متابولومیکس و کاربرد آن در بیماری‌شناسی گیاهی

زهرا امجدی[۱] و حبیب‌اله حمزه‌زرقانی[۲]✉

۱-دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۲-استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰٤/۲۰ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۱۰/۱۵

امجدی ز. و حمزه‌زرقانی ح. ۱۳۹۲. متابولومیکس و کاربرد آن در بیماری‌شناسی گیاهی. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی* ۳(۱): ۱٦-۱.

چکیده

متابولومیکس یا واکاوی متابولیت‌های سلولی، دانش مطالعه‌ی مولکول‌های کوچک درون سلولی و تغییرات آن‌ها در شرایط مختلف است. اندازه‌گیری کمّی و کیفی این متابولیت‌ها اطلاعات مفیدی از وضعیت بیوشیمیایی سلول و فعالیت ژن‌ها را فراهم می‌کند. متابولومیکس امروزه کاربرد وسیعی در کشاورزی پیدا کرده و در بیماری‌شناسی گیاهی با استفاده از آن پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، بیماری‌های انباری و ارقام مقاوم شناسایی می‌شوند. از آنجایی که متابولیت‌ها محصولات نهایی بیان ژن‌ها هستند، بررسی پروفیل متابولیتی موجب درک کامل‌تری از سازوکارهای دفاعی گیاه در برابر بیمارگرها می‌شود. این روش ابزاری سریع، آسان و دقیق برای شناسایی متابولیت‌های مرتبط با مقاومت به عنوان نشانگرهای زیستی برای شناسایی ارقام مقاوم به بیماری‌ها است. علاوه بر این دانستن سازوکار مقاومت در سطح مولکولی، درک بهتری را از عملکرد ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها ایجاد کرده و هرمی کردن ژن‌های مقاوم مناسب در یک رقم منتخب را امکان‌پذیر می‌کند. این مقاله مروری بر روش‌های مطالعه متابولیت‌ها، مشکلات اجرایی آن‌ها و کاربردهای آن در بیماری‌شناسی گیاهی است.

واژه‌های کلیدی: بیماری، پروفیل، گیاه، متابولیت، مقاومت

✉ مسئول مکاتبه، پست الکترونیک: zarghani@shirazu.ac.ir

مقدمه

پس از ابداع روش‌های تعیین توالی دی‌اِن‌اِی، واکاوی رونوشت‌ها و پروتئین‌ها، یکی از چالش‌های موجود، بررسی دقیق متابولیت‌های(Metabolites) درون سلولی است. متابولم(Metabolome)، مجموعه متابولیت‌های یک موجود زنده، در واقع محصولات نهایی بیان ژن‌های آن، است. این مجموعه در اغلب گیاهان شامل هزاران ماده شیمیایی مختلف با ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی (وزن مولکولی، اندازه، قطبیت، فراریت، حلالیت و پایداری) متفاوت است (Trethewey 2004, Roessner & Bowne 2009)، این مواد براساس نقش‌شان در بقای گیاهان به ۲ گروه اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. متابولیت‌های اولیه مستقیماً در رشد و نمو گیاه موثر و شامل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتیین‌ها و اسیدهای نوکلییک هستند. متابولیت‌های ثانویه برای حفظ بقای گیاهان تحت شرایط خاص در اثرتنش‌های زیستی و غیرزیستی افزایش یافته یا ساخته می‌شوند (Saito & Matsuda 2010, Beckles & Roessner 2012). متابولومیکس(Metabolomics) یا واکاوی متابولیت‌های سلولی دانشی جدید و قدرتمند برای شناسایی سریع مولکول‌های کوچک (متابولیت‌ها) درون سلولی و تغییرات آن‌ها در شرایط مختلف است. اندازه‌گیری کمّی و کیفی این متابولیت‌ها اطلاعات دقیقی از وضعیت بیوشیمیایی جاندار و میزان فعالیت ژن‌ها به دست می‌دهد (Summer *et al*. 2003).

۱- فن‌آوری‌های مورد استفاده در متابولومیکس

در حال حاضر برای شناسایی واندازه‌گیری کمی متابولیت‌های یک نمونه زیستی از چند روش واکاوی استفاده می‌شود. فن‌آوری‌های بهینه شده برای جداسازی متابولیت‌ها عبارتند از: کروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography=GC)، کروماتوگرافی مایع (Liquid Chromatography=LC)، کروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Choromatogharaphy=TLC) و الکتروفورز مویین (Capillary Electrophoresis=CE) و تعدادی از روش‌های شناسایی مثل طیف‌سنج جرمی (Mass Spectrophotometer=MS)، طیف‌سنج رزونانس مغناطیسی هسته (Nuclear Magnetic Resonance=NMR)، طیف‌سنج نور مرئی و پرتو فرابنفش، طیف‌بینی مادون قرمز (Infrared Spectroscopy=IR) و فلئوروسنس القا کننده لیزر (Laser Induced Fluorescence =LIF) هستند (Beckles & Roessner 2012). به طور کلی از ترکیبی از این روش‌ها مثل

LC-NMR، LC-MS، GC-MS، CE-MS، LC-CE-MS و غیره برای اندازه‌گیری متابولیت‌ها استفاده می‌شود که تحت عنوان فن‌آوری‌های ترکیبی نامیده می‌شوند. نحوه نمایش نام فن‌آوری همراه با خط فاصله (Hyphenated technologies) بین نام آن‌ها به دلیل وجود چند فن‌آوری در یک وسیله است (Desbrosses *et al*. 2005, Weckwerth & Morgenthal 2005, Beckles & Roessner 2012).

