense-related genes' expression in the soybean's isoflavones pathway in response to *Sclerotinia sclerotiorum*. Physiological and molecular plant pathology. 93,12-21
2. Arfaoui, A., El Hadrami, A., Mabrouk, Y., Sifi, B., Boudabous, A., El Hadrami, I., Daayf, F., and Chérif, M., 2007. Treatment of chickpea with Rhizobium isolates enhances the expression of phenylpropanoid defense-related genes in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Plant Physiology and Biochemistry. 45(6-7),470-479
3. Aslam, B., Basit, M., Nisar, M.A., Khurshid, M., and Rasool, M.H., 2017. Proteomics: technologies and their applications. Journal of chromatographic science. 55(2),182-196
4. Bethke, G., Grundman, R.E., Sreekanta, S., Truman, W., Katagiri, F., and Glazebrook, J., 2014. Arabidopsis pectin methylesterases contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. Plant Physiology. 164(2),1093-1107
5. Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis. 8(2),93-99
6. Bolton, M.D., 2009. Primary metabolism and plant defense—fuel for the fire. Molecular plant-microbe Interactions. 22(5),487-497
7. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72(1-2),248-254
8. Buśko, M., Góral, T., Ostrowska, A., Matysiak, A., Walentyn-Góral, D., and Perkowski, J., 2014. The effect of Fusarium inoculation and fungicide application on concentrations of flavonoids (apigenin, kaempferol, luteolin, naringenin, quercetin, rutin, vitexin) in winter wheat cultivars. American Journal of Plant Sciences. 5(25),3727
9. Camejo, D., Guzmán-Cedeño, Á., and Moreno, A., 2016. Reactive oxygen species, essential molecules, during plant–pathogen interactions. Plant Physiology and Biochemistry. 103,10-23
10. Carvalho, R.F., Campos, M.L., and Azevedo, R.A., 2013. The role of phytochromes in stress tolerance. Salt Stress in Plants,283-299
11. Castellano, G., Tena, J., and Torrens, F., 2012. Classification of phenolic compounds by chemical structural indicators and its relation to antioxidant properties of Posidonia Oceanica (L.) Delile. environment. 2,6
12. Chandrashekar, N., Ali, S., and Grover, A., 2018. Exploring expression patterns of PR-1, PR-2, PR-3, and PR-12 like genes in *Arabidopsis thaliana* upon *Alternaria brassicae* inoculation. 3 Biotech. 8(5),1-10
13. Cipriano, A.K., Gondim, D.M., Vasconcelos, I.M., Martins, J.A., Moura, A.A., Moreno, F.B.,

Monteiro-Moreira, A.C., Melo, J.G., Cardoso, J.E., and Paiva, A.L.S., 2015. Proteomic analysis of responsive stem proteins of resistant and susceptible cashew plants after *Lasiodiplodia theobromae* infection. Journal of proteomics. 113,90-109

14. Das, S., Morvan, F., Jourde, B., Meier, V., Kahle, P., Brebbia, P., Toussaint, G., Glass, D.J., and Fornaro, M., 2015. ATP citrate lyase improves mitochondrial function in skeletal muscle. Cell metabolism. 21(6),868-876

15. Datta, R., Kumar, D., and Chattopadhyay, S., 2018. Membrane proteome profiling of Mentha arvensis leaves in response to *Alternaria* alternata infection identifies crucial candidates for defense response. Plant signaling & behavior. 13(4),e1178423

16. Day, A., Fénart, S., Neutelings, G., Hawkins, S., Rolando, C., and Tokarski, C., 2013. Identification of cell wall proteins in the flax (L inum usitatissimum) stem. Proteomics. 13(5),812-825

17. Ding, W., Smulan, L.J., Hou, N.S., Taubert, S., Watts, J.L., and Walker, A.K., 2015. s-Adenosylmethionine levels govern innate immunity through distinct methylation-dependent pathways. Cell metabolism. 22(4),633-645

18. Doubnerová, V. and Ryšlavá, H., 2011. What can enzymes of C4 photosynthesis do for C3 plants under stress? Plant Science. 180(4),575-583

19. El-Komy, M.H., 2014. Comparative analysis of defense responses in chocolate spot-resistant and-susceptible faba bean (Vicia faba) cultivars following infection by the necrotrophic fungus Botrytis fabae. The plant pathology journal. 30(4),355

