

مقاله پژوهشی

متابولومیکس مقایسه‌ای گیاهچه‌های دو لاین تقریباً آیزوژنیک مقاوم و حساس گندم نسبت به بیماری زنگ برگی گندم

زهرا امجدی^۱، حبیب‌اله حمزه‌زرقانی^{۲*} و یونس قاسمی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۸)

چکیده

شناسایی مسیرهای دفاعی و متابولیت‌های مرتبط با مقاومت به عنوان زیست‌نشانگر برای غربالگری یا تشخیص سطوح مقاومت ارقام گندم به زنگ برگی گندم (*Puccinia triticina*) ابزاری مفید جهت افزایش سرعت، دقت و کاهش هزینه غربالگری مقاومت است. استخراج پروفیل متابولیتی بخش قطبی لاین‌های تقریباً آیزوژنیک گندم حساس (*Thatcher Lr22b*) و مقاوم (*Thatcher Lr25*) به زنگ برگی گندم در مرحله دو برگچه‌ای ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر، پودر تالک و آب مقطر استریل شده در سه تکرار در مخلوط متانول-آب انجام شد. تجزیه واریانس برای انتخاب متابولیت‌های موثر نشان داد که فراوانی ۲۶ متابولیت بین فاکتورهای آزمایشی شامل لاین‌ها، مایه‌زنی شده‌ها و برهمکنش لاین‌ها و مایه‌زنی شده‌ها اختلاف معنی‌داری داشتند. این متابولیت‌ها برای گروه‌بندی مشاهدات از نظر تشابهات و تفاوت‌های متابولیکی در فضای متابولوم بررسی شده تحت تجزیه ممیزی کانونی و تجزیه خوشه‌ای سلسله مراتب قرار گرفتند. نهایتاً ۱۶ متابولیت مرتبط با مقاومت و ۲۱ متابولیت مرتبط با بیماری‌زایی شناسایی شد که اکثر متابولیت‌های مرتبط با مقاومت هم در مقاومت القایی و هم در مقاومت ساختاری نقش داشتند که در مسیرهای سنتز دیواره سلولی، تولید ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی، تجمع اسید آمینه‌ها، تولید پروتئین-های مرتبط با مقاومت، به عنوان پیام رسان و فعالیت‌های ضد میکروبی در طول دفاع نقش داشتند. فعال‌تر شدن تعدادی از مسیرهای مهم در اثر حمله قارچ به گندم بحث می‌شود.

کلیدواژه: پروفیل متابولیکی، زنگ برگی گندم، غربالگری مقاومت، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: habibzarghani@yahoo.com

۱. دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۲. دانشیار، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۳. استاد، بخش زیست فناوری دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

Comparative metabolomics of seedlings of two susceptible and resistant wheat near isogenic lines to wheat leaf rust disease

Z. Amjadi¹, H. Hamzehzarghani^{2*}, and Y. Ghasemi³

(Received: 4.11.2018; Accepted: 27.2.2020)

Abstract

Identifying resistance related metabolites as biomarker for screening wheat germplasms resistant to leaf rust (*Puccinia triticina*) is a useful approach to increase the speed, accuracy and cost effectiveness of screening disease resistance. The relatively polar metabolites were extracted in a mixture of methanol-water from near isogenic line (NILs) of wheat susceptible (Thatcher *Lr22b*) or resistant (Thatcher *Lr25*) to leaf rust in the two leaf stage, 24 h after inoculation with the pathogen, talcum powder or sterilized distilled water, in three replications. Metabolites were analyzed using a GC/MS. ANOVA showed that abundance of 26 metabolites had significant differences among experimental factors including near isogenic lines (NILs), inoculation (I) and NILs \times I interaction. Abundance of 26 significant metabolites was subjected to canonical discriminant analysis and hierarchical cluster analysis to group observations of metabolite profiles based on similarities and differences in the investigated metabolic space. Finally 13 resistance related metabolites (RR) and 13 Pathogenesis related metabolites (PR) were identified that the majority of RR metabolites involved in induced resistance and constitutive resistance. Significant metabolites included metabolites with potential signaling and/or antimicrobial activity as well as molecules used as precursors for cell wall reinforcement, phenolic and alkaloids compounds, and accumulation of amino acids and proteins associated with resistance. Up-regulation of the number pathways upon infection of wheat to leaf rust fungus is discussed.

Keywords: metabolic profiling, Wheat leaf rust, screening resistance, gas chromatography/mass spectrometry

* Corresponding author's E-mail: habibzarghani@yahoo.com

1. Ph.D. of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
2. Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.
3. Professor, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

مقدمه

ژن *Lr25* روی کروموزوم ۴BS (Driscoll & Anderson 1968) همیشه با ژن *Pm7* برای مقاومت نسبت به سفیدک پوردی (Driscoll & Anderson 1967) همراه است و هر دو در یک قطعه از کروموزوم چاودار واقع شده‌اند. این ژن در فاصله یک سانتی‌مورگان از سانترومر ۴B (Driscoll & Bielig, 1968) نقشه‌برداری شده است. این ژن از *Secale cereal cv.* Rosen به یک لاین گندم معمولی منتقل شد، سپس Transec آن طراحی شد (Driscoll & Jensen 1964).

زنگ برگ گندم یک زنگ بلند چرخه و دگرپایه است. برای کامل کردن چرخه زندگی به یک میزبان تلپومی/یوریدیومی (معمولاً گندم) و یک میزبان متناب برای مرحله پیکنیوم/ایسیوم (*T. speciosissium*) و *Isopyrum fumaroides* نیاز دارد. یوریدیوسپورها با باد یا باران روی سطح برگ گندم قرار می‌گیرند، در صورت فراهم بودن رطوبت ظرف ۲ تا ۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تولید لوله تندش می‌کنند. رشد لوله تندش با پاسخ تیگموتروپی نسبت به توپوگرافی سطح برگ کنترل می‌شود. لوله تندش تا رسیدن به روزنه رشد کرده و تشکیل اپرسوریوم می‌دهند. نهایتاً میخ رخنه وارد فضای بین سلولی شده وارد سلول‌های مزوفیل شده اینمدت زمان حدود ۲۴ ساعت طول می‌کشد (Bolton et al. 2008a).

تهیه ارقام مقاوم به زنگ کاری بسیار وقت‌گیر و هزینه‌بر است و مقاومت ارقام مقاوم پس از چند سال کشت پی‌در-پی، به اصطلاح شکسته می‌شود علت این کار اولاً در اثر به وجود آمدن نژادهای فیزیولوژیکی جدید زنگ‌ها است و ثانیاً نژادهایی که قبلاً روی ارقام قبلی به صورت مغلوب بوده‌اند ممکن است در اثر تعویض ارقام فرصت پیدا کنند و پس از چند سال به صورت غالب درآیند. اصلاح

زنگ برگی یا زنگ قهوه‌ای گندم با عامل *Puccinia triticina* Eriksson که اخیراً نام علمی *Puccinia persistens* subsp. *triticina* (Erikson) Z. Urban & J. Markova برای آن مشخص گردیده است (Abbasi et al. 2005)، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم است که در اکثر مناطق گندم‌کاری دنیا وجود داشته و در مقایسه با زنگ زرد و سیاه گسترش بیش‌تری در سطح جهانی دارد (Bolton et al. 2008b). این بیماری به صورت اندمیک در تمام مناطق ایران وجود دارد و از لحاظ اهمیت اقتصادی بعد از زنگ زرد قرار دارد و هر ساله در اواخر فصل روی ارقام حساس ظاهر می‌شود و باعث کاهش کمی و کیفی محصول گندم می‌گردد (Ershad 2009).

تاکنون بیش از ۲۰۰ نژاد فیزیولوژیک برای زنگ قهوه‌ای گندم شناسایی شده است. تنوع عامل بیماری‌زا و سازگاری به شرایط متنوع آب‌وهوایی به تداوم *P. triticina* به عنوان بیمارگر مهم گندم کمک می‌کند. از طرف دیگر، بیش از ۷۰ ژن مقاومت به زنگ برگی (*Lr*) در گندم شناسایی شده است (Bolton et al. 2008a). بیش‌تر ژن‌های مقاومت در برابر زنگ برگی به نژاد خاصی از *P. triticina* مقاوم‌اند. ژن‌های *Lr* نژاد-اختصاصی در مرحله گیاهچه موثر می‌باشند و مقاومت تا مرحله بلوغ هم باقی می‌ماند. فنوتیپ ناشی از مقاومت نژاد-اختصاصی از یک پاسخ فوق حساسیت تا یوریدیوم‌های کوچک احاطه شده با لکه‌های بافت مرده بروز می‌کند (Bolton et al. 2008b). تعداد کمی از ژن‌های مقاومت از جمله ژن *Lr34* در برابر زنگ برگ دارای مقاومت نژاد-غیر اختصاصی است و موجب بیان مقاومت جزئی در گیاهان بالغ نسبت به تمام نژادهای عامل بیماری‌زا می‌شود (Bolton et al. 2008b).

می‌شود) Thatcher Lr22b و Thatcher Lr25، به ترتیب حساس در مرحله‌ی گیاهچه و مقاوم نسبت به بیمارگر از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. بذور در گلدان‌های نه سانتی‌متری پر شده با خاک سترون شده، در عمق یک سانتی‌متری کاشته شدند. خاک مورد استفاده ترکیبی از خاک زراعی سترون شده با گاز متیل بروماید (دوسوم) و خاک برگ (یک‌سوم) بود. نه گلدان از هر یک از بذره‌های لاین‌های Thatcher Lr22b و Thatcher Lr25 کاشته شد. گلدان‌ها در اتاقک رشد با میانگین دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد با شدت نوری ۳۰۰۰ لوکس، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شدند. برای آبیاری بر حسب نیاز گلدان‌ها از آب مقطر سترون شده استفاده شد (Bolton et al. 2008b).

تهیه مایه برای مایه‌زنی

از یوریدیوسپوره‌های *P. triticina* جدایه‌ی گرگان به عنوان بیمارگر پرآزار در ایجاد زنگ برگ استفاده شد. این بیمارگر از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. به دلیل نگهداری یوریدیوسپورها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد، برای فعال شدن اسپورها، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به مدت پنج دقیقه در حمام-آب با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تکان داده شدند. برای رطوبت‌دهی، به مدت پنج ساعت در دسیکاتوری قرار گرفتند. در این پژوهش تهیه مایه برای مایه‌زنی از مخلوط یک به پنج از بیمارگر و پودر تالک استفاده شد (Bolton et al. 2008b).

بررسی درصد جوانه‌زنی اسپورها

درصد جوانه‌زنی اسپورها روی محیط آب آگار پس از ۲۴ ساعت تاریکی در اتاقک رشد با میانگین دمای ۱۸

کنندگان نباتات به دنبال ابزارهای سریع، آسان و دقیق برای غربال‌گری مقاومت ارقام نسبت به بیماری می‌باشند (Bolton et al. 2008a). متابولوم به مجموعه متابولیت‌های موجود در یک موجود زنده اطلاق می‌شود که فنوتیپ بیوشیمیایی یک سلول یا بافت است (Sumner et al. 2003). متابولیت‌ها محصولات نهایی بیان ژن‌ها هستند و تمام تغییرات در بیان ژن‌ها در پروفیل متابولیتی نمایان می‌شود و برخی از این متابولیت‌ها احتمالاً به عنوان بیومارکر مقاومت در به‌نژادی مقاومت دارند (López-Gresa et al. 2010).