۲- مراحل تجزیه شیمیایی در متابولومیکس

متابولومیکس یک علم بین رشته‌های علوم زیستی، شیمی تجزیه، شیمی آلی، شیمی‌سنجی و بیوانفورماتیک است.

۲-۱- استخراج متابولیت‌ها

متابولیت‌ها شامل دامنه‌ی گسترده‌ای از ترکیبات بسیار آب‌گریز (لیپیدها) تا بسیار آب‌دوست (آمینو اسیدها) هستند. بسته به هدف از استخراج متابولیت‌های گیاهی می‌توان از یک یا ترکیبی از حلال‌ها استفاده کرد. در واکاوی هدف‌مند براساس ماهیت متابولیت مورد نظر باید یک یا ترکیبی از حلال‌های مناسب را به کار برد. در واکاوی بی‌هدف که برای جداسازی تعداد زیادی متابولیت است، به طور معمول از متانول برای استخراج ترکیبات قطبی و از کلروفرم برای استخراج ترکیبات غیرقطبی استفاده می‌شود. اما هنوز یک حلال که به تنهایی یا در ترکیب با سایر حلال‌ها برای استخراج تمام متابولیت‌ها مناسب باشد،شناخته نشده است (Fukusaki & Kobayashi 2005).

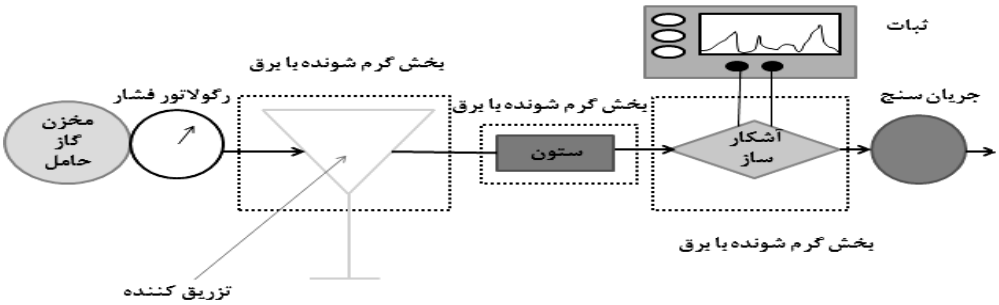
۲-۲- اشتقاق

اشتقاق یعنی تولید یک ترکیب جدید از یک ترکیب شیمیایی که در تجزیه‌های شیمیایی بسته به فن‌آوری مورد استفاده و به دلایل مختلفی انجام می‌شود. GC-MS تنها ترکیباتی که فرار باشند یا قابلیت فراریت داشته باشند را واکاوی می‌کند. ترکیباتی مثل اسیدها، آمین‌ها و الکل‌ها به دلیل داشتن هیدروژن اسیدی، بسیار فعال هستند. یکی از روش‌های اشتقاق سایلیله کردن (Silylation) است. در این فرایند هیدروژن اسیدی این ترکیبات با یک گروه آلکیل سایلیل (مثل $SiMe_3$) جایگزین می‌شود. این کار باعث افزایش فرّاریت و پایداری و کاهش قطبیت و نقطه جوش می‌شود،همچنین موجب افزایش حساسیت و عملکرد GC-MS برای این ترکیبات می‌شود (Weckwerth &

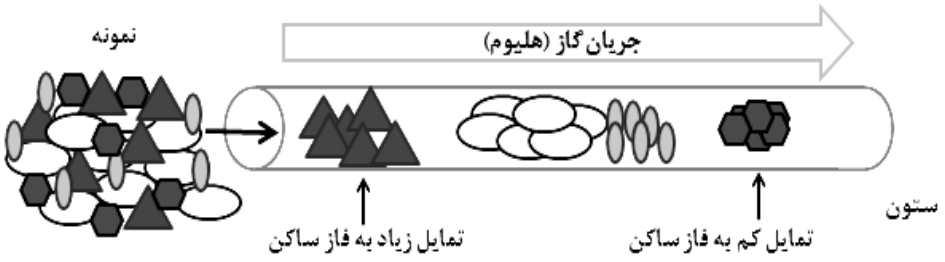
(Morgenthal 2005, Beckles & Roessner 2012). یکی دیگر از روش‌های اشتقاق متوکسیمه کردن (Methoxiamination) است. گروه کربونیل در قندها و مشتقات قندی قبل از واکاوی با GC-MS نیازمند یک سری تغییرات هستند. در این فرایند با جانشین کردن گروه متیل آمین روی گروه آلدئید و کتونی در قندها و با تثبیت بخش کربونیل در موقعیت β از حلقوی شدن و احیا قندها ممانعت می‌شود (Fukusaki & Kobayashi 2005, Desbrosses *et al*. 2005).