20. Gautam, N., Marla, S., Mirza, N., Khan, Z., Singh, B., Wankhede, D., and Gawade, B., 2017. Evaluation of field pea accessions for root-knot nematode resistance and possible role of NADP dependent malic enzyme gene in host resistance. The Indian Journal of Genetics and Plant Breeding. 77(4)

21. Ghelfi, A., Gaziola, S., Cia, M., Chabregas, S., Falco, M., Kuser-Falcão, P., and Azevedo, R., 2011. Cloning, expression, molecular modelling and docking analysis of glutathione transferase from Saccharum officinarum. Annals of Applied Biology. 159(2),267-280

22. Gill, S.S. and Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant physiology and biochemistry. 48(12),909-930

23. Gill, U.S., Uppalapati, S.R., Gallego-Giraldo, L., Ishiga, Y., Dixon, R.A., and Mysore, K.S., 2018. Metabolic flux towards the (iso) flavonoid pathway in lignin modified alfalfa lines induces resistance against *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis*. Plant, Cell & Environment. 41(9),1997-2007

24. Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. ELECTROPHORESIS: An International Journal. 21(6),1037-1053

25. Houterman, P.M., Speijer, D., Dekker, H.L., de Koster, C.G., Cornelissen, B.J., and Rep, M., 2007. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants. Molecular plant pathology. 8(2),215-221

26. Huo, Y., Wang, M., Wei, Y., and Xia, Z., 2016. Overexpression of the maize psbA gene enhances drought tolerance through regulating antioxidant system, photosynthetic capability, and stress defense gene expression in tobacco. Frontiers in plant science. 6,1223

27. Hyon, G.-S., Ikeda, K.-i., Hosogi, N., Shinogi, T., and Park, P., 2010. Inhibitory effects of antioxidant reagent in reactive oxygen species generation and penetration of appressoria of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. Phytopathology. 100(9),840-847

28. Imam, J., Shukla, P., Prasad Mandal, N., and Variar, M., 2017. Microbial interactions in plants: perspectives and applications of proteomics. Current Protein and Peptide Science. 18(9),956-965

29. Jacob, P., Hirt, H., and Bendahmane, A., 2017. The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. Plant biotechnology journal. 15(4),405-414

30. Jardim-Messeder, D., Caverzan, A., Rauber, R., de Souza Ferreira, E., Margis-Pinheiro, M., and Galina, A., 2015. Succinate dehydrogenase (mitochondrial complex II) is a source of reactive oxygen species in plants and regulates development and stress responses. New Phytologist. 208(3),776-789

31. Jongedijk, E., Tigelaar, H., Van Roekel, J.S., Bres-Vloemans, S.A., Dekker, I., van den Elzen, P.J., Cornelissen, B.J., and Melchers, L.S., 1995. Synergistic activity of chitinases and β-1, 3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica. 85(1),173-180

32. Jorrin-Novo, J.V., Komatsu, S., Sanchez-Lucas, R., and de Francisco, L.E.R., 2019. Gel electrophoresis-based plant proteomics: Past, present, and future. Happy 10th anniversary Journal of Proteomics! Journal of proteomics. 198,1-10

33. Kangasjärvi, S., Tikkanen, M., Durian, G., and Aro, E.-M., 2014. Photosynthetic light reactions–An adjustable hub in basic production and plant immunity signaling. Plant Physiology and Biochemistry. 81,128-134

34. Khan, A., Ali, M., Khattak, A.M., Gai, W.-X., Zhang, H.-X., Wei, A.-M., and Gong, Z.-H., 2019. Heat shock proteins: dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses.

International journal of molecular sciences. 20(21),5321

35. Król, P., Igielski, R., Pollmann, S., and Kępczyńska, E., 2015. Priming of seeds with methyl jasmonate induced resistance to hemi-biotroph *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato via 12-oxo-phytodienoic acid, salicylic acid, and flavonol accumulation. Journal of plant physiology. 179,122-132

36. Kumar, D., 2020. Plant immune response strategies against pathogens. Plant Archives. 20(1),1169-1174

37. Kumar, Y., Zhang, L., Panigrahi, P., Dholakia, B.B., Dewangan, V., Chavan, S.G., Kunjir, S.M., Wu, X., Li, N., and Rajmohanan, P.R., 2016. *Fusarium oxysporum* mediates systems metabolic reprogramming of chickpea roots as revealed by a combination of proteomics and metabolomics. Plant biotechnology journal. 14(7),1589-1603

