

اثر بیمارگر قارچی *Leptosphaeria maculans* در مرحله زیواپرور بر پروفیل متابولیکی گیاه کلزا رقم هایولا ۴۰۱ در یک برهم کنش سازگار

زهرا امجدی و حبیب‌اله حمزه‌زرقانی^{*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۱)

چکیده

پیشرفت‌های اخیر در زمینه ابزارها و استخراج داده‌ها، امکان مطالعه تاثیر تنش‌های مختلف را بر متابولیسم اولیه و ثانویه گیاه به وجود آورده است. مطالعه مکانیسم‌های بیماری‌زایی و شناسایی مسیرهای متابولیکی مرتبط با بیماری‌زایی در گیاه، تغییرات در پروفیل متابولیکی بخش قطبی حاصل از برهمکنش سازگار قارچ *Leptosphaeria maculans* (فرم غیرجنسی *Phoma lingam*) (جدایه گرگان) و کلزا رقم حساس هایولا ۴۰۱ به کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی (GC-MS) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور در شرایط کاملاً کنترل شده، ۱۴ روز پس از کشت، در مرحله دو لپه‌ای، گیاهان به ترتیب با سوسپانسیون ۱۰^۷ اسپور در میلی‌لیتر و آب (شاهد) به روش قطره-زخم مایه-زنی شدند. ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی نمونه برداری بافت محل مایه‌زنی انجام شد و به سرعت تحت شوک سرمایی قرار گرفت. متابولیت‌ها با حلال متانول استخراج و به کمک دستگاه GC-MS شناسایی و اندازه‌گیری شده و مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تعداد ۷۰ متابولیت نسبت به شاهد خود تغییرات معنی‌داری ($P \leq 0.05$) نشان دادند که منجر به تغییرات در ۲۸ مسیر متابولیکی در سلول‌های گیاه بود. در این برهمکنش تعدادی مسیر از مسیرهای متابولیکی دخیل در تقویت دیواره سلولی، تولید ترکیبات فنولی، آلکالوئیدی، تریپنوئیدی، تولید انرژی، تولید هورمون و انتقال سیگنال تضعیف گردید. همچنین فراوانی تعداد زیادی از قندها کاهش یافت که این موضوع نقش حیاتی این کربوهیدرات‌ها را در بیماری‌زایی *P. lingam* در برهم کنش سازگار با یک رقم حساس پیشنهاد می‌کند.

کلیدواژه: مکانیسم‌های بیماری‌زایی، رقم حساس، مسیرهای متابولیکی

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zarghani@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار، بخش گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران..

Effect of fungal pathogen *Leptosphaeria maculans* at biotrophic stage on canola metabolic profile cultivar Hyola 401 in a compatible interaction

Z. Amjadi and H. Hamzehzarghani^{1*}

(Received: 24.4.2019; Accepted: 22.6.2019)

Abstract

Recent improvements in instrumentation and data mining have made it possible to investigate the effects of various stressors on primary and secondary metabolisms. In this study, in order to study mechanisms of pathogenesis and identify the pathogenesis-related metabolic pathways, changes in metabolic profiles resulting from a compatible interaction between canola cultivar (Hyola 401) and *Leptosphaeria maculans* (anamorph *Phoma lingam*) (Phkv102 isolate) were investigated by GC-MS chromatography using the polar fraction of plant extract. Under completely controlled conditions, 14 days after planting, when cotyledons were completely unfolded, the plants were inoculated by 10^7 spores per ml suspensions and water (control) by drop-wound method, respectively. The tissue samples were taken 48 hours after inoculation and were shock frozen immediately. Metabolites were extracted using methanol as solvent, identified and quantified with GC-MS and subjected to statistical analyses. Results indicated that 70 metabolites showed significant difference over their controls at $P \leq 0.05$, which is caused by changes in 28 metabolic pathways. Infection of canola cultivar Hyola 401 to *P. lingam* resulted in change in pathways related to the host cell wall, phenolic compounds, alkaloids and terpenoids biosynthesis, energy generator, hormone biosynthesis, signal transduction. The abundance of a number of sugars was also decreased, suggesting the crucial role of these carbohydrates in pathogenesis in an incompatible interaction of *P. lingam* and a susceptible cultivar.

Keywords: Pathogenesis mechanisms, Susceptible cultivar, Metabolic pathways

*Corresponding author's E-mail: zarghani@shirazu.ac.ir

1. Ph.D. candidate of plant pathology and Associate Professor of plant pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, shiraz, Iran.

مقدمه

و باعث ایجاد شانکر شود. شانکر نخست به رنگ سفید خاکستری است که بعداً با تشکیل پیکنیدها به رنگ سیاه در می‌آید. عامل بیماری به گل آذین گیاه نیز حمله می‌کند. آلودگی گل آذین سبب سوختگی در گل‌ها می‌شود. غلاف‌ها نیز ممکن است آلوده شوند. در صورت آلودگی شدید غلاف‌ها، دانه‌ها نیز آلوده می‌شوند. در این صورت دانه چروکیده و ممکن است جوانه نزنند (Howlett et al. 2001).

پیشرفت‌های اخیر در روش‌های آمیکس شامل واکاوی بیان ژن، کمیت‌سنجی پروتئین و متابولیت، امکانات جدیدی را برای فهم پیچیدگی‌های برهم کنش بیمارگر-گیاه فراهم می‌کند و بنابراین منجر به درک بهتری از سازوکارهای فیزیولوژیکی در پاسخ‌های عمومی و اختصاصی گیاه در برابر بیمارگرها می‌شود. امروزه ابزارهای مختلف آمیکس برای درک چگونگی پاسخ به تنش‌های زیستی بکار رفته است. به این منظور، ژنومیکس و ترنسکریپتومیکس به علت در دسترس بودن اخیر داده توالی توان زیاد تولید شده از جمله خانواده شب بویان توسعه یافته است، اما سایر شاخه‌های آمیکس مثل پروتئومیکس و متابولومیکس از این نظر هنوز عقب مانده است. علاوه بر این، تلفیق اطلاعات مقیاس-آمیکس برای پاسخ به سؤالات پیچیده فیزیولوژیکی و ژنومیکی هنوز یک چالش است. متابولومیکس شناسایی نسبتاً سریع و توان بالایی از تغییرات در دامنه وسیعی از متابولیت‌ها را ممکن می‌سازد که منجر به واکاوی عمیقی از متابولم کل فرایندهای زیستی می‌شود. بررسی جزئیات بیشتر پاسخ گیاهان خانواده شب بویان تحت حمله بیمارگر با استفاده از واکاوی متابولومیکس به شناسایی مسیرهای متابولیکی کمک می‌کند که در روشن‌سازی سازوکارهای دفاعی موثر است (Fransisco et al. 2016, López-Gresa et al. 2013).

در طول دهه‌های گذشته، بیماری ساق سیاه کلزا یا شانکر ساقه فوما با عامل *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. & De Not. *Phoma* (فرم غیرجنسی *lingam*) یکی از عوامل محدود کننده تولید کلزا (*Brassica napus* L.) در سراسر جهان بوده است. این بیماری سالانه باعث خسارت محصول تا بیش از ۹۰۰ میلیون دلار در اروپا، شمال آمریکا و استرالیا می‌شود (Raman et al. 2013). در ایران تاکنون از استان‌های مازندران، گیلان، گلستان، اردبیل، قزوین و خوزستان گزارش شده است ولی از میزان خسارت آن‌ها اطلاعی در دست نیست (Afshariyazad et al. 2007).

تمام بخش‌های هوایی و زیرزمینی گیاهان حساس می‌توانند توسط این بیمارگر قارچی کلونیزه شوند. این بیماری می‌تواند سبب خسارت‌های شدید به تیپ‌های بهاره و پاییزه کلزا شود. قارچ عامل ساق سیاه در طبیعت به صورت چندچرخه‌ای است و دارای مرحله جنسی (آسکوسپور) و غیرجنسی (پیکنیدیوسپور) است. منبع اصلی آلودگی اولیه آسکوسپورها هستند که با بارندگی از سودوتیسیوم‌های تشکیل شده روی بقایای گیاهی در پاییز و بهار رها شده و از طریق روزنه یا زخم وارد گیاه می‌شوند. بلافاصله پس از آلودگی زخم‌های خاکستری رنگ و پیکنیدیوم‌های سیاه رنگ روی برگ‌های لپه‌ای و برگ‌های جوان تشکیل می‌شود. در طول فصل رشد، پیکنیدیوم‌ها تولید پیکنیدیوسپور می‌کنند که به عنوان مایه‌ی ثانویه عمل می‌کنند و توسط قطرات باران به دیگر برگ‌ها یا گیاهان مجاور پراکنده می‌شوند. آلودگی برگ‌ها با یک مرحله کلینیزاسیون سیستمیک دمبرگ دنبال می‌شود و ممکن است بیمارگر به ساقه رسیده، سلول‌های کورتکس ساقه را کشته

(malate)، فلاونوئیدها (kaempferol و quercetin) و فوماریک اسید بیش تری نسبت به گیاهان آلوده شده با دو بیمارگر دیگر نشان دادند.

استفاده از گیاهان تراریخت برای کاهش ترکیبات anti-nutritive منجر به کشف اهمیت متابولیت‌های دیگر در پاسخ به بیماری شد. در این زمینه، هانگ و همکاران (Haug et al. 2009) *A. thaliana* را برای کاهش ترکیبات sinapine تراریخت کردند. تراریخت کردن منجر به تغییر در مشتقات salicylic acid, quercetin, sinapoyl و indolyl glucosinolates شد. گیاهان تراریخت به آلودگی قارچ حساس بودند و مشخص شد که این متابولیت‌ها نقش مهمی در دفاع گیاهان خانواده شب بویان دارند.

همان طور که معلوم است مطالعات کمی برای ارزیابی نقش متابولوم در مکانیسم دفاعی یا بیماریزایی در برابر بیمارگرهای خانواده شب بویان مخصوصاً کلزا انجام شده است. از داده‌های واکاوی شده واضح است که ترکیبات فنیل پروپانوییدی در دفاع گیاه نسبت به چندین بیماری نقش دارند. با وجودیکه تغییرات می‌تواند در صدها متابولیت رخ دهد، پاسخ برای گیاه و بیمارگر اختصاصی است. متابولومیکس جدیدترین رشته آمیکس است و زمینه‌ی گسترده‌ای برای گسترش دارد. یکی از نقاط کلیدی، ایجاد و توسعه پایگاه داده‌های ترکیبات با اطلاعات طیف‌سنج جرمی و طیف‌سنج جرمی-طیف‌سنج جرمی برای شناسایی زیست‌نشانگرهای متابولیتی و مسیرهای مرتبط است.