۲-۳- جداسازی و کمّیت‌سنجی

انتخاب مناسب‌ترین فن‌آوری بستگی به حساسیت فن‌آوری، سرعت تجزیه، جامعیت، ظرفیت و قدرت روش در انتخاب متابولوم دارد (Weckwerth & Morgenthal 2005, Beckles & Roessner 2012). کروماتوگرافی گازی که با ردیاب‌هایی همچون طیف‌سنج جرمی ادغام شده است (GC-MS) یکی از مفیدترین روش‌ها برای بررسی متابولیت‌ها است (Desbrosses *et al* 2005). دستگاه کروماتوگرافی گازی از ۵ بخش ورودی، مخزن گاز، آون، ستون و آشکارساز تشکیل شده است (شکل ۱). در این سیستم فاز متحرک یک گاز بی‌اثر مثل هلیم یا نیتروژن است. فاز ساکن یک ماده جامد یا مایع، که محیط قسمت داخلی ستون را پوشانده است. ترکیبات موجود در نمونه‌ها پس از تزریق به بخش ورودی، در نتیجه گرمای حاصل از آون تبدیل به گاز می‌شوند و با فاز متحرک مخلوط می‌شوند و در ستون حرکت می‌کنند. اجزای نمونه در ستون براساس تمایلشان به فاز ساکن و نقطه جوش از هم جدا می‌شوند. هرچه تمایل مولکول‌ها به فاز ساکن کمتر باشد و زودتر به نقطه جوش برسند، از بقیه اجزا سریع‌تر جدا شده و به آشکارسازها می‌رسند (شکل ۲) و نهایتاً نمودار کروماتوگرام آن‌ها رسم می‌شود.



شکل ۱- اجزای تشکیل دهنده کروماتوگرافی گازی (باقری، ۱۳۸۸).



شکل ۲- جداسازی ملکول‌های مختلف در ستون موئین کروماتوگرافی گازی (باقری، ۱۳۸۸).

ترکیبات جداشده از سیستم کروماتوگرافی گازی وارد طیف‌سنج جرمی می‌شوند. این سیستم از چهار بخش تشکیل شده است که شامل ورودی، منبع یون، سیستم اندازه‌گیری و آشکارساز می‌باشد. اساس طیف‌سنج جرمی جداسازی یون‌های تشکیل دهنده‌ی مولکول‌های جدا شده از GC بر پایه‌ی نسبت جرم به بار و اندازه‌گیری فراوانی آن‌ها است. نمونه‌ها پس از ورود در اثر برخورد الکترون با انرژی بالا در حدود ۷۰ الکترون ولت یونیزه می‌شوند. سپس یون‌های حاصله وارد میدان مغناطیسی می‌شود که عمود بر جریان تابش الکترون است. در این میدان یون‌ها براساس نسبت جرم به بارشان (m/z) از مسیر منحرف شده و به یک صفحه برخورد می‌کنند. در اثر شدت برخورد جریانی الکتریکی ایجاد می‌شود که این جریان توسط آشکارساز ثبت می‌شود. نهایتاً نمودار طیف جرمی (اسپکتروم) براساس فراوانی نسبی یون‌ها بر حسب جرم به بارشان رسم می‌شود (Desbrosses *et al*. 2005).

۲-۴- پیش پردازش (Pre-processing)

قبل از استفاده از کروماتوگرام یا طیف جرمی برای شناسایی ترکیبات مورد نظر باید یک سری تصحیحاتی روی نمودارها صورت گیرد که به این کار پیش‌پردازش گویند که شامل سه مرحله است:

۲-۴-۱- دکانولوشن (Deconvolution)

در این مرحله آلودگی‌هایی که از منابع دیگر آمده‌اند (مثلاً مولکولی که زمان نگهداریش در ستون شبیه مولکول مورد نظر ما باشد) حذف می‌شوند که این کار موجب بهبود شناسایی از لحاظ کیفی و کمّی می‌شود.

۲-۴-۲- تشخیص تغییرات ناخواسته از سیگنال‌های واقعی (Baseline correction)

بدین منظور می‌توان یک نمونه خالی را با هر نمونه راند. در این صورت سیگنال‌های ناشی از تغییرات ناخواسته از سیگنال‌های واقعی ناشی از نمونه مجزا می‌شود. سپس نسبت ارتفاع هر اوج (Peak) نمونه به ارتفاع اوج تغییرات ناخواسته مربوطه سنجیده می‌شود و اگر مقدار به دست آمده کمتر از یک مقدار مشخص مد نظر ما بود حذف می‌شود.

۲-۴-۳- تراز کردن اوج‌ها (Peak alignment)

سرعت تزریق نمونه به سیستم، طول ستون و عمر ستون موجب می‌شود که در هر بار راندن، نمودارها کمی به سمت جلو یا عقب جابه‌جا شوند. برای جبران خطاهای ناشی از این عوامل تمام سیگنال‌های شناسایی شده از همه نمونه‌ها در یک آزمایش برای محاسبه زمان نگهداری بین هر بار راندن هم‌تراز می‌شوند(Beckles & Roessner 2012).

۲-۵- شناسایی

براساس زمان نگهداری (Retention time) یعنی فاصله زمان ورود نمونه به دستگاه تا خروج هر مولکول از ستون کروماتوگرافی و طیف جرمی (Mass Spectrum) هر مولکول با مراجعه به پایگاه داده‌ها مثل National Institute of Science and Technology Mass Spectral library می‌توان مولکول‌های مورد نظر را شناسایی کرد (Desbrosses *et al*. 2005, Hamzehzarghani *et al*. 2005).