38. Laurindo, B.S., Laurindo, R.D.F., Fontes, P.P., Vital, C.E., Delazari, F.T., Baracat-Pereira, M.C., and da Silva, D.J.H., 2018. Comparative Proteomics Reveals Set of Oxidative Stress and Thaumatin-Like Proteins Associated with Resistance to Late Blight of Tomato. American Journal of Plant Sciences. 9(4),789-816

39. Li, J.-Y., Deng, X.-G., Chen, L.-J., Fu, F.-Q., Pu, X.-J., Xi, D.-H., and Lin, H.-H., 2015. Involvement of PHYB in resistance to Cucumber mosaic virus in Nicotiana *tabacum*. Plant Growth Regulation. 77(1),33-42

40. Li, M., Xu, J., Qiu, Z., Zhang, J., Ma, F., and Zhang, J., 2014. Screening and identification of resistance related proteins from apple leaves inoculated with *Marssonina coronaria* (EII. & JJ Davis). Proteome science. 12(1),1-17

41. Lodha, T.D., Hembram, P., and Nitile Tep, J.B., 2013. Proteomics: a successful approach to understand the molecular mechanism of plant-pathogen interaction.

42. Manzo, D., Ferriello, F., Puopolo, G., Zoina, A., D'Esposito, D., Tardella, L., Ferrarini, A., and Ercolano, M.R., 2016. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* induces distinct transcriptome reprogramming in resistant and susceptible isogenic tomato lines. BMC plant biology. 16(1),1-14

43. Milkowski, C. and Strack, D., 2004. Serine carboxypeptidase-like acyltransferases. Phytochemistry. 65(5),517-524

44. Millar, A.H., Whelan, J., Soole, K.L., and Day, D.A., 2011. Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. Annual review of plant biology. 62,79-104

45. Monazzah, M., Rabiei, Z., and Enferadi, S.T., 2018. The effect of oxalic acid, the pathogenicity factor of *Sclerotinia Sclerotiorum* on the two susceptible and moderately resistant lines of sunflower. Iranian Journal of Biotechnology. 16(1)

46. Noël, L.D., Cagna, G., Stuttmann, J., Wirthmüller, L., Betsuyaku, S., Witte, C.-P., Bhat, R., Pochon, N., Colby, T., and Parker, J.E., 2007. Interaction between SGT1 and cytosolic/nuclear HSC70 chaperones regulates Arabidopsis immune responses. The Plant Cell. 19(12),4061-4076

47. Petereit, J., Katayama, K., Lorenz, C., Ewert, L., Schertl, P., Kitsche, A., Wada, H., Frentzen, M., Braun, H.-P., and Eubel, H., 2017. Cardiolipin supports respiratory enzymes in plants in different ways. Frontiers in plant science. 8,72

48. Pinto, K.M.S., de Melo, P.A.F.R., Mondego, J.M., do Nascimento, L.C., Cortez, M.I.M.M., de Carvalho Aires, A.A., dos Anjos Neto, A.P., de Medeiros, R.L.S., Araujo, J.R.G., and da Silva, H.F., 2018. Plant extracts enhancers of defense response in ponkan mandarin Seedlings against *Alternaria alternate* f. spp. *citri* infection. African Journal of Agricultural Research. 13(13),650-656

49. Piterková, J., Luhová, L., Mieslerová, B., Lebeda, A., and Petřivalský, M., 2013. Nitric oxide and reactive oxygen species regulate the accumulation of heat shock proteins in tomato leaves in response to heat shock and pathogen infection. Plant Science. 207,57-65

50. Ray, S., Mondal, S., Chowdhury, S., and Kundu, S., 2015. Differential responses of resistant and susceptible tomato varieties to inoculation with *Alternaria solani*. Physiological and Molecular Plant Pathology. 90,78-88

51. Romero, D., Rivera, M.E., Cazorla, F.M., Codina, J.C., Fernández-Ortuño, D., Torés, J.A., Pérez-García, A., and de Vicente, A., 2008. Comparative histochemical analyses of oxidative burst and cell wall reinforcement in compatible and incompatible melon–powdery mildew (Podosphaera fusca) interactions. Journal of plant physiology. 165(18),1895-1905

52. Salim, A.P., Saminaidu, K., Marimuthu, M., Perumal, Y., Rethinasamy, V., Palanisami, J.R., and Vadivel, K., 2011. Defense responses in tomato landrace and wild genotypes to early blight pathogen *Alternaria solani* infection and accumulation of pathogenesis-related proteins. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 44(12),1147-1164

53. Schmid, K.M. and Patterson, G.W., 1988. Effects of cyclopropenoid fatty acids on fungal growth and lipid composition. Lipids. 23(3),248-252