نتایج بدست آمده از چندین پژوهش نشان می‌دهد که ارقام بهاره کلزا در مقایسه با ارقام پاییزه نسبت به بیماری ساق سیاه کلزا حساس تر می‌باشند. یکی از ارقام بهاره متداول کشت شده در نواحی مختلف ایران، رقم هایولا

(2012, Raman et al. 2013).

علی‌رغم تنوع گسترده متابولیت‌های موجود، تاکنون تعداد کمی از آن‌ها در برهمکنش‌های گونه‌های متعلق به خانواده شب بویان آلوده با قارچ بررسی شده است. اغلب مطالعات روی گروه هدف خاصی از ترکیبات مثل گلیکوسینولات‌ها، فنیل پروپانوییدها و تعداد کمی از فیتوآلکسین‌ها متمرکز شده‌اند.

پدراس و همکاران (Pedras et al. 2008) محتوای فیتوالکسین‌هایی (rutalexin و آنتی‌سیپینی (indolyl-3-acetonitrile), spiobrassinin, cyclobrassinin) و rutalexin (4-methoxyglucobrassicin و caulilexin C, arvelexin) برگ‌های دو گونه *B. rapa* و *B. napus* در پاسخ به دو تنش زیستی و غیرزیستی (مایه‌زنی شده با نژادهای مختلف قارچ زیوپرور *Albugo candida* یا افشانه شده با $CuCl_2$) با LC-MS مشخص کردند. تعداد زیادی از متابولیت‌های بخش قطبی از برگ‌های آلوده از جمله دو فلاونوئید جدید و شش فنیل پروپانویید جدید جداسازی شدند. با توجه به تغییرات مشاهده شده در دفاع شیمیایی در طول آلودگی، پیشنهاد گردید که *B. rapa* پاسخ‌های مشابهی به نژاد پرآزار و ناپرآزار *A. candida* داشتند.

عابد-فرید و همکاران (Abed-Farid et al. 2009) القا متابولیت‌ها در *B. rapa* تحت آلودگی چند بیمارگر قارچی (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *L. maculans*) بررسی کردند. نتایج بدست آمده از 1H NMR یا Proton Nuclear Magnetic Resonance) تغییرات در سطح فنول‌ها، فنیل پروپانوییدها و گلیکوسینولات‌ها در گیاه را مرتبط با آلودگی قارچی نشان داد. با این وجود پاسخ متابولیکی برای هر گونه قارچ متفاوت بود. گیاهان آلوده شده با *F. oxysporum* فنیل-پروپانوییدها (feruloyl, sinapoyl- و 5-hydroxyferuloyl

(پیت:خاک=۳:۱) استفاده شد. سطح خاک در همه گلدان‌ها یکسان از طریق زیر گلدانی به گلدان‌ها آب داده شد و زمانی که سطح خاک تر شد، با پنس استریل تعداد ۱۰ عدد از بذره‌های جوانه زده در فواصل منظم در گلدان کشت شد و نهایتاً بر روی آن‌ها تا یک سانتی متر خاک نرم ریخته شد و با آب‌فشان سطح آن مرطوب گردید. گلدان‌ها در گلخانه با میانگین دمای ۳۰ درجه در زیر توری سفید قرار داده شدند. تقریباً ۷ روز پس از کشت گیاهان به مرحله دو لپه-ای رسیدند. اما به دلیل نیاز به بافت بیش‌تر و فرصت برای بزرگ شدن لپه‌ها، برگ‌های حقیقی اول و دوم قطع شد. ۱۲ روز پس از کشت گلدان‌ها به ژرمیناتور با ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۸۰۰۰ لوکس منتقل شدند.

تهیه مایه تلقیح برای مایه‌زنی

در این پژوهش از جدایه گرگان (ارسالی توسط آقای دکتر راهنما از دانشگاه گرگان) استفاده شد. برای تهیه مایه تلقیح برای مایه‌زنی از کشت‌های ۱۴ روزه قارچ روی محیط عصاره‌ی هشت سبزی آگار (۲۰۰cc عصاره هشت سبزی، ۸۰۰cc آب مقطر، ۲۰g آگار و ۰/۳g بی‌کربنات کلسیم) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین (۱۰۰ قسمت در میلیون) و ریفامپین (۲۰۰ قسمت در میلیون) که در انکوباتور با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس، ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و شدت نوری ۳۰۰ لوکس (۷ وات) (نور فلئورسنت) قرار داده شده بودند، استفاده شد. سپس پنج تکه ۱۰ میلی‌متری از بخش فعال قارچ دارای پیکنیدیوم از محیط کشت بریده و به یک لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل شد. لوله آزمایش به خوبی تکان داده شد تا سوسپانسیون

۴۰۱ می‌باشد. این رقم با وجود ویژگی‌های خوب از جمله مقاومت به خوابیدگی و رسیدگی یکنواخت با عملکرد دانه بیش از ۳ تن در هکتار، از حساس‌ترین ارقام نسبت به بیماری ساق سیاه می‌باشد. حدادی و همکاران (Haddadi et al. 2016) برای بینش عمیق‌تری از سازوکارهای بیماریزایی *L. maculans* و پاسخ‌های دفاعی *B. napus* بیان ژن‌ها را در رقم حساس Topaz DH16516 در فواصل زمانی دو روزه (۸-۰) بررسی کردند. افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سالسیلیک اسید (SA) (۲ و ۴ روز پس از مایه-زنی) و جاسمونیک اسید (JA) (۶ و ۸ روز پس از مایه-زنی) به ترتیب شواهدی را برای مراحل زندگی زیواپور و مرده‌پرور *L. maculans* در طول آلودگی لپه‌ها فراهم کرد. با توجه به اینکه قارچ تا ۴ روز پس از مایه‌زنی در مرحله زیواپور می‌باشد، مطالعه حاضر، با هدف بررسی پروفیل متابولیکی بخش قطبی حاصل از برهمکنش قارچ *L. maculans* (جدایه گرگان) در مرحله زیواپور و کلزا رقم حساس هایولا ۴۰۱ به کمک دستگاه GC-MS نسبت به شاهد به منظور شناسایی متابولیت‌ها و مسیرهای درگیر در مکانیسم‌های بیماریزایی انجام شد.

مواد و روش‌های بررسی

پرورش گیاه

در این پژوهش از بذور کلزا رقم هایولا ۴۰۱ استفاده شد. به منظور رشد یکنواخت گیاهان، ابتدا بذور با وایتکس ۱۰٪ به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل بخوبی شسته شدند. تعداد مشخصی بذور (۲۵) با پنس استریل در زیر هود به تشتک پتری حاوی کاغذ صافی سترون مرطوب شده با آب مقطر سترون منتقل و در تاریکی مطلق در دمای محیط قرار داده شدند. جهت کشت از گلدان‌های ۹ سانتی‌متری حاوی خاک سترون

علائم تا ۱۴ روز پس مایه زنی در بازه های سه روزه بررسی شد.

استخراج متابولیت ها

عملیات استخراج متابولیت های نمونه ها، به روش فین و همکاران (Fiehn et al. 2000) انجام شد. جهت استخراج متابولیت های هر نمونه گیاهی، به ۳۰۰ میلی گرم بافت تازه پودر شده با ازت مایع، ۱/۴ میلی لیتر متانول خالص (100 % MeOH) اضافه گردید و مخلوط حاصله به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر ربیتول (2 mg ml^{-1})، ۵۰ میکرو لیتر Nonadecanoic acid methyl ester (mg) CHCl_3 (2 ml^{-1}) و ۳۰۰ میکرو لیتر آب دوبار تقطیر شده به مخلوط اضافه شده و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد برای ۱۵ دقیقه تکان داده شدند و در ۱۲۵۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. ترکیب متانول با یک شوک حرارتی بالا (دمای ۷۰ درجه سانتی گراد) که در بالا ذکر شد، به عنوان غیر فعال کننده ی اغلب آنزیم ها شناخته شده است و پیش نیاز لازم برای جلوگیری از تغییرات در ترکیب متابولیت ها در اثر فعالیت های آنزیمی است (Roessner et al. 2000). پس از سانتریفیوژ، رانشین در قسمت بالای لوله ی اپندورف و قطعات گیاهی به صورت رسوب در ته لوله قرار گرفت. رانشین با استفاده از میکرو پیپت برداشته شده و با عبور از میکروفیلترهای Ultra-free-CI که دارای منافذی به قطر ۰/۲۲ میکرو متر به لوله ی اپندورف دیگری منتقل شدند و در ۴۰۰۰ rpm به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب ۷۵۰ میکرو لیتر کلروفرم (CHCl_3) اضافه کرده و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. سپس در ۱۲۵۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از این مرحله رانشین را برداشته و به همان لوله ی اپندورفی که بخش قطبی حاصل از سانتریفیوژ اول

یکنواختی ایجاد شود. سوسپانسیون به دست آمده از ۸ لایه پارچه تنظیف سترون عبور داده شد و سپس با سمپلر به میکروتیوپ های ۱/۵ میلی لیتری منتقل گردید. میکروتیوپ ها در سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. محلول روی رسوب حاصله را خارج کرده و پس از اضافه کردن آب مقطر سترون تا حجم یک میلی لیتر به آن، سوسپانسیون اسپور تکان داده شد. غلظت سوسپانسیون اسپور با هموسیتومتر تخمین زده شد. غلظت سوسپانسیون 1×10^7 اسپور بر یک میلی لیتر تنظیم شد (Mengistu et al. 1991).