یکی از قوی‌ترین روش‌های تشخیص مکانیسم‌ها در سطح متابولیکی از جمله مکانیسم مقاومت بررسی عمومی پروفیل متابولیت‌ها با استفاده از رویکرد متابولومیکس است (Tang et al. 2009). در این تحقیق متابولوم ناشی از برهمکنش *P. triticina* - لاین تقریباً آیزوژنیک حساس Thatcher Lr22b) و *P. triticina* - لاین تقریباً آیزوژنیک دارای مقاومت نژاد-اختصاصی Thatcher Lr25) در مرحله‌ی گیاهچه در مقایسه با شاهد به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی (GC-MS) در این تحقیق با هدف شناسایی متابولیت‌های مرتبط با مقاومت به عنوان بیومارکرهایی با ظرفیت بالقوه برای غربال‌گری یا تشخیص سطوح مقاومت ارقام گندم به زنگ قهوه‌ای گندم و شناسایی مکانیسم‌های درگیر در مقاومت مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌های بررسی

کشت و پرورش گیاهان

بذره‌های لاین‌های تقریباً آیزوژنیک (به علت روانی در ادامه متن از لاین به جای لاین تقریباً آیزوژنیک استفاده

درجه سانتی‌گراد در بزرگ‌نمایی ۱۰ در زیر میکروسکوپ با انتخاب تصادفی پنج ناحیه روی محیط‌کشت در سه تکرار بررسی شد.

مایه‌زنی

تقریباً ۱۴ روز پس از کشت و زمانی که گیاهان به مرحله دو برگچه‌ای رسیدند، مایه‌زنی انجام گردید. تمام برگچه‌های گیاهان یک سوم از گلدهان‌های لاین‌های حساس و مقاوم به‌تنهایی با آب مقطر سترون به عنوان شاهد منفی، یک سوم از گلدهان‌ها ابتدا با آب مقطر سترون و سپس با پودر تالک به عنوان شاهد مثبت و باقیمانده گلدهان‌ها ابتدا با آب مقطر سترون و سپس با مایه تهیه شده، مایه‌زنی شدند و هریک از گلدهان‌ها جداگانه با پلاستیکی که سطح درونی آن آب مقطر سترون پاشیده شده بود، پوشش داده شدند. تمام گلدهان‌ها به مدت ۲۴ ساعت در اتاقک رشد با دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد، تاریکی مطلق و رطوبت نسبی بالا قرار گرفتند. سپس آنها را بیرون آورده و از هر کدام تعدادی برگ که حداقل ۳۰۰ میلی‌گرم وزن داشتند، جدا شد. برای بررسی علایم ایجاد شده روی گیاهان توسط عامل بیماری‌زا، تمام گلدهان‌ها در شرایط ۱۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ابتدا دوره کمون اندازه‌گیری شد و سپس دوره نهفتگی بیماری بر مبنای علائم ظاهر شده یا تیپ آلودگی براساس روش (Roelfs et al. 1992) بررسی گردید.

استخراج متابولیت

عملیات استخراج متابولیت‌های نمونه‌ها، به روش فین و همکاران (Fiehn et al. 2000) انجام شد. جهت استخراج متابولیت‌های هر نمونه گیاهی، به 30 ± 30 میلی‌گرم بافت تازه پودر شده با ازت مایع، $1/4$ میلی‌لیتر متانول خالص

(100 MeOH) اضافه گردید و مخلوط حاصله به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس ۵۰ میکرولیتر ریبتول (mg Nonadecanoic acid methyl ester $2 \text{ mg ml}^{-1} \text{ CHCl}_3$) و 50 ml^{-1} میکرولیتر $2 \text{ mg ml}^{-1} \text{ CHCl}_3$ ester) و 300 میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده به مخلوط اضافه شده و در دمای 70 درجه سانتی‌گراد برای 15 دقیقه تکان داده شدند و در 12500 g به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ گردید. ترکیب متانول با یک شوک حرارتی بالا (دمای 70 درجه سانتی‌گراد) که در بالا ذکر شد، به عنوان غیر فعال کننده‌ی اغلب آنزیم‌ها شناخته شده است و پیش‌نیاز لازم برای جلوگیری از تغییرات در ترکیب متابولیت‌ها در اثر فعالیت‌های آنزیمی است (Roessner et al. 2000). پس از سانتریفیوژ، روشین در قسمت بالای لوله‌ی اپندورف و قطعات گیاهی به صورت رسوب در ته لوله قرار گرفت. روشین با استفاده از میکروپیپت برداشته شده و با عبور از میکروفیلترهای Ultra-free-CI که دارای منافذی به قطر 0.22 میکرومتر به لوله‌ی اپندورف دیگری منتقل شدند و در 4000 rpm به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب 750 میکرولیتر کلروفرم (CHCl_3) اضافه کرده و در 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه قرار گرفت. سپس در 12500 g به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از این مرحله روشین را برداشته و به همان لوله‌ی اپندورفی که بخش قطبی حاصل از سانتریفیوژ اول ریخته شده بود، اضافه گردید. سپس $1/4$ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه کرده و به خوبی تکان داده شد و در 4000 rpm به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از این مرحله مخلوط به فاز رویی یا فاز قطبی شامل $2/8$ میلی‌لیتر و فاز زیرین یا فاز غیر قطبی شامل 800 میکرولیتر تقسیم شد. یک میلی‌لیتر از بخش قطبی برای کار با GC-MS برداشته شد. برای تصحیح تغییرات رخ داده در طول آماده‌سازی و آنالیز نمونه یک سری استانداردهای

دقیقه ثابت ماند.

تعیین پروفیل متابولیتی

اطلاعات خروجی از GC-MS ابتدا توسط نرم-افزار Enhanced Data Analysis نسخه G1701CA (C.00.00 21.Dec-1999) همراه دستگاه GC-MS واقع در بخش زیست فناوری دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز ارزیابی شد. در این ارزیابی کتابخانه WileyL.265، برنامه جست‌وجو بر مبنای طیف جرمی، برای شناسایی ترکیبات به کار رفت. برای اطمینان بیش‌تر در جهت متابولیت‌های شناسایی شده با نرم‌افزار همراه دستگاه، از نرم‌افزار AMDIS نسخه ۲.۶۲ (Mar, 2005) استفاده شد. در این نرم‌افزار از کتابخانه NIST (موسسه ملی تکنولوژی و استانداردها)، برنامه جست‌وجوی طیف جرمی نسخه ۲ d، استفاده گردید. از هر دو کتابخانه علاوه بر نام متابولیت اطلاعاتی مانند زمان نگهداری، فراوانی، نام‌های دیگر برای نام انتخابی، ساختار ترکیب و غیره بدست آمد. تنها متابولیت‌هایی که در هر سه تکرار از تیمارهای مختلف پیک قابل تشخیص داشتند برای آنالیزهای بیش‌تر مورد استفاده قرار گرفتند. زمان نگهداری و فراوانی متابولیت‌های شناسایی شده برای تمام تکرار از تیمارهای مختلف در جدول اکسل مرتب شد.

طرح آزمایش و واکاوی‌های آماری

آزمایش بصورت فاکتوریل تحت یک طرح کاملاً تصادفی با فاکتور لاین گندم با دو سطح (Thatcher Lr22b و Thatcher Lr25) و فاکتور مایه زنی با سه سطح برای هر لاین (مایه‌زنی شده با آب، پودر تالک و بیمارگر) در سه تکرار طراحی شد. داده‌های بدست آمده از فراوانی پروفیل متابولیتی با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS

داخلی به نمونه اضافه می‌شود. طی یک مرحله کاهش حجم با دستگاه speedvac فاز قطبی خشک گردید. عمل Methoximation با تثبیت بخش کربونیل در موقعیت β و احیاء قند از حلقوی شدن قندها ممانعت می‌کند. از آنجا که عمل اشتقاق مستقیم قندهایی مثل فروکتوز باعث اختلال در تشخیص نقاط اوج (peak) مربوط به هگزوزها (hexoses) می‌گردد، عمل متوکسیمه کردن با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از محلول ۲۰ میلی‌گرم Methoxyamine hydrochloride در یک میلی‌لیتر Pyridine، به یک میلی-لیتر حاصل از بخش قطبی و حرارت دهی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در حمام-آب شیکر انجام شد (Roessner et al. 2000). از آنجا که بیش‌تر متابولیت‌ها غیر فرآر هستند، عمل اشتقاق با اضافه کردن ۸۰ میکرولیتر N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide (MSTFA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه برای فرآر شدن آن‌ها در حمام-آب شیکر قرار داده شدند.

واکاوی توسط GC-MS

یک میکرولیتر از هر یک از فازهای قطبی (آب-متانول) از هر تکرار به طور جداگانه با استفاده سوزن همپلتون به ورودی دستگاه GC-MS مدل Hewlett-Packard 6890 (No. 190915.433, USA) تزریق شد. در زمان تزریق دمای ورودی دستگاه ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد بوده و از ستون موئینه از نوع HP-5M (phenyl methyl siloxan, 25m, 0.25mm) و گاز بی اثر هلیم به عنوان حامل (سرعت جریان برابر با یک میلی‌لیتر در دقیقه) استفاده شد. دمای آون در ۷۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۵ دقیقه ثابت و سپس به ازای هر دقیقه ۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به دمای آن اضافه و پس از رسیدن به دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، سه

واریانس شناسایی مسیرهای درگیر در پاتوسیستم گندم - *P. triticina* با نرم افزار متابوآنالیست (MetaboanalystR) بر مبنای مقایسه متابولیت‌های معنی‌دار با کتابخانه *Oryza sativa japonica* صورت گرفت (Mahdavi et al. 2016; Chong et al. 2018).

نتایج

نتایج مایه‌زنی لاین‌های مقاوم و حساس گندم با یورید یوسپورهای *Puccinia triticina*

میانگین درصد جوانه‌زنی یورید یوسپورهای *Puccinia triticina* در بزرگنمایی ۱۰، با خطای معیار میانگین برابر ۱/۱۵ درصد، ۸۵/۴۴ درصد بود (محدوده اطمینان ۹۵ درصد برابر ۸۳/۱۸ تا ۸۷/۷۰ درصد) که درصد جوانه زنی قابل قبولی برای ایجاد بیماری است.

دوره کمون (Incubation period) بیماری تعداد روز از زمان آلودگی تا بروز اولین علائم یعنی خالک (fleck) در نظر گرفته شد. اولین علائم (لکه‌های سفید مایل به زرد=خالک) روی لاین‌های حساس مایه‌زنی شده با بیمارگر تقریباً چهار روز و تعداد بسیار کمی از این لکه‌ها روی لاین‌های مقاوم مایه‌زنی شده با بیمارگر تقریباً ۱۰ روز پس از مایه‌زنی ظاهر شد. دوره‌ی نهفتگی (latent period) به تعداد روز از زمان مایه‌زنی تا ظهور اولین جوش روی برگچه‌ها گفته می‌شود. اولین جوش‌ها روی خالک‌های ظاهر شده روی لاین‌های حساس مایه‌زنی شده با بیمارگر تقریباً ۱۰ روز و روی برخی از خالک‌های ظاهر شده روی لاین‌های مقاوم مایه‌زنی شده با بیمارگر تقریباً ۱۴ روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد.