54. Selim, M., 2015. Effectiveness of Trichoderma biotic applications in regulating the related defense genes affecting tomato early blight disease. J Plant Pathol Microb. 6(311),2

55. Silva, T., Almeida, C., Malafaia, C., Oliveira, L., Silva, M., and Correia, M., 2017. Analysis of protein profile of tomato root infected with

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*. Genet Mol Res. 16(2),10.4238

56. Simmons, E.,2007. Alternaria, an identification manual. CBC Biodiversity Series. 6: 1-775.

57. Singh, V.K., Singh, H.B., and Upadhyay, R.S., 2017. Role of fusaric acid in the development of 'Fusarium wilt'symptoms in tomato: Physiological, biochemical and proteomic perspectives. Plant physiology and biochemistry. 118,320-332

58. Sinha, R. and Chattopadhyay, S., 2011. Changes in the leaf proteome profile of Mentha arvensis in response to *Alternaria alternata* infection. Journal of proteomics. 74(3),327-336

59. Trouvelot, S., Héloir, M.-C., Poinssot, B., Gauthier, A., Paris, F., Guillier, C., Combier, M., Trdá, L., Daire, X., and Adrian, M., 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. Frontiers in plant science. 5,592

60. Wang, C., Zhi, S., Liu, C., Xu, F., Zhao, A., Wang, X., Tang, X., Li, Z., Huang, P., and Yu, M., 2017. Isolation and characterization of a novel chalcone synthase gene family from mulberry. Plant Physiology and Biochemistry. 115,107-118

61. Witzel, K., Buhtz, A., and Grosch, R., 2017. Temporal impact of the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae* on tomato root proteome. Journal of Proteomics. 169,215-224

62. Xie, X.-Z., Xue, Y.-J., Zhou, J.-J., Zhang, B., Chang, H., and Takano, M., 2011. Phytochromes regulate SA and JA signaling pathways in rice and are required for developmentally controlled resistance to *Magnaporthe grisea*. Molecular Plant. 4(4),688-696

63. Yang, C., Liang, Y., Qiu, D., Zeng, H., Yuan, J., and Yang, X., 2018. Lignin metabolism involves Botrytis cinerea BcGs1-induced defense response in tomato. BMC plant biology. 18(1),1-15

64. Yang, F., Jensen, J.D., Svensson, B., Jørgensen, H.J., Collinge, D.B., and Finnie, C., 2010. Analysis of early events in the interaction between *Fusarium graminearum* and the susceptible barley (Hordeum vulgare) cultivar Scarlett. Proteomics. 10(21),3748-3755

65. Youssef, S.A., Tartoura, K.A., and Greash, A.G., 2018. *Serratia proteamaculans* mediated alteration of tomato defense system and growth parameters in response to early blight pathogen Alternaria solani infection. Physiological and Molecular Plant Pathology. 103,16-22

66. Zhu, D., Chu, W., Wang, Y., Yan, H., Chen, Z., and Xiang, Y., 2018. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the serine carboxypeptidase-like protein family in poplar. Physiologia plantarum. 162(3),333-352

Investigation of proteome changes of susceptible and resistant cultivars of tomato leaves in response to pathogenic fungus *Alternaria solani*

Sadeghi B.[1], Salari M.[1], Mirzaei S.[2], Radman N.[1] and Sabbagh S.K.[3]

[1] Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Biotechnology, Institute of Science, High technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran.

[3] Dept. of Biology, Campus of Science, Yazd University, Yazd, I.R. of Iran.

Abstract

Early blight is one of the major diseases of tomato that reduce the quality and quantity of the product. Regarding the molecular mechanisms involved in the host defense to the pathogen, little information is available to realize the mechanisms of defense response of tomato to pathogenic fungus *Alternaria solani*. In this research, the protein profile (proteome) of tomato leaves were investigated using two-dimensional electrophoresis. A total of 610 detection protein showed 29 different expression proteins in resistant and susceptible cultivars. These proteins mainly involved in stress and defense, energy and metabolism, photosynthesis, protein biosynthesis, and signal transduction. Proteins involved in stress and defense such as pathogencity related proteins (PR) and biosynthesis of phenolic metabolite were the most frequent. The most important defense mechanisms of the plant against *A. solani* were strengthening of the cell wall and antimicrobial phenolic compounds. The results of this study can be used to production of resistant varieties of tomato against *A.solani.*

Key words: Early blight, Two-dimensional electrophoresis, resistance