مایه زنی گیاهان

با دستکش سترون و توسط یک سوزن انسولین استریل دو زخم کوچک مقابل هم بر لب هر لپه گیاهان ۱۴ روزه ایجاد شد. سپس با سمپلر ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون به غلظت 1×10^7 اسپور در میلی لیتر در محل زخم مایه زنی شد. جهت کنترل مثبت از زخم به همراه ۱۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل دوبار تقطیر شده استفاده شد. گلدان ها در ژرمیناتور با ۱۶ ساعت روشنایی با دمای ۲۱ درجه سانتی گراد و ۸ ساعت تاریکی با دمای ۱۶ درجه سانتی گراد و شدت نوری ۸۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. هر تیمار شامل سه تکرار بیولوژیکی و هر تکرار شامل ۱۰ گیاه بود. ۴۸ ساعت پس از مایه زنی به طور تصادفی ۳۰۰ میلی گرم از بافت های لپه ای که تقریباً شامل ۳ گیاه کامل بود از تکرار های هر تیمار جداگانه در اپندورف های دو میلی لیتری جهت استخراج متابولیت ها جمع آوری شد و به سرعت سرد خشک شد (Bekker et al. 2017). پس از نمونه برداری از بافت های لپه ای تعدادی از گیاهان برای هر تیمار برای ارزیابی علائم در همین شرایط رشدی نگهداری شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته می شود.

(No. 190915.433, USA) واقع در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شیراز 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 هلیوم 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 درجه سانتی‌گراد به دمای آن اضافه و پس از رسیدن به دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، سه 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 آزمایشگاه مرکزی دانشگاه شیراز ارزیابی شد. در این ارزیابی کتابخانه Wiley1.265، برنامه جست‌وجو بر مبنای طیف جرمی، برای شناسایی ترکیبات به‌کار 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 ۲d، 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.

ریخته شده بود، اضافه گردید. سپس ۱/۴ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه کرده و به خوبی تکان داده شد و در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از این مرحله مخلوط به فاز رویی یا فاز قطبی شامل ۲/۸ میلی-لیتر و فاز زیرین یا فاز غیر قطبی شامل ۸۰۰ 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 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 همیلتون به ورودی دستگاه GC-MS مدل Hewlett-Packard 6890

نتایج

۷ روز پس از آلوده سازی اولین علائم روی لپه‌ها قابل مشاهده بود که شامل تشکیل بافت‌های سبز-خاکستری بدون حاشیه تیره به همراه زردی شدید برگ‌ها بود. همچنین ۱۰ روز پس از مایه‌زنی اولین پیکنیدها قابل مشاهده بودند و تا قبل از ۱۴ روز لپه‌ها شروع به ریزش کردند (Fernando et al. 2016, Williams 1985).

هر کروماتوگرام تقریباً شامل بیش از ۱۰۰ پیک بود. اطلاعات بدست آمده از شناسایی پیک‌های هر کروماتوگرام حاصل از GC-MS پس از عمل پیش‌پردازش روی کروماتوگرام‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. در کل ۷۰ متابولیت شناسایی شد که ۶۱ از آن‌ها در بین تمام تیمارها مشترک بودند و به عنوان متابولیت‌های کمی در نظر گرفته شد. نتایج آزمون T-test با نرم‌افزار SAS نشان داد که در سطح $P \leq 0.05$ ، ۶۱ متابولیت کمی معنی‌دار بودند. ۹ ترکیب شامل Citric acid، beta-DL-Arabinopyranose، 2-Deoxy-galactopyranose، Heptacosane، Tetracosane، MST9 و Nonacosane به عنوان متابولیت‌های شناسایی شدند. اطلاعاتی همچون گروه شیمیایی و میانگین فراوانی هر سه تکرار برای هر متابولیت شناسایی شده در جدول ۱ نشان داده شده است. این متابولیت‌ها از گروه‌های شیمیایی مختلف شامل ۱۹ قند، ۱۹ اسید آلی، ۴ اسید آمینه، ۶ اسید چرب، ۳ گلیکوزید، ۲ آمین، ۸ آلکان و ۹ ترکیب با گروه نامشخص می‌باشد (جدول ۱).

برای شناسایی نقش و اهمیت هر متابولیت در بیماریزائی، بار عاملی (Factor-loading) آن متابولیت روی

زمانی که هیچ شباهت مناسب در جست‌وجو NIST برای طیف جرمی از یک پیک پیدا نشود، پیک به عنوان ناشناخته، در نظر گرفته می‌شود و به عنوان برچسب طیف جرمی (Mass Spectral Tag=MST) ثبت می‌گردد. MST یک طیف جرمی با الگوی تکه تکه شدن با ثبات روی اسکن‌ها و در میان تکرارها تعریف می‌شود. یک MST می‌تواند جزء واقعی از یک نمونه، صرف نظر از هویت شیمیایی آن در نظر گرفته شود (Kopka et al. 2005).

واکاوای‌های آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح کاملاً تصافی در سه تکرار انجام شد. مقایسه میانگین داده‌های کمی با آزمون T-Test در نرم‌افزار SAS انجام شد. برای شناخت عوامل پنهان موثر بر تغییرات متابولیت‌ها در گیاهان مایه-زنی شده نسبت به شاهد تجزیه عامل‌ها (proc factor) نرم افزار SAS روی داده‌ها اجرا گردید و تیمارها و شاهد‌ها بر اساس نمره عامل (factor score) در صفحه مختصات متشکل از دو فاکتور اول که بخش اصلی تغییرات در داده‌ها را نمایندگی می‌کردند رسم گردید. برای تعیین اهمیت متابولیت‌ها در بیماریزائی از بار هر متابولیت بر عامل که به آن بار عاملی (factor loading) گفته می‌شود استفاده گردید، بدین طریق که متابولیت‌های با بار بزرگتر اهمیت و مشارکت بیشتری در بیماریزائی داشتند.

شناسایی مسیر

بر اساس ترکیبات معنی‌دار شناسایی، مسیرهای درگیر در پاتوسیستم کلزا- *L. maculans* با نرم افزار متابوآنالیست R (MetaboanalystR) نسخه ۳ (سال ۲۰۱۸) بر مبنای مقایسه متابولیت‌های معنی‌دار با کتابخانه *Arabidopsis thaliana* صورت گرفت (Chong et al. 2018).

جدول ۱. لیست متابولیت‌های کلزا رقم Hyola 401 که مقدار آن‌ها به علت آلودگی به *Phoma lingam* تغییر یافته بود.

Table 1. The list of canola metabolites of Hyola 401 cultivar, which had been altered due to infection with *Phoma lingam*.

Number	Metabolite Name	SW	SP	Group
1	Phosphoric acid	0.128375	0.079472	OA
2	Butyric acid	0.045668	0.03537	FA
3	Propionic acid	0.188777	0.094255	FA
4	L-Threonine	0.167842	0.081788	AA
5	Pentasiloxane	0.245302	0.213701	AM
6	Trimethylsilyl ether of glycerol	0.880066	0.903628	FA
7	Malonic acid	0.070281	0.031499	OA
8	Succinic acid	0.672451	0.29267	OA
9	Trisiloxane	0.098998	0.102257	AM
10	Propanoic acid	0.790313	1.005531	OA
11	Maleic acid	0.0953	0.056178	OA
12	Glycine	0.157235	0.05269	AA
13	Malic acid	3.409348	3.373466	OA
14	Citric acid	0	0.029392	OA
15	L-Proline	0.13613	0.064603	AA
16	Trihydroxybutyric acid	0.08942	0.162859	OA
17	Glutaric acid	0.063213	0.088677	OA
18	MST1	0.08789	0.160501	-
19	Ribitol	1	1	SU
20	MST2	0.083662	0.186532	-
21	Pentonic acid	0.117398	0.081304	OA
22	L-Tyrosine	0.438495	0.229224	AA
23	Ribonic acid	0.059268	0.088458	OA
24	MST3	0.048921	0.088679	-
25	Valeric acid	1.142827	0.542898	FA
26	MST4	0.105609	0.204619	-
27	But-2-enoic acid	0.120016	0.056004	OA
28	MST5	0.06958	0.145778	-
29	Propanedioic acid	0.209992	0.141144	OA
30	Pentaric acid	0.19621	0.414908	OA
31	benzoic acid	3.098229	2.568861	OA
32	Butylethylmalonic acid	0.388906	0.547822	OA
33	MST6	0.111622	0.226481	-
34	D-Xylitol	0.112859	0.058837	SU
35	Nonadecane	0.111179	0.12231	AC
36	D-Fructose	6.714961	4.352221	SU
37	MST7	0.333461	0.311211	-
38	D-Ribose	0.454129	0.282597	SU
39	d-Galactose	1.60261	0.904842	SU
40	d-Glucose	11.97589	6.552734	SU
41	d-Mannose	4.164945	2.580064	SU
42	N-Acetylglucosamine methoxime,	0.073995	0.179084	SU
43	MST8	0.083224	0.04403	-
44	Glucopyranose	0.151497	0.217623	SU
45	beta.-DL-Arabinopyranose	0	0.059505	SU
46	alpha.-D-Galactopyranose	0.405745	0.222323	SU
47	Galactonic acid	0.126212	0.090619	OA
48	D-Gluconic acid	0.180544	0.088222	OA
49	Palmitic acid	0.276616	0.25627	FA
50	beta.-l-Galactopyranoside	0.218803	0.374403	GL

جدول ۱. ادامه

Table 1. Continued

Number	Metabolite Name	SW	SP	Group
51	alpha.-D-Mannopyranose	0.09681	0.065733	SU
52	Myo-Inositol	1.749342	1.304637	SU
53	D-Mannitol	0.124148	0.15825	SU
54	Talose	0.097618	0.131062	SU
55	Stearic acid	1.976385	0.217658	FA
56	alpha.-d-galactopyranoside	0.517497	0.254721	GL
57	Gulonic acid	0.109195	0.149897	OA
58	Glucopyranose	0.08752	0.066544	SU
59	MST9	0	0.025119	-
60	alpha.-D-Glucopyranoside	1.278218	3.819397	GL
61	D-Turanose	0.331689	0.182825	SU
62	2-Deoxy-galactopyranose	0	0.065015	SU
63	n-Pentadecylcyclohexane	0.124717	0.054566	AC
64	Melibiose	0.462846	0.194289	SU
65	Heptadecane	2.621789	0	AC
66	Tetracosane	0.082695	0	AC
67	Eicosane	3.106179	0.024223	AC
68	Pentacosane	0.128363	0	AC
69	Heptacosane	0.070802	0	AC
70	Nonacosane	1.234258	0	AC

OA=اسید آلی، SU=فند، AA=اسید آمینه، FA=اسید چرب، AC=آلکان، GL=گلیکوزید، AM=آمین SW=رقم حساس مایه زنی با آب میانگین ۳ تکرار، SP=رقم حساس مایه زنی شده با بیمارگر میانگین ۳ تکرار

OA=Organic Acid, SU= Sugar, AA=Amino Acid, FA= Fatty Acid, AK= Alkane, GL= Glycoside, AM=Amine SW= Susceptile inoculated with Water-mean of 3 replicates, SP= Susceptile inoculated with Pathogen-mean of 3 replicates