تحت تجزیه واریانس (ANOVA) قرار گرفتند. در صورتی که $P \leq 0.01$ بود به عنوان متابولیت خیلی معنی‌دار (highly significant)، $0.01 < P \leq 0.05$ ، معنی‌دار (significant) و $0.05 < P \leq 0.2$ مرزی (borderline significant) در نظر گرفته شد. متابولیت‌های رد شده از فیلتر تجزیه واریانس که اثر حداقل یکی از فاکتورها یا بر هم کنش آنها معنی‌دار بود به منظور گروه بندی نمونه‌ها بر اساس پروفیل متابولیکی‌شان در گروه‌های تیماری وارد مرحله تجزیه آماری چند متغیره شدند. در این مرحله برای یافتن گروه‌های متابولیتی مرتبط با هم که محور خاصی از دفاع گیاه را اندازه می‌گیرند از تجزیه ممیزی کانونی (Canonical Discrimination Analysis=CDA) استفاده گردید. یک روش آماری چند متغیره برای کاهش ابعاد داده‌ها و خلاصه کردن اطلاعات موجود در داده‌ها در تعداد کمتری متغیر ارتوگونال می‌باشد. ضرایب کانونی متابولیت‌ها شاخص وزن یا اهمیت هر متابولیت در نمره کانونی یک نمونه می‌باشد. هر چه وزن به یک نزدیکتر باشد به معنی آن است که متابولیت مربوطه نقش مهمتری در نمره کانونی حاصله برای یک نمونه مشخص دارد. برای نمایش بهتر تقسیم بندی مشاهدات (نمونه‌ها) به وسیله محورهای کانونی (که در واقع متغیرهای جدیدی هستند که مقاومت ساختاری و القایی را اندازه می‌گیرند) از تجزیه خوشه‌ای سلسله مراتب (Hierarchical Cluster Analysis) استفاده می‌شود. تجزیه کانونی با استفاده از رویه CANDISC و تجزیه کلاستر با رویه cluster نرم‌افزار SAS انجام گرفت (Johnson 1998).

شناسایی مسیر

بر اساس ترکیبات معنی‌دار رد شده از فیلتر تجزیه

پس از عمل پیش‌پردازش روی کروماتوگرام‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. در کل ۵۲ متابولیت شناسایی شد که در بین تمام تیمارها مشترک بودند و از گروه‌های شیمیایی مختلف شامل اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، اسیدهای چرب، آمین‌ها و قندها می‌باشد.

متابولیت‌های شناسایی شده در پاتوسیستم گندم -

Puccinia triticina

نتایج حاصل از واکاوی شیمیائی برگهای آلوده به بیماری زنگ برگی نشان داد که هر کروماتوگرام (نمونه) تقریباً شامل ۱۰۰ پیک بود. اطلاعات بدست آمده از شناسایی پیک‌های هر کروماتوگرام حاصل از GC-MS

جدول ۱. متابولیت‌های مشترک در بین تمام تیمارها از لاین‌های *Thatcher Lr22b* و *Thatcher Lr25* به ترتیب حساس و مقاوم به *Puccinia triticina* در مرحله گیاهچه‌ای.

Table 1. Common metabolites among all treatments of Thatcher *Lr22b* and Thatcher *Lr25*, respectively, susceptible and resistant to *Puccinia triticina*. in seedling stage

N ¹	Compound name	CAS	RT ²	CG ³
1	L-Alanine, N-(TMS)-, TMS ester	26844-07-1	6.49	AA ⁴
2	N,O,O-tri(TMS)-1-c(13)-N-carboxy-glycine	000-00-0	7.49	AA
3	Pentasiloxane, dodecamethyl-	141-63-9	8.05	AM ⁵
4	Phosphoric acid, bis(TMS)monomethyl ester	000-00-0	8.26	OA ⁶
5	L-Valine, N-(TMS)-, TMS ester	7364-44-5	9.03	AA
6	Glycine, N,N-bis(TMS)-, methyl ester	25688-73-7	10.12	AA
7	L-Leucine, N-(TMS)-, TMS ester	7364-46-7	10.31	AA
8	L-Isoleucine, N-(TMS)-, TMS ester	7483-92-3	10.88	AA
9	Butanedioic acid, bis(TMS) ester=succinic acid	40309-57-7	11.32	OA
10	.L-Threonine, N,O-bis(TMS)-, TMS ester	02/02/7537	13.26	AA
11	L-Proline, 5-oxo-1-(TMS)-, TMS ester	30264-77-2	16.37	AA
12	Propanoic acid, 2,3-bis[(TMS)oxy]-, TMS ester	38191-87-6	11.9	OA
13	Butanedioic acid, methylene-, bis(TMS) ester	55557-26-1	12.09	OA
14	Butanedioic acid, [(TMS)oxy]-, bis(TMS) ester	38166-11-9	15.79	OA
15	L-Asparagine, N,N2-bis(TMS)-, TMS ester	55649-62-2	19.93	AA
16	Citric acid -TETRATMS	14330-97-3	23.21	OA
17	Tetradecanoic acid, TMS ester	18603-17-3	23.33	FA
18	L-Tyrosine, N,O-bis(TMS)-, TMS ester	51220-73-6	25.39	AA
19	Hexadecanoic acid, TMS ester	55520-89-3	26.15	FA ⁷
20	Xyloitol 5TMS	14199-72-5	20.67	SU
21	Myo-Inositol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(TMS)-	2582-79-8	28.45	SU
22	D-Glucuronic acid, 2,3,4,5-tetrakis-O-(TMS)-, TMS ester	55530-80-8	33.61	OA
23	Gulose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-	56192-86-0	30.5	SU
24	alpha.-D-Galactopyranose, 1,2,3,4,6-pentakis-O-(TMS)-	32166-80-6	35.8	SU
25	Glutamic acid, N-(TMS)-, bis(TMS) ester, L-	15985-07-6	18.72	AA
26	L-Aspartic acid, N-(TMS)-, bis(TMS) ester	55268-53-6	16.49	AA
26	Serine tritms	64625-17-8	12.61	AA
28	D-Fructose, 1,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, O-methyloxime	56196-14-6	24.67	SU
29	D-Glucose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, o-methyloxyme, (1E)-	130405-10-6	24.98	SU
30	D-Galactose, 2,3,4,5,6-pentakis-O-(TMS)-, o-methyloxyme, (1Z)-	128705-71-5	25.26	SU
31	Phenylalanine 2TMS	000-00-0		AA
32	Cis-aconitic acid triTMS	55530-71-7	21.7	OA
33	Silanol, trimethyl-, phosphate (3:1) phosphoric acid-TRITMS	10497-05-9	10.48	OA
34	3,7-Dioxa-2,8-disilanonane, 2,2,8,8-tetramethyl-5-[(TMS)oxy]-=glycerol-TRI-TMS Ether	10/06/6787	18.03	OA
35	BisTMS Lactic acid	000-00-0	6.09	OA

جدول ۱. ادامه

Table 1. Continued

N ¹	Compound name	CAS	RT2	CG3
36	Methylmaleic acid 2TMS	77220-12-3	13.42	OA
37	Ribonic acid, 2,3,4,5-tetrakis-O-(TMS)-, TMS ester	57197-35-0	22.21	OA
38	L-Glutamine, tris(TMS) deriv.	56145-13-2	22.13	AA
39	Decanoic acid, decyl ester	1654-86-0	23.69	FA
40	Allonic acid, 2,3,5,6-tetrakis-O-(TMS)-, lactone	55515-34-9	22.46	OA
41	D-Glucuronic acid PK B 5TMS	64665-64-1	21.92	OA
42	Octadecanoic acid, TMS ester	18748-91-9		FA
43	Serine-DITMS	70125-39-2	10	AA
44	D-Glucitol, 1,2,3,4,5,6-hexakis-O-(TMS)-	14199-80-5	25.53	SU
45	Sucrose-OCTATMS	19159-25-2	37.81	SU
46	2,3,4-Trihydroxybutyric acid tetrakis(TMS) deriv.	38191-88-7	17.61	OA
47	à-Amino adipic acid triTMS	66434-50-2	20.85	OA
48	D-Ribose, 2,3,4,5-tetrakis-O-(TMS)-, O-methyloxime	56196-08-8	20.33	SU
49	1-Cyclohexene-1-carboxylic acid, 3,4,5-tris[(TMS)oxy]-, TMS ester	55520-78-0	23.02	OA
50	: à-D-Glucopyranosiduronic acid	52842-25-8	23.99	SU
51	9H-Purin-6-amine, N,9-bis(TMS)-	17995-04-9	23.9	AM
52	Silane, [[[3á,5à,20R)-pregnane-3,17,20,21-tetrayl] tetrakis(oxy)]tetrakis(trimethyl-	17846-09-2	24.13	AM

1 = Number; 2 = Retention time; 3 = Chemical group; 4 = Amino acid; 5 = Amine; 6 = Organic acid; 7 = Fatty acid

معنی دار بود (جدول ۲).

متابولیتی که فراوانی بالاتر معنی داری در لاین‌های Thatcher *Lr25* مایه‌زنی شده با تالک (RT) نسبت به لاین‌های Thatcher *Lr22b* مایه‌زنی شده با تالک (ST) و همچنین فراوانی بالاتر معنی داری در لاین‌های Thatcher *Lr25* مایه‌زنی شده با بیمارگر (RP) نسبت به لاین‌های Thatcher *Lr22b* مایه‌زنی شده با بیمارگر (SP) داشت (RT > ST و RP > SP) به عنوان متابولیت‌های مرتبط با مقاومت (Resistance-related metabolites=RR) در نظر گرفته شدند. در این پژوهش ۱۶ متابولیت RR شناسایی شد. این متابولیت‌ها مربوط به پنج گروه شیمیایی مختلف: اسید آمینه، اسید آلی، اسید چرب، قندها و آمین بودند (جدول ۲).

متابولیتی که فراوانی بالاتر معنی داری در لاین‌های Thatcher *Lr25* مایه‌زنی شده با بیمارگر (RP) نسبت به لاین‌های Thatcher *Lr25* مایه‌زنی شده با تالک (RT) داشتند و همچنین فراوانی بالاتر معنی داری در لاین‌های

نتایج تجزیه واریانس متابولیت‌های شناسایی شده در پاتوسیستم گندم - *Puccinia triticina*

تجزیه واریانس به عنوان یک فیلتر آماری برای گزینش متابولیت‌هایی که فاکتورهای آزمایشی (لاین و مایه زنی و برهم کنش آنها) بر فراوانی آنها اثر معنی داری داشتند تعبیه گردید (جدول ۲). این تجزیه نشان داد که از بین ۵۲ متابولیت، ۲۶ متابولیت بین لاین‌ها، چالش شده با بیمارگر، آب مقطر و یا تالک و برهم کنش آنها تغییرات معنی دار آماری نشان دادند.

این متابولیت‌ها برای تجزیه چند متغیره کل متابولوم درگیر در دفاع گیاه یا بیماریزایی استفاده شدند. در صورتی که $P \leq 0.01$ بود به عنوان متابولیت خیلی معنی دار (highly significant)، $0.01 < P \leq 0.05$ (borderline significant) و $0.05 < P \leq 0.2$ (significant) معنی دار (borderline significant) در نظر گرفته شد. تفاوت مقدار ۲۳ متابولیت بین لاین‌ها، ۱۵ متابولیت بین تیمارها و فراوانی ۱۴ متابولیت بین برهمکنش لاین‌ها و تیمارها

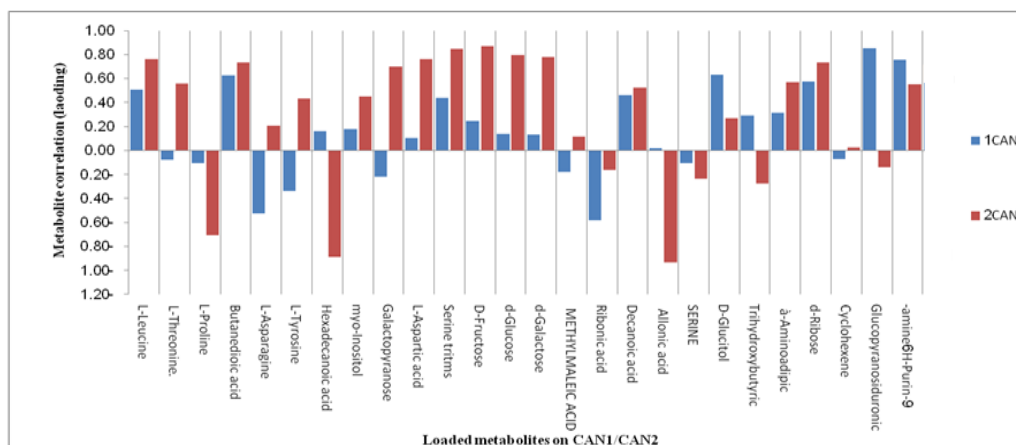
جدول ۲. نتایج حاصل از تجزیه واریانس روی فراوانی ۵۲ متابولیت شناسایی شده مشترک از بخش قطبی لاین‌های حساس (Thatcher Lr22b) و مقاوم (Thatcher Lr25) در مرحله گیاهچه‌ای به *Puccinia triticina* مایه‌زنی شده با آب، پودر تالک و بیمارگر با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS.