۲-۶- واکاوی‌های آماری

در نهایت پس از شناسایی مولکول‌ها برای تعیین تفاوت‌های آماری متابولیت‌ها بین تیمارها روش‌های آماری تک متغیره (t-test) و یا چند متغیره [واکاوی عامل اصلی (Principal Component Analysis) ، واکاوی تفکیک‌کننده‌ی اصلی (Canonical Discriminant Analysis)، واکاوی خوشه‌ای سلسله مراتب (Hierarchical Cluster Analysis) و واکاوی عامل مستقل (Factor Analysis)] به کار برده می‌شوند(Beckles & Roessner 2012).

۳- محدودیت‌های متابولومیکس

محدودیت‌های عمده متابولومیکس ناتوانی آن در پروفیل کردن جامع تمام متابولیت‌ها است. این ناتوانی به طور مستقیم مربوط به پیچیدگی مواد شیمیایی، تغییرات واکافتی (Analytical)، تغییرات زیستی و محدوده دینامیکی اغلب روش‌های مورد استفاده است. تغییرات واکافتی به طور مستقیم به روش آزمایش مربوط می‌شود و براساس فن‌آوری مورد استفاده متفاوت است. تغییرات زیستی ناشی از تغییرات کمّی در سطح متابولیت‌ها است. عموماً تغییرات زیستی بیش از تغییرات واکافتی است. مرحله رشدی گیاه، فاکتورهای محیطی و نمونه‌برداری در تغییرات زیستی اثر می‌گذارند. یک روش کاهش تغییرات زیستی مخلوط کردن نمونه‌ها با تجزیه بافت‌های مختلف یک گیاه مشخص و یا مخلوط کردن تکرارهای گیاهی است. این امر کمک می‌کند تا تغییرات تصادفی به حداقل برسد. حضور تعداد زیادی متابولیت در متابولم می‌تواند باعث تداخل شیمیایی شده و دامنه‌ای که در آن یک گروه متابولیتی به صورت موفقیت‌آمیز جدا شود، محدود گردد. به عنوان مثال سطوح بالای متابولیت‌های اولیه مثل قندها اغلب با توانایی پروفیل کردن متابولیت‌های ثانویه مثل فلاونوئیدها تداخل دارد. بسیاری از متابولیت‌های بیان شده اغلب منحصر به فرد هستند و موجب تمایز سلول‌ها، بافت‌ها یا موجودات می‌شوند. این ترکیبات منحصربه‌فرد به عنوان نشانگرهای زیستی معرفی می‌شوند. پروفیل کردن انتخابی این نشانگرهای زیستی در کشف بیماری‌هایی مثل دیابت و سرطان بسیار مفید است (Summer *et al*. 2003).

۴- کاربرد متابولومیکس در بیماری‌شناسی گیاهی

متابولومیکس امروزه کاربرد وسیعی در پزشکی (برای تشخیص بیماری‌های متابولیکی،سرطان و دیابت)، صنعت (برای تفکیک جنس‌های تقلبی از اصلی) و کشاورزی (طبقه‌بندی گیاهان، بررسی تنوع فیتوشیمیایی گیاهان دارویی و ارزیابی کیفیت مواد غذایی از لحاظ رنگ، بو و مزه) دارد. در بیماری‌شناسی گیاهی برای شناسایی پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی و غیرزیستی، شناسایی بیماری‌های انباری در انبار از روی مواد فرّار تولید شده در اثر بیماری، ارزیابی مقاومت گیاهان و ژنومیکس کارکردی به کار رفته است. یکی از اولین مثال‌ها برای استفاده از پروفیل متابولیکی به عنوان ابزار تشخیصی تعیین نحوه‌ی اثر علف‌کش‌های متنوع با استفاده از روش GC-MS بود (Schauer & Farnie 2006). پروفیل متابولیکی اکنون روی گونه‌های گیاهی متنوعی، شامل *آرابیدوپسیس*(*Arabidopsis*

Abu-Nada *et al.*) سیب‌زمینی ،(Kaplan *et al*. 2004, Allwood *et al*. 2010) (*thaliana* (L.) Heynh 2007)، برنج (Allwood *et al*. 2006, Siahpoosh *et al*. 2012) گندم (Hamzehzarghani *et al*. 2005, Hamzehzarghani *et al*. 2008)، جو (Bollina *et al*. 2010)، توت‌فرنگی (Aharoni *et al*. 2002)، یونجه (Chen *et al*. 2003)، کدو (Tagashira *et al*. 2005)، کاهو (Garratt *et al*. 2005)، تنباکو (Blount *et al*. 2002)، درخت تبریزی (Robinson *et al*. 2005) و اُکالیپتوس (Merchant *et al*. 2006) اجرا شده است. در ذیل مثال‌هایی از این کاربردها آمده است.

۴-۱- شناسایی پاسخ گیاهان به تنش‌های غیرزیستی

گیاهان برای مقابله با تنش‌های غیرزیستی مثل سرما، یخ‌زدگی، گرما، خشکی، شوری، کمبود و بیش‌بود عناصر غذایی سازوکارهایی را کسب کرده‌اند. قرار گرفتن در برابر این تنش‌ها موجب اختلال در متابولیسم می‌شود که این تغییرات را می‌توان از طریق پروفیل‌کردن متابولیت‌ها اندازه‌گیری کرد (Beckles & Roessner 2012).