تصویر تقریباً کاملی از مشاهدات در فضای دو بعدی متشکل از عامل پنهان اول و دوم (از نظر تشابه متابولوم دخیل در بیماریزائی) را نشان می دهد. بار عاملی برای ۷۰ متابولیت برای دو فاکتور یا عامل پنهان اول در جدول ۲ نشان داده شده است. ۴۳ متابولیت برای فاکتور یا عامل پنهان اول و ۵۰ متابولیت برای فاکتور یا عامل پنهان دوم بار عاملی مثبت داشتند (جدول ۲). D- Pentonic acid, alpha.-d-Galactose, alpha.-d-galactopyranoside, Turanose, D- Propanedioic acid, alpha.-D-Galactopyranose, D-Fructose و d-Glucose, But-2-enoic acid, Xylitol به ترتیب بیشترین بار عاملی را برای فاکتور یا عامل پنهان اول داشتند (جدول ۲). Butyric acid, Pentasiloxane, Trisiloxane, Malic acid, Phosphoric acid

فاکتور یا عامل پنهان مورد توجه قرار گرفت. نمره عاملی (Factor score) موقعیت مکانی تیمارها را نسبت به یکدیگر نشان می دهد. مقدار بار عاملی آن بین ۱ تا -۱ است و هرچه مقدار بار عاملی یک متابولیت به یک نزدیک تر باشد به معنی آن است که این متابولیت نقش مهمتری در نمره عاملی حاصله برای یک نمونه مشخص (مشاهده) دارد (جدول ۲). الگوی نزدیکی نمونه ها در فضای دو بعدی در شکل ۱ نشان داده شده است. هر محور معرف یک عامل پنهان و ترکیبی خطی از ۷۰ متابولیت است. دو عامل پنهان اول بیش از ۹۹ درصد از تغییرات موجود در همه متابولیت ها را در خود دارند و به این ترتیب تفاوت بین تیمارها را توضیح می دهند و لذا تصویر گروه بندی مشاهدات تیمارها در نمودار شکل ۱ محورهای اول و دوم

جدول ۲. بار عاملی (load) ۷۰ متابولیت‌های معنی‌دار حاصل از تجزیه T-test شناسایی شده از بخش قطبی در پاتوسیستم کلزا- *Phoma lingam* ۴۸ ساعت پس مایه‌زنی با آب و بیمارگر برای فاکتور ۱ و ۲

Table 2. Factor loading of 70 significant metabolites based on T-test from polar fraction in canola- *Phoma lingam* pathosystem inoculated with sterilized distilled water and pathogen 48 h after inoculation for factor 1 and factor 2.

Metabolite Number	Name	Factor1	Factor2	Metabolite Number	Name	Factor1	Factor2
M21	Pentonic acid	0.93	0.05	M25	Valeric acid	0.45	0.05
M61	D-Turanose	0.91	0.37	M1	Phosphoric acid	0.41	0.90
M56	alpha.-d-galactopyranoside	0.90	0.34	M5	Pentasiloxane	0.23	0.97
M39	d-Galactose	0.90	0.15	M31	benzoic acid	0.21	0.72
M46	alpha.-D-Galactopyranose	0.89	0.45	M37	MST7	0.21	0.05
M29	Propanedioic acid	0.87	-0.27	M2	Butyric acid	0.20	0.92
M34	D-Xylitol	0.86	0.34	M33	MST6	0.19	-0.12
M27	But-2-enoic acid	0.85	-0.02	M6	Trimethylsilyl ether of glycerol	0.05	0.70
M40	d-Glucose	0.84	0.39	M49	Palmitic acid	0.00	0.29
M36	D-Fructose	0.82	0.49	M9	Trisiloxane	-0.07	0.81
M43	MST8	0.81	0.52	M53	D-Mannitol	-0.10	0.79
M38	D-Ribose	0.79	0.44	M13	Malic acid	-0.16	0.89
M69	Heptacosane	0.79	0.47	M10	Propanoic acid	-0.18	0.73
M70	Nonacosane	0.79	0.47	M26	MST4	-0.29	-0.13
M65	Heptadecane	0.79	0.47	M20	MST2	-0.38	-0.27
M66	Tetracosane	0.79	0.47	M28	MST5	-0.38	-0.07
M68	Pentacosane	0.79	0.47	M54	Talose	-0.47	0.44
M67	Eicosane	0.79	0.47	M35	Nonadecane	-0.48	-0.21
M47	Galactonic acid	0.78	0.25	M44	Glucopyranose	-0.54	-0.38
M55	Stearic acid	0.77	0.48	M18	MST1	-0.61	0.15
M12	Glycine	0.77	0.38	M57	Gulonic acid	-0.65	-0.63
M64	Melibiose	0.72	0.49	M41	N-Acetyl glucosamine methoxime	-0.68	-0.24
M51	.alpha.-D-Mannopyranose	0.71	0.45	M60	alpha.-D-Glucopyranoside	-0.68	-0.12
M15	L-Proline	0.70	0.45	M32	Butylethylmalonic acid	-0.69	-0.12
M63	n-Pentadecylcyclohexane	0.70	0.66	M16	2,3,4-Trihydroxybutyric acid	-0.71	0.03
M48	D-Gluconic acid	0.68	-0.23	M23	MST3	-0.76	-0.36
M41	d-Mannose	0.65	0.39	M59	MST9	-0.78	-0.05
M4	L-Threonine	0.65	0.57	M50	beta.-l-Galactopyranoside	-0.78	0.08
M58	Glucopyranose	0.65	0.33	M45	beta.-DL-Arabinopyranose	-0.82	-0.05
M52	Myo-Inosito	0.62	0.60	M23	Ribonic acid	-0.83	0.01
M11	Maleic acid	0.62	0.75	M30	Pentanic acid	-0.88	-0.17
M7	Malonic acid	0.62	0.73	M62	2-Deoxy-galactopyranose	-0.90	-0.07
M22	L-Tyrosine	0.60	0.08	M14	Citric acid	-0.94	-0.03
M3	Propanoic acid	0.57	0.79	M17	Glutaric acid	-0.98	0.02
M8	Succinic acid	0.52	0.78				

این آنالیز ۳۰ عدد از ترکیبات شناسایی شده در ۲۸ مسیر شناسایی شده قرار گرفتند. مسیرهای تغییر یافته شامل ۲۶ مسیر تضعیف شده و ۲ مسیر تقویت شده بودند. لازم به ذکر است که این نرم‌افزار شامل ۱۵ کتابخانه و در کل ۱۱۳۷ مسیر از موجودات مختلف از جمله *Oryza sativa* و *Arabidopsis thaliana japonica* (Japanese rice) (thale cress) می‌باشد. در اینجا مقایسه مسیرها با پایگاه

Maleic, Succinic acid, D-Mannitol, Propanoic acid و Propanoic acid به ترتیب بیش‌ترین بار عاملی را برای فاکتور یا عامل پنهان دوم داشتند (جدول ۲).
نتایج تجزیه مسیرهای مرتبط با بیمارزایی بر اساس نام شیمیایی متابولیت‌های معنی‌دار با نرم‌افزار متابوآنالیز R نسخه ۳ (MetPA) منجر به شناسایی ۲۸ مسیر در برهمکنش کلزا- *P. lingam* گردید (جدول ۳). براساس

جدول ۳. ارتباط مسیرهای شناسایی شده با متابوآنالیز R در پاتوسیستم کلزا-*Phoma lingam* با متابولیت‌های تغییر کرده در جدول ۱: کاهش تولید، ↑: افزایش تولید

Table 3. The interrelated of pathways detected in canola- *Phoma lingam* pathosystem with MetaboAnalystR that have changed with metabolites in Table 1 ↓: Reduced production, ↑: Increased production

نام مسیر Pathway Name	تغییرات ایجاد شده Accrued Changes
Propanoate metabolism	Succinic acid (↓) Propionic acid (↓)
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism Citrate cycle (TCA cycle)	Citric acid(↓) Succinic acid (↓)
Pentose phosphate pathway	D-Ribose (↓) Gluconic acid (↓)
Tyrosine metabolism	L-Tyrosine (↓) Succinic acid (↓)
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	Glycine (↓) L-Threonine (↓) L-Tyrosine (↓) L-Proline (↓)
Starch and sucrose metabolism	D-Fructose (↓) D-Glucose (↓)
Chitinase biosynthesis	N-Acetyl glucosamine (↓)
Jasmonic acid biosynthesis	Stearic acid (↓) Palmitic acid (↓)
Ascorbic acid biosynthesis	L-galactonic acid (↓) D-Fructose (↓) Mannose (↓)
Hemicellulose biosynthesis	Myo-Inositol (↓) D-Glucose (↓) D-Galactose (↓)
Cellulose biosynthesis	D-Glucose (↓)
Glycine, serine and threonine metabolism	Glycine (↓) L-Threonine (↓)
Cyanoamino acid metabolism Methane metabolism Nitrogen metabolism Glutathione metabolism	Glycine (↓)
Fatty acid elongation in mitochondria Fatty acid metabolism	Palmitic acid (↓)
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	D-Mannose (↓) D-Fructose (↓)
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	Palmitic acid (↓) Stearic acid (↓)
Ascorbate and aldarate metabolism Inositol phosphate metabolism	Myoinositol (↓)

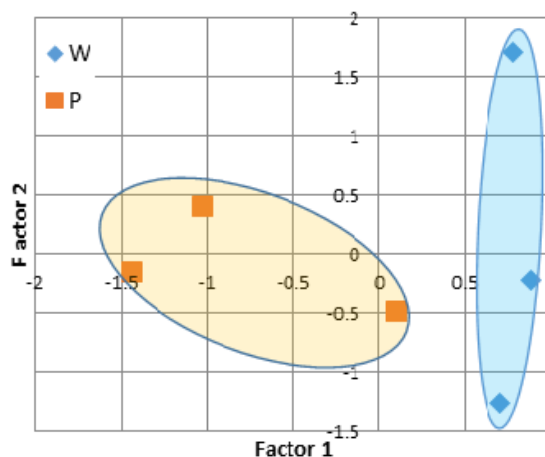
جدول ۳. ادامه

نام مسیر Pathway Name	تغییرات ایجاد شده Accrued Changes
Fructose and mannose metabolism	D-Mannose (↓)
Fatty acid biosynthesis	Stearic acid (↓) Palmitic acid (↓)
Alanine, aspartate and glutamate metabolism Butanoate metabolism	Succinic acid (↓)
Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis Isoquinoline alkaloid biosynthesis Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	L-Tyrosine (↓)
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	L-Threonine (↓)
proline metabolism	L-Proline (↓)

داده مسیرهای *A. thaliana* انجام شد. از ۲۸ مسیر شناسایی شده، مسیرهای Isoquinoline alkaloid biosynthesis, Glycine, serine and threonine biosynthesis, Inositol, Tyrosine metabolism, Citrate cycle (TCA cycle), phosphate metabolism, proline, Glyoxylate and dicarboxylate metabolism, Starch and Galactose metabolism, Glutathione metabolism و sucrose metabolism ترتیب دارای بیشترین اثر در برهمکنش کلزا-*P. lingam* بودند (شکل ۲).