Table 2. Results of ANOVA on abundance of 52 common metabolites from polar fraction of susceptible in seedling stage (Thatcher Lr22b) and resistance (Thatcher Lr25) near isogenic lines inoculated with sterilized distilled water, talc powder and pathogen using GLM procedure of SAS.

N	Name	NILs	Treat	NILs*Treat	SW	ST	SP	RW	RT	RP	PR	RR	CRR/IRR
7	L-Leucine	**			0.42	0.58	0.60	0.74	0.64	0.79	PR	RR	CRR/IRR
10	L-Threonine			**	0.68	0.93	1.06	0.89	0.99	1.08	PR	RR	IRR
11	L-Proline	**			1.03	0.93	1.13	1.56	1.24	1.77	PR	RR	
14	Butanedioic acid(Succinic acid)	*			3.30	3.48	4.23	4.8	4.62	5.05	PR	RR	CRR/IRR
15	L-Asparagine	**	*	†	0.26	0.44	0.59	0.24	0.39	0.61	PR		IRR
18	L-Tyrosine			†	0.69	0.76	0.81	0.80	0.87	0.97	PR	RR	IRR
19	Hexadecanoic acid	†	†	†	1.69	0.73	1.17	0.92	0.79	0.77			
21	Myo-Inositol	†		**	0.61	0.95	1.36	1.01	1.26	1.60	PR	RR	CRR/IRR
24	Galactopyranose	†	†	†	0.34	0.54	0.36	0.22	0.35	0.52			
26	L-Aspartic acid	*		†	2.44	3.81	4.28	3.63	4.42	5.94	PR	RR	CRR/IRR
26	Serine tritms	*	*	*	0.68	0.86	0.95	1.00	1.39	1.73	PR	RR	
28	D-Fructose	*	*	**	1.14	1.30	1.46	1.55	1.64	2.44	PR	RR	CRR/IRR
29	D-Glucose	**			4.80	5.18	4.48	5.24	6.18	6.44		RR	CRR
30	D-Galactose	*			1.00	1.01	1.07	1.11	1.26	1.46	PR	RR	CRR/IRR
37	Methylmaleic acid	*	*	**	0.21	0.24	0.26	0.22	0.21	0.23	PR		IRR
38	Ribonic acid	**			0.29	0.41	0.37	0.23	0.23	0.29			
40	Decanoic acid	**		†	0.12	0.10	0.14	0.18	0.15	0.19	PR	RR	CRR/IRR
41	Allonic acid	*	†		0.60	0.33	0.35	0.29	0.23	0.28	PR		
44	Serine	*	†		0.21	0.22	0.25	0.11	0.13	0.22	PR		IRR
45	D-Glucitol		†		0.20	0.23	0.31	0.28	0.18	0.35	PR		IRR
47	Trihydroxybutyric acid		†		0.31	0.26	0.38	0.30	0.28	0.29	PR		
48	à-Aminoadipic acid	†	†	†	0.07	0.09	0.12	0.09	0.10	0.13	PR	RR	CRR/IRR
49	D-Ribose	*	†		0.59	0.58	0.67	0.65	0.74	0.87	PR	RR	CRR/IRR
50	Cyclohexene	*	†		0.41	0.44	0.61	0.57	0.85	0.38			
51	Glucopyranosiduronic acid	†	*	†	0.43	0.32	0.46	0.44	0.34	0.51	PR	RR	CRR
52	9H-Purin-6-amine	*	*	*	0.10	0.10	0.14	0.10	0.20	0.30	PR	RR	CRR/IRR

N-شماره متابولیت‌ها در جدول ۱، NILs=لاین، Treat= تیمار مایه زنی (بیمارگر، آب مقطر و پودر تالک)، NILs*Treat=برهمکنش لاین و تیمار، علامت‌های * برای $P \leq 0.01$ (highly significant)، ** برای $0.01 < P \leq 0.05$ (significant)، † برای $0.05 < P \leq 0.2$ (borderline significant). میانگین فراوانی برای متابولیت‌ها در حالت SW= لاین مایه زنی شده با آب، ST= لاین حساس مایه زنی شده با پودر تالک، SP= لاین حساس مایه زنی شده با بیمارگر، RW= لاین مقاوم مایه‌زنی شده با آب، RT= لاین مقاوم مایه‌زنی شده با پودر تالک، RP= لاین مقاوم مایه‌زنی شده با بیمارگر. RR=مخفف RR-metabolite متابولیت مرتبط با مقاومت، PR=مخفف PR-metabolite متابولیت مرتبط با بیماری‌زایی CRR-metabolite-مخفف متابولیت مرتبط با مقاومت ساختاری، IRR-metabolite مخفف متابولیت مرتبط با مقاومت القایی.

N-numb of metabolites in table1, NILs= near isogenic lines, Treat= inoculation (pathogen, sterilized distilled water and talc powder), NILs*Treat= interaction NILs and Treat, * for $P \leq 0.01$ (highly significant), ** for $0.01 < P \leq 0.05$ (significant), † for $0.05 < P \leq 0.2$ (borderline significant). SW=average of abundance in susceptible NILs inoculated with water, ST= average of abundance in susceptible NILs inoculated with talc powder, SP= average of abundance in susceptible NILs inoculated with pathogen, RW= average of abundance in resistant NILs inoculated with water, RT= average of abundance in resistant NILs inoculated with talc powder, RP= average of abundance in resistant NILs inoculated with pathogen, RR=Resistance related metabolites, PR= Pathogenesis related metabolite IRR= Induced Resistance Related metabolite, CRR= Constitutive Resistance Related metabolite



شکل ۱. بار (load) ۲۶ متابولیت‌های معنی‌دار حاصل از تجزیه واریانس (رد شده از فیلتر ANOVA) ۵۲ متابولیت شناسایی شده از بخش قطبی لاین‌های حساس در مرحله گیاهچه‌ای (*Thatcher Lr22b*) و مقاوم (*Thatcher Lr25*) ۲۴ ساعت پس مایه‌زنی با آب، پودر تالک و بیماری‌گر (*Puccinia triticina*) برای CAN1 و CAN2، رنگ قرمز برای CAN1 و رنگ آبی برای CAN2.

Fig 1. CAN loading of 26 significant metabolites based on ANOVA filter on abundance of 52 common metabolites from polar fraction of susceptible lines in seedling stage (*Thatcher Lr22b*) and resistance (*Thatcher Lr25*) inoculated with sterilized distilled water, talcum powder and pathogen (*Puccinia triticina*).

دندروگرام با گروه بندی مشاهدات از نظر تشابهات و تفاوت‌های متابولیکی (در فضای متابولیکی متابولوم بررسی شده) تصویر و درک بهتری از ارتباط متابولیکی بین تیمارها فراهم می‌کند.

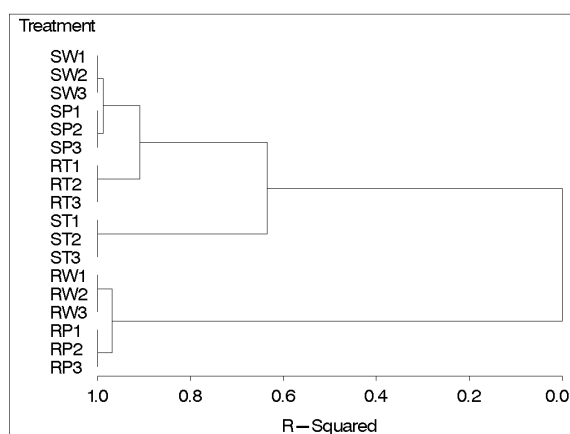
برای شناسایی سهم هر متابولیت (براساس بار آن متابولیت روی محور کانونی) نسبت به تیمارها و روابط میان تیمارها با روش تجزیه ممیزی کانونی، نمره کانونی (CAN-scores) هر نمونه حساب شد. نمره کانونی موقعیت مکانی تیمارها را نسبت به یکدیگر نشان می‌دهد. CAN-loading بار هر متابولیت بر روی نمره کانونی هر مشاهده برای تیمارها را نشان می‌دهد که مقدار آن بین ۱ تا -۱ است ($-1 \leq \text{CAN-loading} \leq 1$). هرچه مقدار بار یک متابولیت به یک نزدیک‌تر باشد به معنی آن است که این متابولیت نقش مهم‌تری در نمره کانونی حاصله برای یک نمونه مشخص (مشاهده) دارد (شکل ۱).

به دلیل استفاده از تجزیه ممیزی کانونی الگوی نزدیکی

Thatcher Lr22b مایه‌زنی شده با بیماری‌گر (SP) نسبت به لاین‌های *Thatcher Lr22b* مایه‌زنی شده با تالک (ST) داشتند ($SP > ST$ و $RP > RT$) به عنوان متابولیت‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis-related metabolites=PR) در نظر گرفته شدند. در این پژوهش ۲۱ متابولیت PR شناسایی شد. این متابولیت‌ها مربوط به پنج گروه شیمیایی مختلف: اسید آمینه، اسید آلی، اسید چرب، قندها و آمین بودند در مجموع ۱۵ متابولیت بین متابولیت‌های PR و RR مشترک بودند (جدول ۲).

نتایج حاصل از تجزیه ممیزی استاندارد و تجزیه خوشه‌ای سلسه مراتب متابولیت‌های شناسایی شده در پاتوسیستم گندم-*Puccinia triticina*

فراوانی ۲۶ متابولیت معنی‌دار بین لاین‌ها، مایه‌زنی شده‌ها و برهمکنش لاین‌ها و مایه‌زنی شده تحت تجزیه ممیزی کانونی (CDA) و تجزیه خوشه‌ای سلسه مراتب (HCA) قرار گرفتند (Johnson 1998). CDA Plot و

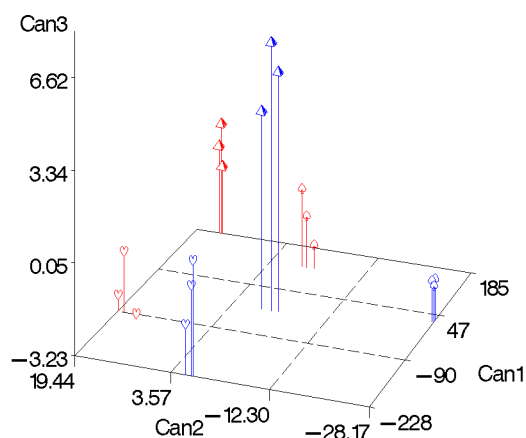


شکل ۳. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از CAN2 و CAN1 (شکل ۱) تجزیه ممیزی از فراوانی ۲۶ متابولیت معنی‌دار شناسایی شده در لاین‌های حساس (Thatcher *Lr22b=S* و مقاوم (Thatcher *Lr25=R*) ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با آب (W)، پودر تالک (T) و بیماری‌گر (P). ۱، ۲ و ۳ تکرارها برای هر تیمار را نشان می‌دهد.