نیتروژن‌های معدنی در تولید اسیدهای‌آمینه بسیار اهمیت دارند،به همین دلیل توصیفی از پاسخ‌های متابولیکی برگ گوجه‌فرنگی به تغییرات سطح نیتروژن با GC-MS انجام شده است. نتایج نشان داد که در میزان اسیدهای‌آمینه، حد واسط‌های چرخه اسیدتری‌کربوکسیلیک، قندها، قندهای الکلی و متابولیت‌های ثانویه تغییراتی تحت تیمارهای مختلف به وجود می‌آید. کمبود نیترات منجر به کاهش بسیاری از اسیدهای آمینه و آلی و افزایش سطح چندین کربوهیدرات، فسفواسترها و متابولیت‌های ثانویه می‌شود (Urbanczyk-Wochniak & Fernie 2005).

تاثیر تنش‌های خشکی و دمایی جداگانه و در ترکیب باهم روی گیاه *آرابیدوبسیس* پژوهشی با استفاده از GC-MS صورت گرفته است. نتایج نشان داده که پاسخ گیاه تحت تأثیر هر ۲ نوع تنش باعث تجمع سوکروز، مالتوز و گلوکز می‌شود. تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش خشکی دیده شد اما در بوته‌هایی که تحت هر ۲ تنش بودند، دیده نشد که می‌تواند نشان دهنده سازوکارهای متفاوت باشد (Rizhsky *et al*. 2004).

۴-۲- شناسایی پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی

اطلاعات کمی در مورد پاسخ گیاهان به تنش‌های زیستی در دسترس است. باید متابولیت‌های بافت‌های بیمار

و بیمارگر به طور جداگانه واکاوی شوند. بدین ترتیب متابولیت‌های مستقر برای دفاع گیاه و پرآزاری بیمارگر شناخته می‌شوند (Beckles & Roessner 2012). پروفیل متابولیتی ارقام مقاوم (ABR1) و حساس (ABR2) گیاه *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. در واکنش به قارچ *Magnaporthe grisea* (T.T. Hebert) M.E. Barr، عامل بیماری بلاست برنج، قبل و پس از آلودگی با روش ESI-MS بررسی و ثابت شده، که میزان فسفولیپیدها در طی واکنش‌های دفاعی در رقم مقاوم و پیشرفت بیماری در رقم حساس تغییر می‌کنند (Allwood *et al*. 2006).

۴-۳- ارزیابی بیماری‌های پس از برداشت در انبار

انجام واکاوی مواد فرار برای تشخیص بیماری‌های بعد از برداشت در طول نگهداری انبه ، سیب و پیاز در انبار به شرکت‌های باربری و عمده فروشان این محصولات کمک می‌کند تا محصولات آلوده را سریع‌تر روانه بازار کرده و از زیان‌های بزرگ در امان بمانند. برای شناسایی متابولیت‌های فرار سطح زخمی وآلوده به بیمارگر محصول از یک GC-MS قابل حمل استفاده می‌شود. اغلب متابولیت‌های قابل تشخیص به ۳ گروه: الف- ترکیبات منحصر به فرد نسبت به یک بیمارگر، ب- ترکیبات مشترک بین ۲ یا تعدادی بیش‌تر ولی نه نسبت به همه بیمارگرها و ج- ترکیبات مشترک نسبت به همه بیمارگرها اما با فراوانی متفاوت، طبقه‌بندی می‌شوند (Moalemiyan *et al*. 2006, Vikram *et al*. 2005).

۴-۴- ارزیابی مقاومت گیاهان

با وجود روش‌های مختلف مدیریت بیماری‌های گیاهی، بهترین روش آن‌ها که اقتصادی نیز است، شناسایی و کشت ارقام مقاوم است. بدین منظور هر ساله ایستگاه‌های تحقیقاتی کشاورزی بهترین ارقام گیاهان را که ویژگی‌های مطلوب زراعی توام با مقاومت در برابر بیماری را دارند، شناسایی و به کشاورزان توصیه می‌کنند. تعیین مقاومت ارقام با مایه‌زنی بیمارگر روی گیاه در شرایط مزرعه و یا گلخانه و ارزیابی عکس العمل آن‌ها هر ساله و به صورت مستمر در مراکز تحقیقات صورت می‌گیرد که این کار بسیار وقت‌گیر و هزینه‌بر است و متأسفانه مقاومت ارقام مقاوم به دلایل مختلف پس از چند سال کشت پی‌درپی شکسته می‌شود. چنانچه در کنار آن از روش‌های زیست‌فن‌آوری مثل استفاده از نشانگرهای مولکولی و سایر روش‌های تعیین مقاومت در شرایط آزمایشگاهی استفاده گردد، درجه اطمینان