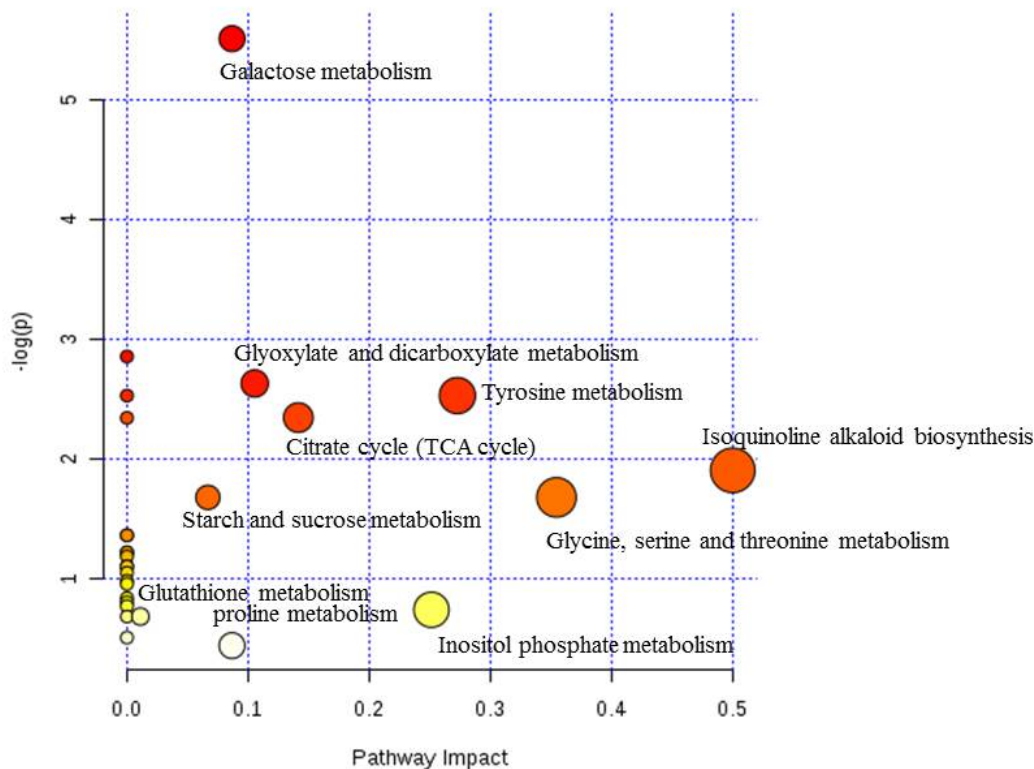
بحث

یکی از سریع‌ترین روش‌های بررسی ارقام کلزا از لحاظ مقاومت یا حساسیت به بیماری ساق سیاه، مایه‌زنی گیاهان در مرحله دو لپه‌ای تحت شرایط کاملاً کنترل شده از لحاظ دما، رطوبت و شدت نور است (Raman *et al.* 2013). جهت تعیین حساسیت یا مقاومت ارقام کلزا نسبت به بیماری ساق سیاه از مقیاس ۹-۰ استفاده می‌شود. گیاهانی که دارای علائم از جمله تولید پیکنید، عدم وجود حاشیه



شکل ۱. پراکنش نگار دو بعدی حاصل از *proc factor* نرم افزار SAS براساس فراوانی ۷۰ متابولیت معنی‌دار بدست آمده از تجزیه T-test، ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی در رقم حساس هایولا ۴۰۱ در مرحله دو لپه‌ای مایه‌زنی شده با بیمارگر (P) و تیمار شده با آب به روش قطره زخم (W).

Fig 1. Scatter plot based on projections first two Factor-vectors of *proc factor* SAS of abundance of 70 significant metabolites obtained from T-test analysis, 48 h after inoculation susceptible cultivar hayola 401 in two cotyledon stage with spores suspension (*Phoma lingam*) (P) and sterilized distilled water (W) using drop-wound method.



شکل ۲. آنالیز مسیر متابولومیکی با نرم افزار متابوآنالیست R در پاتوسیستم کلزا-*Phoma lingum*. تمام مسیرهای تطبیق یافته توسط دایره نشان داده شده است. رنگ و سایز هر دایره به ترتیب براساس P-value (رنگ های تیره تر نشان دهنده تغییرات معنی دار بیش تر در مسیرهای متناظر است) و میزان اثر مسیر است. مهم ترین مسیرها زیر نویسی شده است.

Fig 2. Metabolic pathway analysis (MetPA) in canola- *Phoma lingum* pathosystem with MetaboAnalystR software package. All the matched pathways are displayed as circles. The color and size of each circle are based on p-value (darker colors indicate more significant changes of metabolites in the corresponding pathway) and pathway impact value, respectively. The most impacted pathways are annotated.

زیادی با تاکید بر پاسخ گیاه میزبان و ساز و کارهای بیماریزایی و مقاومت صورت گرفته است. با این وجود، برهمکنش گیاه-بیمارگر به علت عملگرهای متعدد بیمارگر و رخدادهای پیام رسانی در گیاه که بیانگر حساسیت یا مقاومت میزبان می باشد، بسیار پیچیده است. این واقعیت به خوبی شناخته شده است که حمله بیمارگر سبب فعال شدن مکانسیم های دفاعی متنوعی در گیاه از جمله تولید ترکیبات مختلف ضد میکروبی می شود. گلیکوسینولات ها، فلاونوئیدها و همچنین پلی پپتیدهای غنی از سیستمین در

تاریک اطراف زخم، ریزش سریع بافت آلوده تا ۱۰ روز باشند (Koch *et al.* 1991, Mengistu *et al.* 1991) به عنوان میزبان حساس در نظر گرفته می شوند که این علایم به خوبی روی رقم هایولا ۴۰۱ قابل مشاهده بود. گیاهان خانواده شب بویان نسبت به آلودگی های ایجاد شده توسط قارچ ها، باکتری ها یا ویروس ها حساس هستند. این بیمارگرها به شدت روی تولید و کیفیت این گیاهان اثر گذاشته و منجر به خسارت اقتصادی در سطح جهانی می شوند. به این دلیل در طول دهه های گذشته، تحقیقات

Ubiquinone and other tryptophan biosynthesis Aminoacyl-tRNA و terpenoid-quinone biosynthesis biosynthesis از جمله مسیرهایی هستند که تحت تاثیر این اسید آمینه می‌باشند (جدول ۳). در مسیر Isoquinoline alkaloid biosynthesis ترکیباتی دفاعی تولید می‌شود که به علت سمیت گیاه را در برابر بیمارگرها محافظت می‌کند (Matsuura & Fett-Neto 2017).

Ubiquinone به عنوان انتقال دهنده الکترون در زنجیره انتقال الکترون در فتوسنتز و تنفس شناخته می‌شود. نقش مهمی در رشد و نمو گیاه از طریق شرکت در بیوسنتز و متابولیسم ترکیبات شیمیایی مهم دارند. به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کند و در پاسخ گیاه نسبت به تنش‌ها دخیل است. همچنین به عنوان تنظیم کننده بیان ژن و انتقال سیگنال سلولی عمل می‌کند (Liu & Lu 2016).

مسیر Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis در مطالعه ما تضعیف شده است که می‌تواند با کاهش تولید Ubiquinone و در نظر گرفتن نقش‌های مهمش، در حساسیت گیاه نسبت به بیمارگر نقش داشته باشد.

در این مطالعه ترئونین در تیمار گیاه حساس مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). ترئونین (L-Threonine) در گیاهان از اسید آسپاراتیک ساخته می‌شود و در تولید ایزولوسین دخیل است. ایزولوسین از پیش‌سازهای گروه آلیفاتیک گلیکوسینولات-ها می‌باشد (Zeier 2013). کاهش این اسید آمینه می‌تواند در کاهش تولید این گروه از متابولیت‌های ثانویه که دارای خاصیت ضد قارچی هستند، موثر می‌باشد. ترئونین مسیریهای Valine, leucine and isoleucine biosynthesis، Glycine, serine and threonine و Aminoacyl-tRNA biosynthesis تحت metabolism

اعضای خانواده شب بویان به عنوان متابولیت‌های القا شده توسط بیمارگر در گیاه گزارش شده‌اند (Abdel-Farid et al. 2009). قارچ *L. biglobosa* با چرخه‌ی زندگی نکروتروفی باعث فعال شدن مسیرهای دفاعی جاسمونیک اسید در گیاه می‌شوند. در ادامه متابولیت‌های معنی‌دار شناسایی شده و نقش‌شان در مسیرهای متابولیکی بیماریزایی مورد بررسی قرار گرفت.

متابولیسم اسیدهای آمینه برای بیوسنتز بسیاری از ترکیبات طبیعی دفاعی گیاه ضروری است و متعاقباً روی سیستم ایمنی گیاه اثر می‌گذارد. به عنوان مثال گلیکوسینولات‌ها، متابولیت‌های ثانویه در خانواده شب بویان براساس پیش‌سازهای اسید آمینه‌ای به سه گروه آلیفاتیک گلیکوسینولات‌ها، ایندول گلیکوسینولات‌ها و بنزوئیک گلیکوسینولات‌ها تقسیم می‌شوند (Zeier 2013).