Figure 3. Dendrogram based on hierarchical cluster analysis using the first two canonical variables (see Fig 1) from the canonical discriminant analysis of abundance of 26 metabolites 24 h after inoculation with sterilized distilled water (W), talcum powder (T), pathogen (P), in three replications (1, 2 and 3).

عملکردهای مرتبط با هر بردار کانونی (CAN-vector) از پراکنش نگار (Scatter Plot) استفاده شد. براساس CDA ۲۶ متابولیت، دو بردار کانونی اول بیش از ۹۹ درصد از تغییرات بین تیمارها را توضیح می‌دهد و لذا تصویر گروه بندی مشاهدات تیمارها در نمودار دو بعدی محورهای کانونی اول و دوم تصویر تقریباً کاملی از ارتباط متابولیکی تیمارها (از نظر تشابه متابولوم دخیل در دفاع گیاه در برابر بیماری‌گر) را نشان می‌دهد (شکل ۲). CAN-loading برای ۲۶ متابولیت برای دو CAN اول در شکل ۱ نشان داده شده است.

اگر در یک بردار کانونی، لاین‌های گندم مقاوم Thatcher *Lr25* (مایه‌زنی شده با آب، تالک و بیماری‌گر)



شکل ۲. پراکنش نگار سه بعدی حاصل از تجزیه ممیزی استاندارد براساس ۲۶ متابولیت معنی‌دار بدست آمده از تجزیه واریانس، ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی در لاین‌های حساس در مرحله گیاهچه‌ای (Thatcher *Lr22b*) و مقاوم (Thatcher *Lr25*) مایه‌زنی شده با آب، پودر تالک و بیماری‌گر (*Puccinia triticina*). CAN1 Vector نشان دهنده مقاومت ساختاری و CAN2 Vector بیانگر مقاومت القایی می‌باشد.

Fig 2. Scatter plot based on projections first three significant CAN-vectors of canonical discriminant analysis (CDA) of abundance of 26 metabolites 24 h after inoculation susceptible lines in seedling stage (Thatcher *Lr22b*) and resistance (Thatcher *Lr25*) NILs with sterilized distilled water, talcum powder and pathogen (*Puccinia triticina*). CAN1 Vector and CAN2 Vector represent constitutive resistance and induced resistance, respectively.

رنگ قرمز و آبی به ترتیب بیانگر مقاومت و حساسیت می‌باشد. علامت Δ برای مایه‌زنی شده با آب، علامت ♥ مایه‌زنی شده با پودر تالک و علامت ♠ مایه‌زنی شده با بیماری‌گر به کار رفته است.

Red and blue represent susceptible and resistant. Δ for inoculation with sterilized distilled water, ♥ for inoculation with talc powder and ♠ for inoculation with pathogen.

نمونه‌ها در فضای سه بعدی (شکل ۲) نشان داده شده است. هر بعد ترکیبی خطی از ۲۶ متابولیت است. برای پی بردن به الگوی طبقه‌بندی تیمارها مربوط به مقاومت نسبی لاین‌ها به بیماری زنگ قهوه‌ای گندم، جهت تشخیص

à-Amino adipic, Galactopyranose, D-Ribose, acid, Decanoic acid, 9H-Purin-6-amine, L-Threonine, L-Tyrosine, Myo-Inositol, D-Glucitol, Methylnmaleic acid, Asparagine و Cyclohexene می‌باشد. که از این تعداد ۱۶ متابولیت با تجزیه واریانس به عنوان متابولیت‌های PR شناخته شده بودند (جدول ۲). در نتیجه نمره کانونی مثبت بالاتر برای CAN2 مقاومت القایی بیش‌تری را برای لاین‌های Thatcher Lr25 نشان می‌دهد که متابولیت‌های PR یا مرتبط با بیماری‌زایی شناسایی شده براساس تجزیه واریانس، ترکیبات اصلی برای مقاومت القایی برای Thatcher Lr25 می‌باشند (جدول ۲).

دندروگرام HCA تولید شده با استفاده از نمرات کانونی الگوی خوشه‌بندی همه تکرارها درون یک تیمار را نشان می‌دهد. دندروگرام گروه بندی افراد تیمارهای مختلف یک رقم را نشان می‌دهد که شبیه نتایج پراکنش نگار است. در این دندروگرام تکرارهای ارقام مقاوم و حساس اعم از شاهد مثبت و منفی و مایه زنی شده با بیمارگر در دو گروه یا خوشه اصلی قرار گرفتند. درون خوشه‌های مقاوم و حساس نیز گیاهان شاهد و مایه زنی شده با بیمارگر در زیرخوشه‌های مجزا قرار گرفتند. تنها استثناء قرار گرفتن افراد مقاوم مایه زنی شده با پودر تالک (شاهد مثبت) در شاخه افراد حساس بود. قرار گرفتن افراد یک گروه در یک خوشه نشانگر نزدیکی و شباهت زیاد متابولوم این افراد یه یکدیگر و دور بودن افراد یک خوشه از افراد یک خوشه (گروه) دیگر نشانگر تغییرات متابولیکی ناشی از تغییراتی است که یک گروه با گروه(های) دیگر دارد.

نتایج تجزیه مسیر براساس متابولیت‌های شناسایی شده

در پاتوسیستم گندم - *Puccinia triticina*

نتایج تجزیه مسیرها براساس متابولیت‌های معنی‌دار با نرم‌افزار متابوآنالیز (MetPA) منجر به شناسایی ۳۷

نمره کانونی بالاتری نسبت به لاین‌های حساس Thatcher Lr22b (مایه‌زنی شده با آب، تالک و بیمارگر) داشته باشد، این بردار کانونی مقاومت ساختاری (Constitutive resistance) را اندازه‌گیری می‌کند. بردار کانونی اول یا بردار CAN1 در شکل ۲ بیانگر مقاومت ساختاری است. اگر در یک بردار کانونی لاین‌های مقاوم Thatcher Lr25 مایه‌زنی شده با بیمارگر نمره کانونی بالاتری نسبت به لاین‌های مقاوم Thatcher Lr25 مایه‌زنی شده با آب و همچنین لاین‌های حساس Thatcher Lr22b مایه‌زنی شده با بیمارگر نمره کانونی بالاتری نسبت به لاین‌های Thatcher Lr22b مایه‌زنی شده با آب باشد، این بردار کانونی مقاومت القایی (Induced resistance) را اندازه‌گیری می‌کند. بردار CAN2 در شکل ۲ بیانگر مقاومت القایی است.

۱۸ متابولیت روی محور کانونی اول (CAN1) بار مثبت داشتند (شکل ۱). این متابولیت‌ها به ترتیب از بالاترین بار شامل Purin, Glucopyranosiduronic acid, Silane, L-Butanedioic acid, D-Ribose, D-Glucitol, Leucine, à-Amino adipic, Serine, Decanoic acid, Myo-Inositol, D-Fructose, Trihydroxybutyric acid, D-Galactose, D-Glucose, Hexadecanoic acid و Aspartic acid می‌باشد. از این تعداد ۱۲ متابولیت با تجزیه واریانس به عنوان متابولیت‌های RR شناخته شده بودند (جدول ۲). در نتیجه نمره کانونی مثبت بالاتر برای محور کانونی اول یا CAN1 داشتند که مقاومت ساختاری را اندازه‌گیری می‌گیرد. براساس تجزیه واریانس، این ۱۲ متابولیت شناسایی شده، متابولیت‌های مرتبط با مقاومت ساختاری (CRR-metabolites) هستند (جدول ۲).

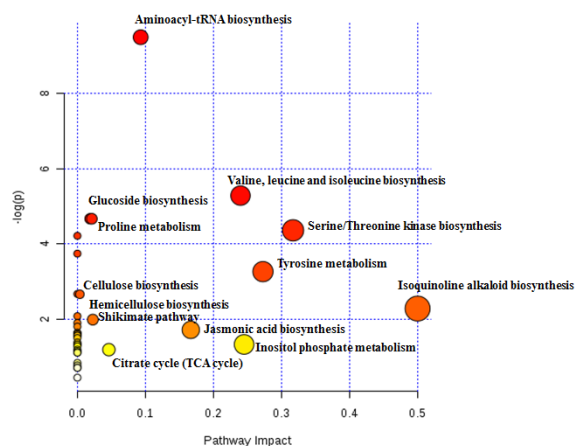
۱۹ متابولیت نسبت به محور کانونی دوم یا CAN2 بار مثبت داشتند (جدول ۱). این متابولیت‌ها به ترتیب از بالاترین بار شامل D-Glucose, Serine, D-Fructose, D-Butanedioic acid, L-Aspartic acid, L-Leucine, Galactose

جدول ۳. نتایج آنالیز مسیر با متابوآنالیز R در پاتوسیستم گندم-*Puccinia triticina* (total تعداد کل ترکیبات در مسیر، hit تعداد واقعی تطبیق یافته داده‌های وارد شده، FDR مقدار p که با استفاده از نرخ کاستی اشتباه تنظیم شده است، Impact اثر ارزش مسیر محاسبه شده از آنالیز توپولوژی مسیر است)

Table 3. The result from pathway analysis in wheat-*Puccinia triticina* pathosystem with MetaboAnalystR (Total is the total number of compounds in the pathway, the Hits is the actually matched number from the user uploaded data, FDR is the p value adjusted using False Discovery Rate; Impact is the pathway impact value calculated from pathway topology analysis)

شماره Number	نام مسیر Pathway Name	Hit/Total	FRD	اثر مسیر Impact
1	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	7/67	0.01	0.09
2	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	3/21	0.19	0.24
3	Glucoside biosynthesis	3/26	0.19	0.02
4	Hemicellulose biosynthesis	3/26	0.19	0.02
5	Serine/Threonine kinase biosynthesis	3/29	0.20	0.32
6	Cyanoamino acid metabolism	2/11	0.20	0.00
7	Ascorbate and aldarate metabolism	2/14	0.28	0.00
8	Tyrosine metabolism	2/18	0.39	0.27
9	C5-Branched dibasic acid metabolism	1/4	0.57	0.00
10	Starch and sucrose metabolism	2/25	0.57	0.00
11	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	1/6	0.76	0.50
12	Cysteine and methionine metabolism	2/35	0.82	0.00
13	Arginine and proline metabolism	2/37	0.82	0.02
14	Lysine biosynthesis	1/9	0.82	0.00
15	Nicotinate and nicotinamide metabolism	1/10	0.82	0.00
16	Jasmonic acid biosynthesis	1/11	0.82	0.17
17	beta-Alanine metabolism	1/12	0.82	0.00
18	Sulfur metabolism	1/12	0.82	0.00
19	Fatty acid biosynthesis	2/47	0.82	0.00
20	Fatty acid elongation in mitochondria	1/13	0.82	0.00
21	Sphingolipid metabolism	1/13	0.82	0.00
22	Propanoate metabolism	1/14	0.83	0.00
23	Zeatin biosynthesis	1/16	0.84	0.00
24	Pentose phosphate pathway	1/17	0.84	0.00
25	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	1/17	0.84	0.00
26	Inositol phosphate metabolism	1/17	0.84	0.25
27	Fructose and mannose metabolism	1/18	0.84	0.00
28	Butanoate metabolism	1/20	0.84	0.00
29	Citrate cycle (TCA cycle)	1/20	0.84	0.05
30	Carbon fixation in photosynthetic organisms	1/21	0.84	0.00
31	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	1/22	0.84	0.00
32	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	1/22	0.84	0.00
33	Phenylpropanoid biosynthesis	1/31	1.00	0.00
34	Valine, leucine and isoleucine degradation	1/34	1.00	0.00
35	Fatty acid metabolism	1/37	1.00	0.00
36	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1/37	1.00	0.00
37	Purine metabolism	1/55	1.00	0.00

مسیر در برهمکنش گندم-*P. triticina* گردید (جدول ۳). است که این نرم‌افزار شامل ۱۵ کتابخانه و در کل ۱۱۳۷ مسیر از موجودات مختلف از جمله *Oryza sativa* دفاع گیاه مورد بحث قرار می‌گیرند (شکل ۴). لازم به ذکر Japonica (Japanese rice) و *Arabidopsis thaliana*



شکل ۴. خلاصه‌ای از آنالیز مسیر متابولومیکسی با نرم‌افزار متابوآنالیست R در پاتوسیستم گندم-*Puccinia triticina*. تمام مسیرهای تطبیق یافته توسط دایره نشان داده شده است. رنگ هر دایره براساس P-value است (رنگ‌های تیره‌تر نشان دهنده تغییرات معنی‌دار بیش‌تر در مسیرهای متناظر است). در حالی که اندازه هر دایره مربوط به میزان اثر مسیر است. مهم‌ترین مسیرها زیر نویسی شده است.