ارزیابی‌های مزرعه‌ای به نحو مطلوب افزایش می‌یابد. بررسی پروفیل متابولیتی موجب درک کامل‌تری از سازوکارهای دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی از جمله بیمارگرها می‌شود. از سوی دیگر اصلاح کنندگان گیاهان به دنبال ابزارهای سریع، آسان و دقیق برای شناسایی متابولیت‌های مرتبط با مقاومت به عنوان نشانگرهای زیستی برای غربال‌گری یا تشخیص سطح مقاومت ارقام نسبت به بیماری‌ها هستند. علاوه بر این دانستن سازوکار مقاومت در سطح متابولوم، درک بهتری از عملکرد ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها به اصلاح کنندگان داده و آنان را در هرمی کردن ژن‌های مقاوم مناسب در یک رقم منتخب کمک می‌کند. با بررسی پروفیل متابولیکی سنبلچه‌های ارقام گندم، روبلین و سومای۳، به ترتیب حساس و مقام به سوختگی فوزاریومی سنبله با استفاده از GC-MS، ۵۵ ترکیب شناسایی شده‌اند که ۲۳ ترکیب در روبلین و ۲٦ ترکیب در سومای۳، به دنبال مایه‌زنی با بیمارگر افزایش بیان داشتند. اما تنها ۵ متابولیت بین ارقام و مایه‌زنی شده‌ها تفاوت معنی‌دار داشتند. اسیدمتاهیدروکسی‌سینامیک در ٤ تیمار شناسایی ولی در سومای۳ به دنبال مایه‌زنی بیمارگر ٦ برابر شده و در روبلین هیچ تغییری نیافت. فراوانی میواینوزیتول در سومای۳ بیش از روبلین بود و در هر ۲ به دنبال مایه‌زنی بیمارگر افزایش یافت. ترکیبات متنوع شناسایی شده در این پژوهش در زمینه نقش‌های ممکن در دفاع گیاه در مقابل تنش بیمارگر، مسیرهای متابولیکی تولیدشان و امکان کاربرد آن‌ها برای غربال‌گری ارقام مقاوم گندم نسبت به سوختگی فوزاریومی سنبله گندم بحث شده است. اطلاعات به دست آمده، نشان می‌دهد که یکی از مسیرهای متابولیکی موثر در مقاومت مسیر Phenyl ammonia lyase=PAL است (Hamzehzarghani *et al*. 2005). همچنین با بررسی پروفیل متابولیکی همین ارقام گندم در واکنش به بیماری سوختگی فوزاریومی سنبله پس از مایه‌زنی با قارچ بیمارگر *Fusarium graminearum* Schwabe و زهرابه عامل پرآزاری دأکسی‌نیوالنول جهت شناسایی سازوکارهای دفاعی گندم با استفاده از GC-MS، ۱۷۷ متابولیت از گروه‌های ضدمیکروبی، مولکول‌های پیام‌رسان و پیش‌ماده آن‌ها شناسایی شده‌اند، که از بین این متابولیت‌ها، به ترتیب ۱۵ و ۱۸ متابولیت مرتبط با مقاومت به بیمارگر و فاکتور پرآزاری بوده‌اند (Paranidharan *et al*. 2008).

همچنین با بررسی پروفیل متابولیکی سنبلچه‌های شش رقم و یا رگه گندم از نظر مقاومت نسبت به سوختگی فوزاریومی سنبله با استفاده از GC-MS، ۲۱٤ متابولیت شناسایی شده‌اند، که در این میان ۷۹ متابولیت بین تیمارها اثرات معنی‌داری داشتند. با واکاوی تک متغیره ٤۱ متابولیت مرتبط با مقاومت و با واکاوی چند متغیره ٤۵ متابولیت

مرتبط با عملکرد مقاومت از لحاظ ساختاری یا القایی بودن شناسایی شدند و مشخص شده که رقم بسیار مقاوم Wangshuibai و رگه AW488 بیشترین تعداد متابولیت مرتبط با مقاومت القایی و مرتبط با مقاومت ساختاری دارند و پیشنهاد شده که متابولیت‌های مرتبط با مقاومت شناسایی شده، به عنوان نشانگرهای زیستی بالقوه برای غربالگری مقاومت در رگه‌های اصلاح شده گندم در برابر سوختگی فوزاریومی سنبله استفاده شوند (Hamzehzarghani *et al.* 2008).

بررسی متابولیت‌های مرتبط با مقاومت به سوختگی فوزاریومی سنبله در ۲ ژنوتیپ جو، چورون و استاندر، با LC-ESI-LTQ-Orbitrap با واکاوی تک متغیره نشان داده که از ٤٩٦ متابولیت با اثر تیماری معنی‌دار، ١٩٤ متابولیت به عنوان متابولیت‌های ساختاری مرتبط با مقاومت هستند. متابولیت‌های مرتبط با مقاومت در مسیرهای متابولیکی فنیل پروپانوئیدها، اسیدهای چرب و تری‌ترپنوئیدها دخیل بودند. در این تحقیق متابولیت‌های مرتبط با مقاومت در آزمایشگاه برای فعالیت ضد قارچی روی تولید زیست‌توده‌ی قارچ بیمارگر ارزیابی شده و در مورد کاربرد آن‌ها به عنوان نشانگر زیستی بالقوه برای شناسایی ارقام مقاوم بحث شده است (Bollina *et al.* 2010).

با بررسی پروفیل متابولیتی بخش قطبی رگه‌های گندم حساس (Thatcher *Lr22b*) و مقاوم (Thatcher *Lr25*) به زنگ قهوه‌ای گندم در مرحله دو برگچه‌ای ٢٤ ساعت پس از مایه‌زنی با بیمارگر، پودر تالک و آب مقطر سترون شده با GC-MS، ٥٢ متابولیت مشترک در بین همه تیمارها شناسایی شدند. تجزیه واریانس با سطح معنی‌دار $P \leq 0.2$ نشان داد که فراوانی ٢٧ متابولیت بین تیمارهای آزمایش اختلاف معنی‌داری داشتند. متابولیت‌ها از ٦ گروه مختلف شامل اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی، اسیدهای چرب، قندها، ساپونین و آمین بودند. همچنین مشاهده شد که در اثر حمله قارچ به گندم مسیرهای گلیکولیز، چرخه اسیدتری‌کربوکسیلیک، پنتوز فسفات اکسیداتیو و اسید شیکمیک فعال‌تر شدند (امجدی ۱۳۹۱).