در این مطالعه فراوانی اسید آمینه تیروزین (L-Tyrosine) در حالت مایه‌زنی با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش داشته است (جدول ۱). اسید آمینه تیروزین پیش ماده بسیاری از متابولیت‌های ثانویه است. اکثر گروه‌های فنولی در گیاهان از فنیل‌آلانین و یا تیروزین مشتق می‌شوند. افزایش تیروزین در ارقام مقاوم گندم در برابر سیاهک هندی بعد از مایه‌زنی با *Neovossia indica* در مقایسه با گندم رقم حساس گزارش شده است، و بیان شده که این ترکیب فنولی ممکن است در تسریع روند لیگنینی شدن در ژنوتیپ‌های مقاوم گندم نسبت به گیاه حساس نقش داشته باشد. فنیل‌آلانین و تیروزین از پیش‌سازهای گروه بنزوئیک گلیکوسینولات‌ها می‌باشد (Zeier 2013). کاهش این اسید آمینه می‌تواند در کاهش تولید این گروه از ترکیبات که دارای خاصیت ضد قارچی و باکتریایی هستند، دخیل باشد. مسیرهای Isoquinoline alkaloid biosynthesis، Phenylalanine, tyrosine and

در این مطالعه اسید آمینه گلیسین (L-Glycine) در تیمار گیاه حساس با زخم و مایه زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). گلیسین در سنتز کلروفیل نقش دارد. پروتئین‌های غنی از گلیسین در دفاع گیاه نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی نقش داشته و دارای فعالیت ضد قارچی و ضد باکتریایی است. ترکیبات حاوی این اسید آمینه از طریق افزایش لیگنین و ترمیم سریع بافت‌های آسیب دیده باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر آفات و بیماری‌ها می‌گردد (Zeier 2013). مسیره‌های Methane, Cyanoamino acid metabolism, Nitrogen metabolism, Glutathione metabolism, Aminoacyl-tRNA biosynthesis و Glycine, serine and threonine metabolism تحت تاثیر این اسید آمینه می‌باشند (جدول ۳). مسیره Glutathione metabolism با سنتز گلوپتاتینون تحمل گیاهان را به تنش‌های زیستی و غیر زیستی و تنش‌های اکسیداتیو مختلف افزایش می‌دهد. گلوپتاتینون یک آنتی-اکسیدان غیر آنزیمی قوی است و به عنوان یک مولکول سیگنال در دفاع عمل می‌کند. تضعیف این مسیره در مطالعه می‌تواند از دلایل حساسیت گیاه نسبت به بیمارگر باشد (Hasanuzzaman et al. 2017).

در این مطالعه فروانی گلوکوز، گالاکتوز و فروکتوز در حالت تیمار شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱)، که این کاهش نقش مهمی در مکانیسم‌های بیماری‌زایی دارد. متابولیسم کربوهیدرات‌های مرکزی مثل گلوکوز، زایلوز، فروکتوز، گالاکتوز و سوکروز از مهم‌ترین منابع برای حفاظت سلول در برابر تنش‌ها هستند (Nokhrina et al. 2014). در برهمکنش گیاه میکروبی، قندها جهت تامین سوخت انرژی مورد نیاز برای دفاع ضروری هستند و به عنوان سیگنال‌هایی برای تنظیم ژن-

تاثیر قرار می‌دهد (جدول ۳). Aminoacyl-tRNA برای عملکردش در اولین مرحله ساخت پروتئین شناخته می‌شود و مسولیت تنظیم کد ژنتیکی را برعهده دارد (Pang et al. 2014). کاهش فعالیت مسیره Aminoacyl-tRNA biosynthesis در کاهش تولید پروتئین‌ها که نقش‌های زیادی را برعهده دارند، موثر است. این مسیره در مطالعه ما تضعیف شده است که می‌تواند در حساسیت گیاه نسبت به بیمارگر نقش داشته باشد.

در این مطالعه فراوانی اسید آمینه پرولین (L-Proline) در تیمار گیاه حساس با زخم و مایه زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). میزان پرولین برگ به عنوان یک معیار ارزشمند برای وضعیت سلامت گیاه در طول رشد در نظر گرفته می‌شود (Aftab et al. 2015). در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی پرولین به عنوان یک سیگنال مولکولی عمل می‌کند و موجب تنظیم ذخیره متابولیت‌ها، تعادل ردوکس و کنترل بیان تعدادی از ژن‌ها می‌شود. روی مسیره‌های دفاعی گیاه اثر می‌گذارد. رشد و توسعه گیاهان را بهبود می‌بخشد (Szabados & Savoure. 2009). آفتاب و همکاران در سال ۲۰۱۵، کاهش ۵۰ درصدی میزان پرولین را در کلزای حساس مایه زنی شده با *Alternaria destruens* در مقایسه با شاهد گزارش کردند. محتوای پرولین پایین گیاه بیمار شده ممکن است با کاهش غلظت اسید آمینه‌های آزاد در واکتل در ارتباط باشد که می‌تواند منجر به بی‌ثبات شدن غشاء و اجزای زیر سلولی از جمله کمپلکس II انتقال الکترون میتوکندری و فشار اسمزی درون سلولی شود (Aftab et al. 2015). Aminoacyl-tRNA biosynthesis از جمله مسیره‌هایی هستند که تحت تاثیر این اسید آمینه می‌باشند و در مطالعه ما تضعیف شده‌اند (جدول ۳).

در این مطالعه فراوانی Myo-inositol، کربوهیدرات قند مانند در تیمار گیاه حساس مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). Myo-inositol مشتقات بیوشیمیایی در بسیاری از جنبه‌های تنظیم سلولی از جمله ساختار غشایی، انتقال پیام، تنظیم اسمزی، ذخیره فسفات، بیوسنتز دیواره سلولی، تولید مولکول‌های مرتبط با استرس، ارتباطات سلول به سلول، ذخیره و انتقال هورمون‌های گیاهی مهم است (Arner et al. 2001). Myo-inositol در پیام‌رسانی سلول در حیوانات و گیاهان شرکت می‌کند و گیاهان با سطح بالاتری از مقاومت نسبت به بیماری‌ها افزایش بیان در inositol داشتند. در مطالعات پروتئومیکسی در لاین‌های حساس و مقاوم سویا نسبت به *Phytophthora sojae*، کاهش بیان شدید Myo-inositol-1-phosphate synthase (MIPS) در لاین حساس گزارش گردید. این آنزیم تبدیل D-glucose 6-phosphate را به 1-L-myoinositol-1-phosphate کاتالیز می‌کند. که این موضوع نقش حیاتی این ماده را در آلودگی *P. sojae* در رقم حساس پیشنهاد کرده است (Zhang et al. 2011). Iqbal و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که MIPS از طریق سیگنالینگ کلسیم، نقش مهمی در شروع یا حفظ پاسخ دفاعی سویا به آلودگی *F. solani* ایفا می‌کند (Iqbal et al. 2002). MIPS1 یک اثر قابل توجهی بر سطح Myo-inositol دارد که برای حفظ سطوح آسکوربیک اسید، فسفاتیدول اینوزیتول و سرامیدها بسیار مهم است. این ترکیبات رشد و نمو و مرگ سلولی را در *A. thaliana* تنظیم می‌کنند (Donahue et al. 2010). مطالعات دیگر نشان داد که وارد کردن ژن *PcIN1* از *Porteresia coarctata* (Roxb.) تحمل شوری را به گیاهان توتون تراریخت اعطا می‌کند. این ژن پروتئین Myo-inositol-1-phosphate synthase را کد می‌کند (Das-chatterjee et

های دفاعی بکار می‌روند (Bolton 2009). 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). 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 (Moghaddam & Van den Ende 2013). قندهای Glucopyranose مشتقی از گلوکز، beta-DL-Arabinopyranose مشتقی از آرابینوز، -alpha-D-Galactopyranose و 2-Deoxy-galactopyranose مشتقی از گالاکتوز می‌باشد که با حلقه پیرانوز مشخص می‌شوند. در این بررسی، کاهش فراوانی Glucopyranose و alpha-D-Galactopyranose در حالت تیمار شده با بیمارگر نسبت به شاهد مشاهده شد. beta-DL-Arabinopyranose و 2-Deoxy-galactopyranose از متابولیت‌های کیفی بودند که تنها در حالت تیمار شده با بیمارگر شناسایی شدند. گلوکز مسیره‌های Starch and sucrose metabolism، Cellulose biosynthesis و Hemicellulose biosynthesis، گالاکتوز مسیره‌های Hemicellulose biosynthesis و مسیره‌های Ascorbic acid، Starch and sucrose metabolism و Amino sugar and nucleotide sugar metabolism تحت تاثیر قرار می‌دهند (جدول ۳).

گیاه حساس با زخم و مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد افزایش یافته است. و از طرف دیگر در این مطالعه فراوانی قند D-Mannose در تیمار گیاه حساس مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). تعدادی از گیاهان و قارچ‌ها مانیتول تولید می‌کنند. تجمع قندهایی مثل مانیتول پس از حمله بیمارگر می‌تواند سیستم ایمنی گیاه را تحریک کرده و منجر به افزایش بیان ژن‌های مرتبط با دفاع گیاه در برابر بیمارگر شود (Moghaddam & Van den Ende 2013). برخی از قارچ‌های بیمارگر گیاه برای سرکوب مقاومت گیاه به واسطه گونه اکسیژن فعال (ROS) مانیتول تولید می‌کنند که برای بیماری‌زایی آن‌ها ضروری است. از طرف دیگر گیاه در دفاع خود تولید آنزیم Mannitol-1-phosphate می‌کند که Mannitol را به Mannose تبدیل می‌کند. در پاسخ‌های دفاعی این آنزیم یک نقش کلیدی در برهمکنش گیاه-بیمارگر دارد و در گیاهانی که هم مکان با مانیتول ترشح شده از بیمارگر تولید می‌شود، قادرند مانیتول را تخریب کنند مقاومت بیشتری به حمله بیمارگر نشان می‌دهند (Meena et al. 2015).

در این مطالعه فراوانی N-acetyl glucoseamine در تیمار گیاه حساس مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). یکی از مکانیسم‌ها در کنترل بیمارگرهای گیاهی افزایش فعالیت آنزیم کیتیناز است. میزان فعالیت کیتیناز هر نمونه گیاهی براساس میزان ان-استیل گلوکز آمین آزاد شده به ازای هر میلی‌گرم پروتئین عصاره و هر گرم بافت گیاه محاسبه می‌شود. گیاهان با تولید سطح بالاتری از این آنزیم مقاومت بیشتری نسبت به بیمارگر از خود نشان می‌دهند (Chen & Fernando 2006). در این مطالعه کاهش میزان ان-استیل گلوکز آمین در حالت تیمار شده با بیمارگر دال بر تضعیف مسیر

Myo-inositol (al. 2006, Majumder et al. 2004) به پکتین، همی سلولز، زایلوز و قندهای اسیدی تبدیل می‌شود. مسیر Inositol phosphate metabolism در تولید انرژی، درک بیمارگر و انتقال سیگنال در ایمنی گیاه، نقش دارد. (Williams et al. 2015). تضعیف این مسیر در این مطالعه روی کاهش رشد و کاهش انتقال سیگنال در دفاع گیاه موثر باشد.