Figure 4. Summary of Metabolomic Pathway Analysis (MetPA) in wheat-*Puccinia triticina* Pathosystem with MetaboAnalystR software package. All the matched pathways are displayed as circles. The color of each circle is based on p-values (darker colors indicate more significant changes of metabolites in the corresponding pathway), whereas the size of the circle corresponds to the pathway impact score. The most impacted pathways are annotated.

جمله بیمارگرها می‌شود. متابولیت‌ها محصولات نهایی بیان ژن‌ها هستند و تمام تغییرات در بیان ژن‌ها در پروفیل متابولیتی نمایان می‌شود. از سوی دیگر اصلاح‌کنندگان گندم به دنبال ابزارهای سریع، آسان و دقیق برای غربالگری مقاومت نسبت به بیماری‌ها می‌باشند (Hamzehzarghani et al. 2005). علاوه بر این، دانستن مکانیسم مقاومت در سطح متابولوم، درک بهتری از عملکرد ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها به اصلاح‌کنندگان داده و آنان را در هر می کردن ژن‌های مقاوم و مسیرهای

جدول ۴. ارتباط مسیرهای شناسایی شده با متابوآنالیست R در پاتوسیستم گندم-*Puccinia triticina* با متابولیت‌های تغییر کرده در جدول ۱: کاهش تولید، ↓: افزایش تولید

Table 4. The interrelated of pathways detected in wheat-*Puccinia triticina* pathosystem with MetaboAnalystR that have changed with metabolites in Table 1 ↓: Reduced production, ↑: Increased production

نام مسیر Pathway Name	تغییرات ایجاد شده Accrued Changes
Proline biosynthesis	(↑)L-proline
Tyrosine metabolism	(↑)L-Tyrosine (↑)Succinic acid
Serine/Threonine kinase biosynthesis	(↑)L-Serine (↑)L-Threonine
Tyrosine metabolism	(↑)L-Tyrosine (↑)Succinic acid
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	(↑)L-Threonine (↑)Citraconic acid (↑)L-Leucine
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	(↑)L-Proline (↑)L-Asparagine (↑)L-Tyrosine (↑)L-Threonine (↑)L-Aspartic acid (↑)L-Serine
Cellulose biosynthesis	(↑)D-Glucose
Shikimate pathway	
Inositol phosphate metabolism	(↑)Myo-Inositol
Hemicellulose biosynthesis	(↑)Myo-Inositol (↑)D-Glucose (↑)D-Galactose
Citric acid cycle(TAC)	(↑)Succinic acid
Glucoside biosynthesis	(↑)alpha.-D-Glucopyranoside
Jasmonic acid biosynthesis	(↓)Hexadecanoic acid

(thale cress) می‌باشد. در اینجا مقایسات مسیر با کتابخانه *O. sativa* انجام شد (Mahdavi et al. 2016; Chong et al. 2018).

بحث

بررسی پروفیل متابولیتی موجب درک کامل‌تری از مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی از

در حالت القا شده یا دفاع، به دلیل تقاضای بیشتر سلول برای سنتز پروتئین‌های غنی از پرولین و گلیسین می‌تواند یکی دلایل افزایش آن علاوه بر موارد ذکر شده در ابتدا باشد (Mitchell et al. 2006). این اسید آمینه به عنوان متابولیت RR و PR شناسایی شد.

اسید آمینه تیروزین (L-Tyrosine) پیش ماده بسیاری از متابولیت‌های ثانویه است. اکثر گروه‌های فنولی در گیاهان از فنیل‌آلانین و یا تیروزین مشتق می‌شوند. در اکثر گونه‌های گیاهی مرحله کلیدی ساخت این مواد تبدیل فنیل-آلانین به سینامیک اسید است که از طریق حذف یک مولکول آمونیاک می‌باشد. این واکنش به وسیله فنیل‌آلانین-آمونیاک (PAL) که یکی از آنزیم‌های مهم تنظیم مسیر سنتز فنولیک‌هاست، کاتالیز می‌شود. این طور به نظر می‌رسد که در تعداد کمی از گیاهان به ویژه گندمیان، واکنش کلیدی تشکیل ترکیبات فنولی تبدیل تیروزین به اسید هیدروکسی سینامیک است. افزایش تیروزین در ارقام مقاوم نسبت به حساس گندم در برابر سیاهک هندی بعد از مایه‌زنی با *Neovossia indica* گزارش شده است، و بیان شده است که این ترکیب فنولی ممکن است در تسریع روند لیگنینی شدن در ژنوتیپ‌های مقاوم گندم نسبت به گیاه حساس نقش داشته باشد. (Gogoi et al. 2001). در این پژوهش برهم‌کنش لاین‌ها و تیمارها بر فراوانی این اسید آمینه اثر گذاشته است. فراوانی این اسید آمینه در لاین‌های مقاوم نسبت به حساس مایه‌زنی شده با پودر تالک بالاتر بود. پس از حمله بیمارگر مقدارش در لاین‌های مقاوم و حساس افزایش یافته است. بالاتر بودن این اسید آمینه در لاین‌های مقاوم نسبت به حساس مایه‌زنی شده با پودر تالک و همچنین افزایش بیشتر این اسید آمینه در لاین‌های مقاوم نسبت به حساس به نوعی پاسخ دفاعی محسوب می‌شود. این اسید آمینه آروماتیک به عنوان پیش-

دفاعی مناسب در یک رقم الیت کمک می‌کند (Beckles & Roessner 2012). در این پژوهش، لاین مقاوم به زنگ قهوه‌ای براساس دو معیار (تجزیه واریانس و تجزیه ممیزی کانونی) متمایز شد:

۱. متابولیت‌های مشترک در بین لاین حساس و مقاوم اما با فراوانی معنی‌دار بالاتر در یکی از لاین‌ها که خود این‌ها به دو گروه متابولیت‌های مرتبط با بیماریزایی (PR-metabolites) و متابولیت‌های مرتبط با مقاومت (RR-metabolites) تقسیم شدند (جدول ۲).

۲. متابولیت‌های با بار معنی‌دار (CAN loading) برای نمره کانونی تیمارها در دو محور کانونی اول که ۹۹ درصد تغییرات در متابولوم را توضیح می‌دادند. متابولیت‌های RR بر اساس بارشان روی CAN1 و CAN2 به ترتیب به متابولیت‌های مرتبط با مقاومت ساختاری (CRR-metabolites) و متابولیت‌های مرتبط با مقاومت القایی (IRR-metabolites) تقسیم بندی شدند (جدول ۲).

در ادامه بیومارکرهای متابولیتی بالقوه مقاومت شناسایی شده و نقش‌شان در مسیرهای متابولیکی دفاعی به بیماری مورد بررسی قرار گرفت.

اسید آمینه پرولین (L-Proline) در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی به عنوان یک سیگنال مولکولی عمل می‌کند و موجب تنظیم ذخیره متابولیت‌ها، تعادل ردوکس و کنترل بیان تعدادی از ژن‌ها می‌شود. روی مسیرهای دفاعی گیاه اثر می‌گذارد و رشد و توسعه گیاهان را بهبود می‌بخشد (Szabados & Savoure 2009). در این مطالعه سطح بالاتر پرولین در رقم مقاوم نسبت به حساس چه در حالت مایه‌زنی با پودر تالک (شاهد) و یا پس از تیمار با بیمارگر مشاهده شد. یک گروه از ژن‌های مرتبط با پاسخ دفاعی در گندم کد کننده‌ی پروتئین‌های غنی از پرولین و گلیسین می‌باشند. (Li et al. 1999). سطح بالاتر مخصوصاً

یک افکتور بیمارگر توسط یک گیرنده کد شده توسط ژن مقاومت است. افزایش بیان ژن‌های کد کننده چندین گروه از آنزیم‌های serine/threonine kinase در Thatcher *Lr34*، ۳ روز پس از مایه‌زنی با نژاد یک *P. triticina* به عنوان یکی از پاسخ‌های مقاومتی گزارش شده است. این پروتئین‌ها در پیام‌رسانی سلول نقش دارند (Bolton *et al.* 2008b). از آنجایی که در این پژوهش هم لاین‌های مقاوم دارای مقاومت نژاد اختصاصی به بیمارگر بودند، طبق مدل ژن برای ژن احتمالاً Serine/threonine kinase تولید شده از میزان الیستورهای بیمارگر را سریع‌تر شناسایی و منجر به القا پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شوند.

اسید آمینه‌های لوسین (L-leucine)، ایزولوسین و والین اسید آمینه‌های ضروری و از یک خانواده هستند. لوسین و والین از پیرووات مشتق می‌شوند اما ایزولوسین از ترئونین مشتق می‌شود در طی مطالعه‌ای ژن‌های مقاومت نژاد اختصاصی به زنگ برگ گندم *Lr10*، *Lr1* و *Lr21* همسانه سازی شدند و نشان داده شد که ویژگی این ژن‌های مقاومت داشتن نواحی کد کننده غنی از لوسین است (Cloutier *et al.* 2007). همچنین افزایش بیان ژن‌های کد کننده گلیکوپروتئین خارج سلولی شامل تکرارهای غنی از لوسین در Thatcher *Lr34*، ۳ روز پس از مایه‌زنی شده با نژاد یک *P. triticina* به عنوان یکی از پاسخ‌های مقاومتی گزارش شده است. در این پژوهش افزایش لوسین پس از حمله بیمارگر می‌تواند به دلیل افزایش بیان ژن‌های مقاومت کد کننده پروتئین‌های غنی از لوسین می‌باشد. پروتئین‌هایی که دارای تکرارهای غنی از لوسین می‌باشند، عملکردهای متفاوتی دارند و می‌توانند در برهم‌کنش پروتئین- پروتئین، انتقال پیام‌ها، رونوشت‌برداری، پردازش آران‌ای، مقاومت به بیماری‌ها و پاسخ ایمنی شرکت می‌کنند (Bolton *et al.* 2008b). این اسید آمینه به عنوان

ماده در سنتز ترکیبات ثانویه شامل آلکالوئیدها، ترکیبات فنولی و لیگنین مصرف می‌شود (Donnez *et al.* 2009). افزایش بیشتر در لاین‌های مقاوم پس از مایه‌زنی با بیمارگر احتمالاً به دلیل پاسخ دفاعی سریع‌تر در مسیرهای ذکر شده می‌باشد. این اسید آمینه به عنوان متابولیت RR و PR شناسایی شد.