۴-۵- ژنومیکس کارکردی

هدف از ژنومیکس کارکردی کشف عملکرد ژن‌های ناشناخته یا به عبارت دیگر مطالعه فیزیولوژی و بیوشیمیایی پیامدهای ناشی از عملکرد ژن و نقش آن‌ها است. برای درک بهتر از عملکرد ژن می‌توان شبکه ژن تا

متابولیت را کشید. پژوهش‌های اخیر نشان داده که واکاوی ترکیب متابولیت جهش‌یافته‌ها می‌تواند به تشخیص وظیفه و عملکرد ژن کمک کند (Schauer & Fernie 2006, Beckles & Roessner 2012).

نتیجه

متابولومیکس یک علم در حال توسعه است و در زمینه‌های مختلف هر ساله انتشارات فراوانی دارد. با این حال متابولومیکس نیازمند پیشرفت روش‌هایی برای پوشش دادن هرچه بیش‌تر متابولوم استخراج شده، نوآوری در اندازه‌گیری مقدار متابولیت‌ها در سلول، پیشرفت در شناسایی متابولیت‌ها با روش‌های قابل اعتمادتر و آسان‌تر، ایجاد پایگاه داده‌های معتبر و مخصوص در هر رشته می‌باشد. هدف نهایی ایجاد دانش کافی برای درک تصویری از آنچه در سلول می‌گذرد، است. واکاوی مولکول‌های زیستی شامل ژن‌ها، رونوشت‌ها، پروتئین‌ها و متابولیت‌ها برای شناخت جامع یک سیستم زیستی لازم است. این کار درک ما را از زیست‌شناسی موجودات زنده و پاسخ آن‌ها به محرک‌های محیطی و تأثیرات ژنتیکی افزایش می‌دهد. هم‌سو کردن داده‌های واکاوی مولکول‌های زیستی جانداران مختلف نیازمند علم بیوانفورماتیک برای تجزیه وتحلیل اطلاعات و تفسیر دقیق نتایج است (Roessner *et al*. 2011).

منابع **References**

امجدی ز. ۱۳۹۱. مقایسه پروفیل متابولیکی دو لاین حساس (Thatcher *Lr22b*) و مقاوم (Thatcher *Lr25*) گندم به بیماری زنگ برگی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشگاه شیراز، ۹۷ص.

باقری پ. ۱۳۸۸. آشنایی با کروماتوگرافی گازی. http://water-research.persianblog.ir/post/44.

Abu-Nada Y., Kushalappa A. C., Marshall W. D., Prasher S. & Al-Mughrabi K. 2007. Metabolic profiling horizontal resistance in potato leaves (cvs. Caesar and AC Novachip) against *Phytophthora infestans*. Pp.269-286. *In*: B. J. Nikolau & E. S. Wurtele(eds). Concepts in Plant Metabolomics. Springer, Netherlands.

Aharoni A., Rice devos C. H., Verhoeven H. A., Maliepaard C. A., Kruppa G., Bino R. & Goodenowe D. B. 2002. Nontargeted metabolome analysis by use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS* 6: 217–234.

Allwood J. W., Ellis D. L., Heald J. K., Goodacre R. & Mur L. A. J. 2006. Metabolomic approaches reveal that phosphatidic and phosphatidyl glycerol phospholipids are major discriminatory non-polar metabolites in responses by *Brachypodium distachyon* to challenge by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Journal* 46: 351-368.

Allwood J. W., Clarke A., Goodacre R. & Mur L. A. J. 2010. Dual metabolomics: A novel approach to understanding plant-pathogen interactions. *Phytochemistry* 71: 590–597.

Beckles D. M. & Roessner U. 2012. Plant metabolomics: Applications and opportunities for agricultural biotechnology. Pp.67-81. *In*: A. Altman & P. P. Hasegawa(eds). Plant Biotechnology and Agriculture. Elsevier Inc.

Blount J. W., Masoud S. A., Sumner L. W., Huhman D. & Dixon R. A. 2002. Over-expression of cinnamate 4-hydroxylase leads to increased accumulation of acetosyringone in elicited tobacco cell-suspension cultures. *Planta* 214: 902–910.

Bollina V., Kenchappa Kumaraswamy G., Kushalappa A. C., Choo T. M., Rioux, S., Faubert D. & Hamzehzarghani H. 2010. Mass spectrometry-based metabolomics application to identify quantitative resistant-related metabolites in barley against *Fusarium* head blight. *Molecular Plant Pathology* 11: 769-782.

Chen F., Duran A. L., Blount J. W., Sumner L. W. & Dixon R. A. 2003. Alfalfa modified in lignin biosynthesis. *Phytochemistry* 64: 1013–1021.

Desbrosses G., Steinhauser D., Kopka K. & Udvardi, M. 2005. Metabolome analysis using GC-MS. Pp. 165-174. *In*: A. J. Marquez(ed.). Lotus Japonicus Handbook. Springer, Netherlands.

Fukusaki E. & Kobayashi A. 2005. Plant metabolomics: potential for practical operation. *Bioscience Bioengineering* 100: 347-357.

Garratt L. C., Linforth R., Taylot A. J., Lowe K., Power J. B. & Davey M. R. 2005. Metabolite fingerprinting in transgenic lettuce. *Plant Biotechnology Journal* 3: 165–174.