در این مطالعه فراوانی قند Melibiose در تیمار گیاه حساس مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد شدیداً کاهش یافته است (جدول ۱). در برهمکنش گیاه-قارچ اطلاعات کمی در مورد منابع کربن مورد استفاده قارچ بیمارگر از گیاه و همچنین نحوه انتقال قندها از گیاهان به سمت بیمارگر وجود دارد. لینگر و همکاران در سال ۲۰۱۱ از قارچ همی بیوتروف *Colletotrichum graminicola* عامل آنتراکنوز ذرت، پروتئین انتقال دهنده Melibiose (Melibiose Transporter1) را شناسایی و بررسی کردند و نشان دادند که این قارچ در مراحل اولیه چرخه زندگی خود به صورت بیوتروفی از منابع کربنی در اپوپلاست گیاه استفاده می‌کند که منجر به کاهش شدید این قند در گیاه می‌شود (Lingner et al. 2011). احتمالاً یکی از دلایل کاهش شدید این قند در مطالعه ما دال بر استفاده قارچ فوما از Melibiose به عنوان منبع کربن می‌باشد.

در این مطالعه فراوانی قند D-turanose در تیمار گیاه حساس مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). کاربرد خارجی این قند در گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici* باعث فعال شدن MAPKs می‌شود (Sinha et al. 2002).

در این مطالعه فراوانی قند الکی D-Mannitol در تیمار

Nonacosane و Heptacosane, Pentacosane, Eicosane آلکان‌هایی هستند که تنها در گیاه شاهد شناسایی شدند (جدول ۱). آلکان‌ها یا هیدروکربن‌های مشتق شده از اسیدهای چرب در گیاهان اغلب بخش عمده‌ای از موم‌های کوتیکول را تشکیل می‌دهند. سطوح اولیه گیاهان توسط موم پوشیده شده است که از سلول‌های اپیدرم تولید می‌شوند. نتایج مطالعات اخیر پیشنهاد می‌کند که ارقام مقاوم نسبت به بیمارگرها دفاع فیزیکی شان را از طریق افزایش بیان مسیرهای بیوستنز کوتین و موم تقویت می‌کنند. افزایش بیان در مسیرهای *alkane biosynthesis* و *cuticular wax biosynthesis* کاهش بیان مسیرهای *acyl-CoA hydrolysis*, *alkane oxidation* در تقویت دیواره سلولی دخیل‌اند (Bagherian et al. 2016). با توجه به اینکه در این مطالعه این آلکان‌ها در حالت گیاه مایه‌زنی مشاهده نشد تضعیف دفاع فیزیکی در اثر حمله بیمارگر را نشان می‌دهند.

در این مطالعه فراوانی مالیک اسید (Malic acid) و سیتریک اسید (Citric acid) در تیمار گیاه حساس مایه‌زنی شده نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). عابدالفرید و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی پاسخ‌های متابولیتی ایجاد شده توسط گیاهان کلزا آلوده به *L. maculans* با استفاده از روش طیف‌سنج رزونانس مغناطیسی هسته‌ای، تولید مالیک اسید (آزاد) و مالیک اسید متصل شده به فنیل پروپانویدها را گزارش کردند (Abdel-Farid et al. 2009). پداس و همکاران در سال ۲۰۰۷ متابولیت‌های بخش قطبی تولید شده در برگ‌های کلزای حساس، ۲۴ ساعت پس از با مایه‌زنی با *Albugo candida* را با استفاده از روش طیف‌سنج رزونانس مغناطیسی هسته‌ای و ESI-MS بررسی کردند. مالیک اسید متصل شده به فنیل پروپانویدها از جمله *p-hydroxycinnamates* متصل

Chitinase biosynthesis و در نتیجه کاهش فعالیت آنزیم کیتیناز در مسیر بیماری‌زایی است.

در این مطالعه فراوانی (Palmitic acid) Hexadecanoic acid و Stearic acid (Octadecanoic acid) در تیمار گیاه حساس مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد شدیداً کاهش یافته است (جدول ۱). اسیدهای چرب Palmitic acid و Stearic acid به عنوان پیش‌نیاز اصلی برای جاسمونیک اسید شناخته شده‌اند (Farmer et al. 1988). احتمالاً این کاهش به دلیل سرکوب شدن مسیر تولید جاسمونیک اسید و افزایش بیان سنتز سالسیلیک اسید می‌باشد (Farmer et al. 1988). همچنین Palmitic acid مسیرهای *Fatty acid biosynthesis*, *Fatty acid metabolism* و *elongation in mitochondria* هم تحت تاثیر قرار می‌دهد. مسیر ساخت اسیدهای چرب نقش مهمی را در دفاع گیاه نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایفا می‌کند. اسیدهای چرب علاوه بر اینکه به عنوان پیش‌سازهای ترکیبات کوتیکول و یا هورمون جاسمونیک اسید نقش دارند، در دفاع پایه، ایمنی به واسطه افکتورها، ایمنی سیستمیک و انتقال سیگنال در گیاه شرکت می‌کنند (Kachroo & Kachroo 2009).

در این مطالعه فراوانی Propionic acid در گیاه مایه‌زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). مسیر Propanoate metabolism در تولید propionate با فعالیت ضد قارچی نقش دارد. Propionic acid اسید چرب اشباع کوتاه زنجیر می‌باشد. محصول نهایی بتا اکسیداسیون اسید چرب است. از رشد میسلیم‌های قارچ ممانعت می‌کند که کاهش فراوانی آن نشان دهنده کاهش تولید این ترکیب دفاعی می‌باشد (Lucas et al. 2007, McGaw et al. 2002).

در این مطالعه Tetracosane, Heptadecane

می باشد (Mandal et al. 2010).

در این مطالعه فراوانی ریبونیک اسید (Ribonic acid) در تیمار گیاه حساس مایه زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). این اسید آلی در گیاهان در مسیر بیوسنتز آلکالوئیدها دخیل است (Benkeblia et al. 2007). با وجود اینکه افزایش یا کاهش معنی دار فراوانی ریبونیک اسید در بسیاری از مطالعات متابولومیکسی در حالت مقاومت و حساسیت گزارش شده است، اما نقش آن در دفاع نسبت به تنش های زیستی و غیر زیستی همچنان نامشخص است.

در این مطالعه فراوانی galactonic acid در گیاه مایه-زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است که نشان دهنده کاهش مسیر Galacturonate در بیوسنتز آسکوربیک (Ascorbic acid biosynthesis) است (جدول ۱). L-ascorbic acid یکی از آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی است که در سمیت زدایی گونه های فعال اکسیژن برای حفاظت سلول در برابر آسیب های اکسیداتیو نقش دارد. در بسیاری از فرایندهای سلولی مانند فتوسنتز، حفاظت نوری، رشد و تقسیم سلولی و مقاومت به تنش های زیستی و غیر زیستی نقش اساسی دارد. در گیاهان چندین مسیر برای ساخت آسکوربیک اسید وجود دارد. در یکی از مسیرها L-galactonic acid به L-Galactone-1-4-lactone تبدیل می شود که پیش ماده تولید آسکوربیک اسید است (Conklin & Barth 2004, Gallie 2013). این موضوع منعکس کننده اهمیت این مولکول در سلامت گیاه می باشد (Gallie 2013).

در این مطالعه فراوانی alpha-D-Glucoopyranoside و beta-D-Galactopyranoside در تیمار گیاه حساس با زخم و مایه زنی شده با بیمارگر و تیمار با زخم و مایه زنی

شده به مالیک اسید، glucoside و فلاونوئیدها را به عنوان ترکیبات مهم بخش قطبی گزارش کردند (Pedras et al. 2008). مالیک اسید در متابولیسم مرکزی گیاه از جمله چرخه تری-کربوکسیلیک اسید (TCA)، متابولیسم C4 و CMA، عملکرد سلول های نگهبان در برگ و ترشحات ریشه نقش دارد (Finkemeier & Sweetlove 2009). چرخه TCA از مسیرهای تولید انرژی، پیش ماده های ضروری را برای تنفس، بیوسنتز اسید آمینه ها و اسیدهای چرب فراهم می کند. علاوه بر این در پاسخ به تنش های زیستی و هموستازی رداکس سلولی شرکت می کند (Zhang et al. 2018). افزایش سطح این چرخه موجب افزایش مقاومت گیاهان در برابر القاکننده های طبیعی و مصنوعی شده است. همچنین حدواسط های TCA از جمله مالیک اسید و سیتریک اسید نقش مهمی در تنظیم دفاع گیاهان دارند (Balmer et al. 2018). مسیر Glyoxylate and dicarboxylate metabolism در تولید انرژی دخیل است. در این مطالعه فراوانی مالئیک اسید (Maleic acid) در تیمار گیاه حساس مایه زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). مالئیک اسید ایزومر فوماریک اسید است و در TCA از طریق سوکسینیک اسید تولید می شود. (Boehmke 1989).