در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها اسید آمینه آسپاراژین (L-Asparagine) از بیوسنتز اسید آسپاراتیک (L-Aspartic acid) با آمینی شدن L-glutamine به عنوان یک گروه آمینی ایجاد می‌شود (Lea *et al.* 2006). افزایش آسپاراژین در گیاهان آلوده به بیمارهای مختلف گزارش شده است و افزایش تجمع آن پس از تیمارهای مختلف بیانگر پاسخ دفاعی به عامل خارجی می‌باشد (Hamzehzarghani *et al.* 2007, Lea *et al.* 2006, Pe'rez-García *et al.* 1993, Scarpai *et al.* 2005). در این پژوهش مقدار آسپاراژین و اسید آسپاراتیک به دنبال مایه‌زنی با بیمارگر در لاین‌های حساس و مقاوم نسبت به لاین‌های شاهد افزایش یافته است و میزان این افزایش در لاین مقاوم نسبت به حساس پس از مایه‌زنی با پودر تالک و بیمارگر بیشتر بود که می‌تواند در ایجاد پاسخ دفاعی سریع‌تر در لاین مقاوم نقش داشته باشد. آسپاراژین به عنوان یک متابولیت PR و اسید آسپاراتیک به عنوان متابولیت RR و PR شناسایی شد. لاین‌ها، تیمارها و برهم‌کنش لاین‌ها و تیمارها بر فراوانی این دو متابولیت اثر گذاشته است.

ترئونین (L-Threonine) در گیاهان از اسید آمینه آسپاراتیک ساخته می‌شود و در تولید ایزولوسین دخیل است. احتمالاً دلیل افزایش اسید آسپاراتیک پس از حمله بیمارگر در لاین مقاوم، فعال شدن مسیر تولید ترئونین باشد و همچنین افزایش ترئونین سبب فعال شدن مسیر تولید ایزولوسین است. مدل ژن برای ژن بیانگر شناسایی

متابولیت RR و PR شناسایی شد.

à-Amino adipic acid یک اسید آمینه غیر پروتئینی است. در این پژوهش مقدار اسید آمینه به دنبال مایه‌زنی با بیمارگر در لاین‌های حساس و مقاوم نسبت به لاین‌های شاهد افزایش یافته است و میزان این افزایش در لاین مقاوم نسبت به حساس پس از مایه‌زنی با پودر تالک و بیمارگر بیشتر بود. گزارش شده که این اسید آمینه دارای فعالیت *gliotoxic* است که احتمالاً در گیاهان مقاوم نسبت به بیمارگرها در پاسخ‌های فوق حساسیت گیاهان نقش داشته باشد (Roazan et al. 2001, Zhu et al. 2000). این اسید آمینه به عنوان متابولیت RR و PR شناسایی شد.

à-D-Glucopyranosiduronic acid یک ساپونین از نوع گلیکوزید تری‌ترپنوئید است. در مطالعه حاضر به دنبال مایه‌زنی با بیمارگر در لاین‌های حساس و مقاوم نسبت به لاین‌های شاهد این ساپونین افزایش یافته است و میزان این افزایش در لاین مقاوم نسبت به حساس پس از مایه‌زنی با پودر تالک و بیمارگر بیشتر بود. همچنین به عنوان متابولیت RR و PR شناسایی شد. تصور می‌شود که سمیت ساپونین‌ها در نتیجه توانایی آن‌ها در شکل‌گیری کمپلکس‌هایی می‌باشد که با استرول‌ها تشکیل می‌دهند. ساپونین‌ها دارای فعالیت ضد میکروبی هستند و به عنوان تعیین‌کنندگان مقاومت گیاه در برابر بیمارگرها شناخته شده‌اند (Mert-T.rk 2006, Yendo et al. 2010). ترکیب فلانوئیدی از جمله *D-Glucopyranoside* دارای اثرات حفاظت آنتی‌اکسیدانی روی آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 هستند (Jing et al. 2015).

Ribonic acid یک اسید آلی است که در گیاهان در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها دخیل است. اگرچه این اسید آلی به عنوان متابولیت RR و PR شناسایی نشد، اما فراوانی آن در لاین مقاوم پس از حمله بیمارگر نسبت به شاهد

افزایش یافته بود و در مقابل کاهش میزان این اسید در لاین حساس پس از حمله بیمارگر نسبت به شاهد مشاهده شد (Benkeblia et al. 2007).

متابولیسم کربوهیدرات‌های مرکزی مثل گلوکوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکسیتول (فرم حلقوی گلوکز)، اینوسیتول و ریبوز از مهم‌ترین منابع برای حفاظت سلول در برابر تنش‌ها هستند (Morkunas & Ratajczak 2014). در برهمکنش گیاه میکروب، قندها جهت تامین سوخت انرژی مورد نیاز برای دفاع ضروری هستند و به عنوان سیگنال‌هایی برای تنظیم ژن‌های دفاعی بکار می‌روند. نقش کلیدی بالقوه برخی قندها در مورد ایمنی گیاه منجر به مفاهیم ایمنی شیرین (Sweet Immunity) و دفاع افزایش یافته قند (sugar-enhanced defense) شده است (Moghaddam, & Van den Ende 2013). قندهای کوچک یعنی مونو، دی و الیگوساکاریدها پاسخ‌های دفاعی گیاه را فعال می‌کنند و موجب افزایش مقاومت گیاه به بیمارگر می‌شوند (Trouvelot et al. 2014). در این مطالعه فراوانی گلوکوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکسیتول (فرم حلقوی گلوکز)، اینوسیتول و ریبوز در هر دو لاین در حالت تیمار شده با بیمارگر نسبت به شاهد افزایش یافته است، و در مقاوم نسبت به حساس سطح بالاتری داشت. این افزایش نقش مهمی در مکانیسم‌های مقاومت دارد.

گلوکز پیش ماده اسید شیکمیک و مونومر سلولز و همی سلولز است. در ساخت اکثر ترکیبات فنولی گیاه مسیر اسید شیکمیک سهم دارد. مسیر اسید شیکمیک از کربوهیدرات‌های ساده شروع و به سمت تولید اسید آمینه‌های آروماتیک (فنیل آلانین و تیروزین) ادامه می‌یابد. گالاکتوز دارای عملکرد دفاعی می‌باشد و در سنتز همی سلولز دخیل است (Trouvelot et al. 2014). افزایش بیان ژن‌های کدکننده آنزیم‌های درگیر در سنتز سلولز،

منجر به افزایش متابولیت‌ها نسبت به شاهد در لاین‌های حساس و مقاوم شد اما نکته مهم در این است که در لاین مقاوم فراوانی بالاتر متابولیت چه قبل و چه بعد از تیمار با بیمار گر نسبت به لاین حساس نشان دهنده‌ی سرعت تولید بالاتر و فعالتر شدن مسیرهای درگیر می‌باشد. تیمار لاین‌ها با بیمارگر منجر به تغییر در دیواره‌ی سلولی میزبان می‌گردد. در این برهمکنش دو مسیر از مسیرهای دخیل در تقویت دیواره‌ی سلولی (Cellulose biosynthesis و Hemicellulose biosynthesis) شناسایی شد. با توجه به افزایش فراوانی متابولیت‌های درگیر در این مسیرها در لاین مقاوم نسبت به حساس، به نظر می‌رسد مسیرهای ذکر شده در لاین مقاوم سریع‌تر و بیش‌تر تقویت شده‌اند. مسیرهای Shikmic aid و Isoquinoline alkaloid biosynthesis از مسیرهای دفاعی مهم در برابر تنش‌ها تقویت شده است. مسیر Glucoside biosynthesis در جهت تولید ترکیب دفاعی Glucopyranosiduronic acid، در گیاه فعال شده است. مسیر Jasmonic acid biosynthesis به شدت سرکوب شده است که احتمالاً به دلیل افزایش بیان سنتز سالسیلیک اسید می‌باشد. در پاسخ‌های دفاعی نسبت به قارچ بیوتروف میزان سالسیلیک اسید در گیاه افزایش می‌یابد در صورتی که در برابر نکروتروف‌ها میزان جاسمونیک اسید در گیاه افزایش می‌یابد. از سوی دیگر سالسیلیک اسید و جاسمونیک اسید با هم رابطه Cross talk داشته و با افزایش یکی دیگری کاهش می‌یابد (Farmer et al. 1988). همچنین فراوانی قندهای گلوکوز، گالاکتوز، فروکتوز، ریبوز و میواینوسیتول در هر دو لاین پس از تیمار با بیمارگر نسبت به شاهد، افزایش یافته است که این موضوع نقش حیاتی این کربوهیدرات‌ها را در دفاع گیاه نسبت به آلودگی *P. triticina* پیشنهاد می‌کند. فعال‌تر شدن چرخه تری کربوکسیلیک اسید (Citric

Cellulose synthase- و Cellulose synthase-like A1 like protein OsCsIE1، در Thatcher Lr34، ۳ روز پس از مایه‌زنی با نژاد یک *P. triticina* به عنوان یکی از پاسخ‌های مقاومتی گزارش شده است (Bolton et al. 2008b). اینوسیتول (inositol) و مشتقات بیوشیمیایی آن به طور گسترده در بافت‌های پستانداران، گیاهان آلی، قارچ‌ها و برخی باکتری‌ها وجود دارد که در بسیاری از جنبه‌های تنظیم سلولی از جمله ساختار غشایی، انتقال پیام و تنظیم اسمزی مهم هستند (Arner et al. 2001). میواینوسیتول (Myo-inositol) به پکتین، همی سلولز، زایلوز و قندهای اسیدی تبدیل می‌شود (Arner et al. 2001, Loewus et al. 1962). افزایش سطح میواینوسیتول در رقم مقاوم گندم و رقم حساس به بلایت فوزاریومی خوشه پس از مایه‌زنی با *F. graminearum* گزارش شده است. که افزایش سطح این قند الکلی در رقم مقاوم بسیار بیش‌تر از رقم حساس بود. میواینوسیتول در پیام‌رسانی سلول در حیوانات و گیاهان شرکت می‌کند و گیاهان با سطح بالاتری از مقاومت نسبت به بیماری‌ها افزایش بیان در اینوسیتول داشتند (Hamzehzarghani et al. 2005). در اینجا افزایش سطح میواینوسیتول در لاین مقاوم گندم و حساس به زنگ برگی پس از مایه‌زنی با *P. triticina* و افزایش بیش‌تر این قند در مقاوم نسبت به حساس مشاهده شد. یک منبع غنی از متابولیت‌های مشتق شده از اینوسیتول در لاین مقاوم گندم می‌تواند ظرفیت انتقال سیگنال‌های بیش‌تر و پاسخ سریع‌تر به حمله بیمارگر را تامین کند (Trouvelot et al. 2014). شناسایی مسیرهای درگیر در این پاتوسیستم با نرم‌افزار متابوآلیست R انجام شد. در مجموع ۱۳ (جدول ۴) مسیر از ۳۷ (جدول ۳) مسیر شناسایی شده به دلیل اهمیت بیش‌تر در مقاومت بحث می‌شود. در این تحقیق، مشخص شد که آلودگی *P. triticina* در هر دو لاین حساس و مقاوم اکثراً

که پس از حمله بیمارگر می‌تواند نشان‌دهنده یک تقاضای پرانرژی در سلول باشد (Bolton et al. 2008b).

گیاهان بیش از هزاران متابولیت تولید می‌کنند در حالی که در این پژوهش تعداد بسیار اندکی متابولیت در سیستم گندم-زنگ برگ گندم شناسایی شد. سنتز متابولیت و دفاع گیاه یک فرایند دینامیک است اما در این‌جا پروفیل متابولیتی ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر بررسی شد. از آنجایی که پاسخ‌های دفاعی گیاه در کسری از ثانیه اتفاق می‌افتد، برای حصول اطمینان از تندش اسپورها و نفوذ به گیاه و همچنین رسیدن فراوانی متابولیت‌ها به آستانه ردیابی دستگاه طیف سنج جرمی این مدت زمان انتخاب شد. تمام متابولیت‌های شناسایی شده در این مطالعه در بین تمام تیمارها مشترک بودند اما فراوانی متفاوتی داشتند.