Hamzehzarghani H., Kushalappa A. C., Dion Y., Rioux S., Comeau A., Yaylaya V., Marshall W. D. & Mather D. E. 2005. Metabolic profiling and factor analysis to discriminate quantitative resistance in wheat cultivars against Fusarium head blight. *Physiology Molecular Plant Pathology* 66: 119–133.

Hamzehzarghani H., Paranidharan V., Abu-Nada Y., Kushalappa A. C., Dion Y., Rioux S., Comeau A., Yaylayan V. & Marshall W. D. 2008. Metabolic profiling coupled with

statistical analyses for potential high-throughput screening of quantitative resistance to fusarium head blight in wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology* 30: 24-36.

Merchant A., Richter A., Popp M. & Adams M. 2006. Targeted metabolite profiling provides a functional link among eucalypt taxonomy, physiology and evolution. *Phtochemical* 67: 402-408.

Moalemiyan M., Vikram A., Kushalappa A. C. & Yaylayan V. 2006. Volatile metabolite profiling to detect and discriminate stem-end rot and anthracnose diseases of mango fruits. *Plant Pathology* 55: 792–802.

Paranidharan V., Abu-Nada Y., Hamzehzarghani H., Kushalappa A. C., Mamer O., Dion Y., Rioux S. & Comeau A. 2008. Resistance related metabolites in wheat against Fusarium graminearum and the virulence factor (DON). *Canadian Journal of Botany* 86: 1168-1179.

Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S. & Mittler R. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134: 1683–1696.

Robinson A. R., Gheneim R., Kozak R. A., Ellis D. D. & Mansfield S. D. 2005. The potential of metabolite profiling as a selection tool for genotype discrimination in Populus. *Journal of Experimental Botany* 56: 2807–2819.

Roessner U. & Bowne J. 2009. What is metabolomics all about? *Biotechniques* 46: 363–365.

Roessner U., Nahid A., Hunter A. & Bellgard M. 2011. Metabolomics the combinstion of analytical chemistry, biology and informatics. Pp.447–459. *In*: M. Moo-Young(ed). Comprehensive Biotechnology. Elsevier.

Saito K. & Matsuda F. 2010. Metabolomics for functional genomics, systems biology, and biotechnology. *Annual Review of Plant Biology* 61: 463–489.

Schauer N. & Fernie A. R. 2006. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Plant Science* 11: 508-515.

Summer L. W., Mendes P. & Dixon R. A. 2003. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 62: 817-836.

Tagashira N., Plader W., Filipecki M., Yin Z. H., Wisniewska M., Gaj, P., Szwacka M., Fiehn O., Hoshi Y. & Kondo k. 2005. The metabolic profiles of transgenic cucumber lines vary with different chromosomal locations of the transgene. *Cellular & Molecular Biology Letters* 10: 697–710.

Trethewey R. N. 2004. Metabolite profiling as an aid to metabolic engineering in plants. *Current Opinion in Plant Biology 7*: 196–201.

Urbanczyk-Wochniak E. & Fernie A. R. 2005. Metabolic profiling reveals altered nitrogen nutrient regimes have diverse effects on the metabolism of hydroponically-grown tomato (*Solanum lycopersicum*) plants. *Journal of Experimental Botany* 56: 309–321.

Vikram A., Prithiviraj B., Hamzehzarghani H. & Kushalappa A. C. 2004. Volatile metabolite profiling to discriminate diseases of McIntosh apple inoculated with fungal pathogens. *Journal of Science of Food and Agriculture* 84:1333-1340.

Vikram A., Hamzehzarghani H. & Kushalappa A. C. 2005. Volatile metabolites from the headspace of onion bulbs inoculated with post harvest pathogens as a tool for disease discrimination. *Canadian journal of Plant Pathology* 27:194-203.

Weckwerth W. & Morgenthal K. 2005. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. *Drug Discovery Today Targets* 10: 1552-1558.

Metabolomics and its Application in Plant Pathology

ZAHRA AMJADI & HABIBALLAH HAMZEHZARGHANI✉

Former M.Sc. Student and Assistant Professor of Plant pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

(✉Corresponding author, E.mail: zarghani@shirazu.ac.ir)

Amjadi Z. & Hamzehzarghani H. 2014. Metabolomics and its application in plant pathology. *Plant Pathology Science* 3(1):1-16.

Abstract

Metabolomics or analysis of the whole cellular metabolites is a new and powerful tool that provides a quick view to the large numbers of small molecules (metabolites) within the cell and indicates dynamics of these molecules under different conditions. Quantitative and qualitative measurements of these metabolites provide some useful information on biochemical status of the cell so can be used to monitor the gene functions. Nowadays, metabolomics has a wide range of application in agriculture. Metabolomics is mainly used for the study of plant responses to a wide range of biotic or abiotic stresses including plant storage diseases as well as the resistance of plants to the pathogens. Since metabolites are final products of gene expression and all changes in gene expression is reflected in metabolite profiles, hence metabolite profiles provide a good comprehensive understanding of plant defense mechanisms against plant pathogens. This is a rapid, simple and accurate tool for identifying the metabolites associated with resistance as a biomarker for screening the resistant cultivars against plant diseases. In addition, understanding the resistance mechanisms at molecular level provide a better understanding of resistant gene function and pyramiding suitable resistant gene in elite cultivar. This is a review article on different methods of studying the plant metabolites and their administrative problems in plant pathology.

Key words: Disease, Profile, Plant, Metabolite, Resistance