در این پژوهش مجموعه بیمارگر و پودر تالک به عنوان مایه در نظر گرفته شد و اثرات آن بر پروفیل متابولیکی با حالت تیمار مایه‌زنی با پودر تالک مقایسه شد. در نمودار خوشه‌ای سلسه مراتب لاین‌های Thatcher Lr25 مایه‌زنی شده با پودر تالک در گروه نزدیک به لاین‌های Thatcher Lr22b قرار گرفته است. تاکنون در مورد نحوه اثر پودر تالک به تنهایی بر پروفیل متابولیکی گیاه گزارشی دیده نشده است ولی همان‌طور که در ابتدای بحث هم بیان شد، علائم ظاهری گیاهان Thatcher Lr25 مایه‌زنی شده با مایه (بیمارگر و پودر تالک) به گونه‌ای بود که این گیاهان را مقاوم به بیمارگر نشان داد بنابراین اگر هم پودر تالک با فعال کردن مسیرهایی که برای ما ناشناخته است کمی لاین‌های مقاوم را حساس‌تر کرده ولی پس از حمله بیمارگر در گیاه مقاوم مسیرهایی فعال شده‌اند که همچنان مقاومت گیاه را در برابر صدمات ناشی از بیمارگر بالا برده است.

از اهداف این پژوهش شناسایی متابولیت‌های مرتبط با

(acid cycle(TAC) و مسیر پنتوز فسفات اکسیداتیو در این پژوهش مشخص شد.

در این پژوهش سطح Succinic acid در هر دو لاین پس از تیمار با بیمارگر افزایش و در لاین‌های مقاوم مایه-زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد فراوانی بالاتری داشتند. افزایش بیان ژن‌های Citrate synthase و α -ketoglutarate dehydrogenase در چرخه تری-کربوکسیلیک اسید در Thatcher Lr34، ۳ روز پس از مایه‌زنی با نژاد یک *P. triticina* به عنوان یکی از پاسخ‌های مقاومتی گزارش شده است. آنزیم Citrate synthase موجب تبدیل اگزالواستات به سیترات و آنزیم α -ketoglutarate dehydrogenase موجب تبدیل ketoglutarate به Succinate-COA می‌شود. این افزایش بیان موجب تولید انرژی بیش‌تر از طریق چرخه تری-کربوکسیلیک اسید می‌شود (Bolton et al. 2008b).

مسیر پنتوز فسفات اکسیداتیو در گیاهان عالی در زمانی که کلروپلاست‌ها در تاریکی اند با تبدیل Glucose-6-phosphate به Fructose-6-phosphate نهایتاً تولید Ribose-5-phosphate می‌کند، که این قند برای ساخت آران‌ای و سنتز باز پورین آدنین لازم است. در این پژوهش سطح قند ریوز در هر دو لاین پس از تیمار با بیمارگر افزایش و در لاین‌های مقاوم مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد فراوانی بالاتری داشتند. افزایش معنی‌دار این قند نشان‌دهنده افزایش متابولیسم سلول در جهت تامین افزایش تقاضا برای این قند به دلیل افزایش سطح رونوشت‌برداری در لاین‌های مقاوم نسبت به لاین‌های حساس است. از طرف دیگر، در این مطالعه، آدنین که یک باز پورین است به عنوان یک متابولیت CRR و IRR شناخته شد. همچنین این باز در ساخت مولکول‌های حامل انرژی مثل ATP، ADP، NAD، و NADP شرکت می‌کند.

پروتئین‌های مرتبط با مقاومت، به عنوان پیام رسان و فعالیت‌های ضد میکروبی در طول دفاع نقش داشتند. یکی از اهداف این پژوهش بررسی نقش احتمالی متابولیت‌های مرتبط با مقاومت برای درک بهتر مکانیسم مقاومت گندم و کشف مسیرهای متابولیکی فعال در مقاومت بود که نمای کلی از این مسیرها در جدول ۳ و شکل ۴ آورده شده است.

مقاومت به عنوان بیومارکر برای غربال‌گری یا تشخیص سطوح مقاومت ارقام گندم به زنگ قهوه‌ای گندم بود که در کل ۱۲ متابولیت مربوط به مقاومت ساختاری (-CRR metabolites) و ۱۶ متابولیت مرتبط با مقاومت القایی (IRR-metabolites) شناسایی شد (جدول ۲). متابولیت‌های شناسایی شده در مسیرهای سنتز دیواره سلولی، تولید ترکیبات فنولی و آلکالوئیدی، تجمع اسید آمینه‌ها، تولید

منابع

- Abbasi M., Ershad D. and Hedjaroude G. A. 2005. Taxonomy of *Puccinia recondita* s. lat. causing brown rust on grasses. in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 245-256.
- Arner R. J., Prabhu K. S., Thompson J. T., Hildenbrandt G. R., Liken A. D. and Reddy C. C. 2001. Myo-Inositol oxygenase: molecular cloning and expression of a unique enzyme that oxidizes myo-inositol and D-chiro-inositol. Biochemical Journal 360(2): 313-320.
- Beckles D. M., Roessner U. 2012. Plant metabolomics: Applications and opportunities for agricultural biotechnology. Inc: 67-81.
- Benkeblia N., Shinano T. and Osaki M. 2007. Metabolite profiling and assessment of metabolome compartmentation of soybean leaves using non-aqueous fractionation and GC-MS analysis. Metabolomics 3: 297-305.
- Bolton M. D., Kolmer J. A. and Garvin D. F. 2008a. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. Molecular Plant Pathology 9: 563-575.
- Bolton M. D., James A. K., Xu W. W. and Garvin, D. F. 2008b. *Lr34*-Mediated Leaf Rust Resistance in Wheat: Transcript Profiling Reveals a High Energetic Demand Supported by Transient Recruitment of Multiple Metabolic Pathways. Molecular Plant-Microbe Interaction 21: 1515-1526.
- Chong J., Soufan O., Li C., Caraus I., Li, S., Bourque G., Wishart, D.S., Xia J. 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. Nuc. Acids Res, gky310: 1-9.
- Cloutier S., McCallum B. D., Loutre C., Banks T. W., Wicker T., Feuillet C., Keller B. and Jordan M. C. 2007. Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large psr567 gene family. Plant Molecular Biology 65:93-106.
- Driscoll C. J., Anderson L. M. 1967. Cytogenetic studies of Transec a wheat-rye translocation line. Canadian Journal of Genetics and Cytology 9: 375-380.
- Driscoll C. J., Bieligi L. M. 1968. Mapping of the Transec wheat-rye translocation. Canadian Journal of Genetics and Cytology 10: 421-425.
- Driscoll C. J., Jensen N. F. 1964. Characteristics of leaf rust resistance transferred from rye to wheat. Crop Science 4: 372-374
- Ershad D. 2009. Fungi of Iran. 3th edition. Iranian Research Institute of Plant Protection. Tehran. Iran. 531pp.
- Farmer E. E., Weber H. and Vollenweider S. 1998. Fatty acid signaling in Arabidopsis. Planta 206: 167-174.
- Fiehn O., Kopka J., Trethewey R. N. and Willmitzer L. 2000. Identification of uncommon plant metabolites based on calculation of elemental compositions using gas chromatography and quadrupole mass spectrometry. Analytical Chemistry 72: 3573-3580.
- Gogoi R., Singh D. V. and Srivastava K. D. 2001. Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against karnal bunt. Plant Pathology 50: 470-476.
- Hamzehzarghani H., Kushalappa A. C., Dion Y., Rioux S., Comeau A., Yaylala V., Marshall W. D. and Mather D. E. 2005. Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against fusarium head blight. Physiological and Molecular Plant Pathology 66: 119-133.

- Hamzehzarghani H. 2007. Metabolic profiling and multivariate analysis to phenotype cultivars of wheat varying in resistance to fusarium head blight. Ph.D. thesis In Department of plant science McGill University Montreal, Quebec, Canada. pp 182.
- Johnson D. E. 1998. Applied multivariate methods for data analysts. Duxbury Press, New York, 576 pp.
- Lea P. J., Sodek L., Parry M. A. J., Shewry P. R. and Halford N. G. 2006. Asparagine in plant. *Annals of Applied Biology* 150: 1–26.
- Li W. L., Faris J. D., Chittoor J. M., Leach J. E., Hulbert S. H., and Liu D. J. 1999. Genomic mapping of defense response genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 226-33.
- Loewus F. A., Kelly S. and Neufeld E. F. 1962. Metabolism of myo-inositol in plant: conversion to pectin, hemicelluloses, d-xylose, and sugar acids. *Biochemistry* 48: 421-425.
- Lopez-Gresa M. P., Maltese F., Belles J. M., Conejero V., Kim H. K. and Verpoorte R. 2010. Metabolic response of tomato leaves upon different plant-pathogen interactions. *Phytochemical Analysis* 21: 89-94.
- Mahdavi V., Ghanati, F., Ghassempour A. 2016. Integrated pathway-based and network-based analysis of GC-MS rice metabolomics data under diazinon stress to infer affected biological pathways. *Anal. Biochem* 494: 31-36.
- Mert-T.rk F. 2006. Saponins versus plant fungal pathogens. *Journal of Cell and Molecular Biology* 5: 13-17.
- Mitchell H. J., Ayliffe M. A., Rashid K. Y. and Pryor A. J. 2006. A rust-inducible gene from flax (fis1) is involved in proline catabolism. *Planta* 223: 213–222.
- Morkunas, I., & Ratajczak, L. 2014. The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* 36(7):1607-1619
- Pe´rez-Garci´a A., Pereira S., Pissarra J., Garcı´a Gutie´rrez A., Cazorla F. M., Salema R., de Vicente A. and Ca´novas F.M. 1998. Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta* 206: 426–434.
- Roelfs A. P., Singh R. P. and Saari E. E. 1992. *Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management*. Mexico, DF: Cimmyt.
- Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R. N. and Willmitzer L. 2000 Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography-mass spectrometry. *Plant Journal* 23: 131–142.
- Rozan P., Kuo Y. H. and Lambein F. 2001. Nonprotein amino acids in edible lentil and garden pea seedlings. *Amino Acids* 20: 319–324.
- Scarpari L. M., Meinhardt L. W., Mazzafera P., Pomella A. W. V., Schiavinato M. A., Cascardo J. C. M., Pereira G. A. G. 2005. Biochemical changes during the development of witches’ broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicios*a. *Journal of Experimental Botany* 56: 865–877.
- Sumner L. W., Mendes P. and Dixon R. A. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemical* 62: 817-836.
- Yendo A. C. A. and Costa F. D. 2010. Production of Plant Bioactive Triterpenoid Saponins: Elicitation Strategies and Target Genes to Improve Yields. *Molecular Biotechnology* 46:94–104.
- Szabados L. and Savoure A. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Cell* 15: 89-97.
- Tang Y. J., Martin H. G., Myers S., Rodriguez S., Baidoo E. E. and Keasling J. D. 2009. Advances in analysis of microbial metabolic fluxes via ¹³C isotopic labeling. *Mass spectrometry reviews* 28(2): 362-375.
- Trouvelot S., Héloir M. C., Poinssot B., Gauthier A., Paris F., GUILLIER C. ... and Adrian M. 2014. Carbohydrates in plant immunity and plant protection: roles and potential application as foliar sprays. *Frontiers in plant science* 5, 592.
- Zhu X., Tang T. and Galili G. 2000. The catabolic function of the α -amino adipic acid pathway in plants is associated with unidirectional activity of lysine–oxoglutarate reductase, but not saccharopine dehydrogenase. *Biochemical Journal* 315: 215-220.