در این مطالعه فراوانی مالونیک اسید (Malonic acid) در گیاه مایه زنی شده با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش یافته است (جدول ۱). مالونیک اسید یک دی کربوکسیلیک اسید می باشد. فنول های گیاهی از دو مسیر شیکمیک اسید و مالونیک اسید تولید می شوند. اگرچه مسیر مالونیک اسید منبع مهمی از تولید ترکیبات فنولی در قارچ ها و باکتری-هاست، بخش کمی از ترکیبات فنولی در گیاهان هم از این مسیر صورت می گیرد. که کاهش فراوانی آن نشان دهنده کاهش در تولید ترکیبات فنولی و در نتیجه تضعیف گیاه

بیماری‌زایی، در برهمکنش سازگار گیاه کلزا-بیمارگر قارچی *L. maculans*، ابتدا متابولیت‌های معنی‌دار شناسایی شده سپس نقش‌شان در مسیرهای متابولیکی بیماری‌زایی مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان بیش از هزاران متابولیت تولید می‌کنند در حالی که در این پژوهش تعداد اندکی متابولیت در سیستم کلزا-شانکر ساقه فوما شناسایی شد. سنتز متابولیت و پاسخ گیاه یک فرایند دینامیک است اما در این جا پروفیل متابولیتی ۴۸ ساعت پس از مایه زنی با بیمارگر بررسی شد. از آنجایی که پاسخ‌های متابولیکی گیاه به بیمارگرها بلافاصله پس از آلودگی رخ می‌دهد، برای حصول اطمینان از تندش اسپورها و نفوذ به گیاه و همچنین رسیدن فراوانی متابولیت‌ها به آستانه ردیابی دستگاه طیف سنج جرمی مدت زمان ۴۸ ساعت پس از مایه زنی انتخاب شد. در این پژوهش مایه‌زنی به روش قطره زخم با سوسپانسیون پیکنیدیوسپور انجام شد و اثرات آن بر پروفیل متابولیکی با حالت تیمار مایه‌زنی با آب مقطر دو بار استریل مقایسه شد. همان‌طور که در ابتدای بحث هم اشاره شد، علائم ظاهری گیاهان هایولا ۴۰۱ مایه‌زنی شده با بیمارگر به گونه‌ای بود که این گیاهان را کاملاً حساس به بیمارگر نشان داد. اکثر متابولیت‌های شناسایی شده در این مطالعه بین حالت تلقیح شده و شاهد مشترک بودند اما فراوانی متفاوتی داشتند. فراوانی اکثر متابولیت‌ها در حالت تلقیح شده نسبت به شاهد کاهش داشتند. در این تحقیق، مشخص شد که آلودگی *Phoma lingam* در برهم‌کنش سازگار با Hyola 401 منجر به تغییر در مسیرهای *cellulose biosynthesis* و *hemicellulose biosynthesis* تضعیف و مسیرهای *alkane biosynthesis* و *cuticular wax biosynthesis* سرکوب شده است.

با آب مقطر استریل نسبت به شاهد افزایش یافته است (جدول ۱). α -D-Glucopyranoside و β -D-Galactopyranoside و α -D-Glucopyranoside و β -D-Galactopyranoside ساپونین‌هایی از نوع گلیکوزید تری‌ترپنوئید است. ساپونین‌ها، گلیکوزیدهای استروئیدی یا تری‌ترپن هستند. 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 از کلزا شناسایی شده که دارای اثرات حفاظت آنتی‌اکسیدانی روی آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 هستند (Jing et al. 2015).

پس از ابداع روش‌های تعیین توالی دی‌ان‌ای، واکاوی رونوشت‌ها و پروتئین‌ها، یکی از چالش‌های موجود بررسی دقیق متابولیت‌های درون سلولی است. متابولم مجموعه متابولیت‌های یک موجود زنده، محصولات نهایی بیان ژن-ها می‌باشند. این مجموعه در اغلب گیاهان شامل هزاران ماده شیمیایی مختلف با ویژگی‌های فزیکیمی و شیمیایی مختلف است. این مواد براساس نقش‌شان در بقای گیاهان به دو گروه اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. متابولیت‌های اولیه در رشد و نمو گیاهان موثر و شامل کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک هستند. متابولیت‌های ثانویه برای حفظ بقای گیاهان تحت شرایط خاص در اثر تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش یافته یا ساخته می‌شوند. پیشرفت‌های اخیر در زمینه ابزارها و استخراج داده‌ها، امکان مطالعه تاثیر تنش‌های مختلف را بر متابولیسم اولیه و ثانویه گیاه به‌وجود آورده است. در مطالعه حاضر برای ارزیابی نقش متابولوم در مکانیسم

proline و Glutathione metabolism, metabolism که در انتقال سیگنال در پاسخ‌های دفاعی نقش داشتند، تضعیف گردید. فعالیت مسیرهای چرخه TCA, Glyoxylate and dicarboxylate metabolism و Inositol phosphate metabolism به عنوان تولید کننده‌های انرژی کاهش یافت. همچنین فراوانی قندهای گلوکوز، گالاکتوز، فروکتوز، مانوز، زایلوز، گلوکوپیرانوز، گالاکتوپیرانوز، ملیبوز و میواینوزیتول کاهش یافته است که این موضوع نقش حیاتی این کربوهیدرات‌ها را در آلودگی *Phoma lingam* در واکنش سازگار پیشنهاد می‌کند. همچنین تعدادی از ترکیبات که دارای فعالیت ضدقارچی بودند، در حالت تیمار با بیمارگر نسبت به شاهد کاهش داشتند.

همچنین مسیرهای مرتبط با تولید ترکیبات فنولی شامل Threonine biosynthesis, isoleucine biosynthesis, Malonic acid biosynthesis و Tyrosine biosynthesis و آلکالوئیدی Ribonic acid biosynthesis و Isoquinoline alkaloid biosynthesis و ترپنوئیدی Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis تضعیف شدند. مسیرهای Ascorbic acid biosynthesis, Chitinase biosynthesis و Propanoate metabolism از مسیرهای دفاعی مهم در برابر تنش‌ها تضعیف شده است. مسیر Glucoside biosynthesis در جهت تولید ترکیب دفاعی D-Glucopyranoside و D-Galactopyranoside در گیاه فعال شده است. مسیر Jasmonic acid biosynthesis به شدت سرکوب شده است که احتمالاً به دلیل افزایش بیان سنتز سالیسیلیک اسید می‌باشد. فعالیت مسیرهای Inositol phosphate

منابع

- Abdel-Farid I. B., Jahangir M., van den Hondel C. A. M. J. J., Kim H. K., Choi Y. H. and Verpoorte R. 2009. Fungal infection-induced metabolites in *Brassica rapa*. *Plant Science* 176(5): 608-615.
- Afshari Azad H., Momeni H. and Esmaeli M. 2007. Detection of pathogenicity groups of *Phoma lingam* causal agent of rapeseed blackleg in infected provinces.
- Aftab A., Shoaib A., Akhtar N. and Farooq N. 2015. Assessment of physiological changes in *Alternaria destruens* infected canola plants. *Pakistan Journal of Phytopathology* 27(1): 89-93.
- 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.
- Bagherian S. A. A., Hamzehzarghani H., Izadpanah K. and Djavaheeri M. 2016. Effects of potato spindle tuber viroid infection on tomato metabolic profile. *Journal of Plant Physiology* 201: 42-53.
- Balmer A., Pastor V., Glauser G., and Mauch-Mani B. 2018. Tricarboxylates induce defense priming against bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science* 9.
- Beckles D. M., Roessner, U. 2012. *Plant metabolomics: Applications and opportunities for agricultural biotechnology*. Inc: 67-81.
- Becker M. G., Zhang X., Walker P. L., Wan J. C., Millar J. L., Khan D. and Belmonte M. F. 2017. Transcriptome analysis of the *Brassica napus-Leptosphaeria maculans* pathosystem identifies receptor, signalling and structural genes underlying plant resistance. *The Plant Journal* 90(3): 573-586.
- 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.
- Boerema G. H. de gruyter J., Noordeloos M. E. and Hamers M. E. C. *Phoma Identification Manual: Differentiation of Specific and Infraspesifik Taxa in Culture*.

- Boehmke G. 1989. *U.S. Patent No. 4,839,461*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Bolton M. D. 2009. Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(5): 487-497.
- Botanga C. J., Bethke G., Chen Z., Gallie D. R., Fiehn O. and Glazebrook J. 2012. Metabolite profiling of *Arabidopsis* inoculated with *Alternaria brassicicola* reveals that ascorbate reduces disease severity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25(12): 1628-1638.
- Brock M. and Buckel W. 2004. On the mechanism of action of the antifungal agent propionate: Propionyl-CoA inhibits glucose metabolism in *Aspergillus nidulans*. *European Journal of Biochemistry* 271(15): 3227-3241.
- Chen Y. and Fernando W. G. D. 2006. Prevalence of pathogenicity groups of *Leptosphaeria maculans* in western Canada and North Dakota, USA. *Canadian journal of plant pathology* 28(4): 533-539.
- Conklin P. L. and Barth C. 2004. Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant, Cell & Environment* 27(8): 959-970.
- Das-Chatterjee A., Goswami L., Maitra S., Dastidar K. G., Ray S. and Majumder A. L. 2006. Introgression of a novel salt-tolerant L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) confers salt tolerance to evolutionary diverse organisms. *FEBS letters* 580:3980-3988.
- Donahue J. L., Alford S. R., Torabinejad J., Kerwin R. E., Nourbakhsh A., Ray W. K., Hernick M., Huang X., Lyons B. M. and Hein P. P. 2010. The *Arabidopsis thaliana* myoinositol 1-phosphate synthase1 gene is required for myo-inositol synthesis and suppression of cell death. *The Plant Cell* 22: 888-903.
- Farmer E. E., Weber H. and Vollenweider S. 1998. Fatty acid signaling in *Arabidopsis*. *Planta* 206: 167-174.
- Fernando W. G., Zhang X. and Amarasinghe C. C. 2016. Detection of *Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa* Causing Blackleg Disease in Canola from Canadian Canola Seed Lots and Dockage. *Plants* 5(1): 12.
- Finkemeier I. and Sweetlove L. J. 2009. The role of malate in plant homeostasis. *F1000 Biology Report* 1: 47.
- 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(15): 3573-3580.
- Francisco M., Soengas P., Velasco P., Bhaduria V., Carrea M. E. and Rodriguez V. M. 2016. Omics Approach to Identify Factors Involved in Brassica Disease Resistance. *Current Issues in Molecular Biology* 19: 31-42.
- Gallie D. R. 2013. L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica* 2013.
- Haddadi P., Ma L., Wang H. and Borhan M. H. 2016. Genome-wide transcriptomic analyses provide insights into the lifestyle transition and effector repertoire of *Leptosphaeria maculans* during the colonization of *Brassica napus* seedlings. *Molecular Plant Pathology* 17(8): 1196-1210.
- Hasanuzzaman M., Nahar K., Anee T. I. and Fujita M. 2017. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 23(2): 249-268.
- Huang Y. J., Pirie E. J., Evans N., Delourme R., King G. J. and Fitt B. D. 2009. Quantitative resistance to symptomless growth of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape). *Plant Pathology* 58(2): 314-323.
- Howlett B. J., Idnurm A. and Pedras M. S. C. 2001. *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of Brassicas. *Fungal Genetics and Biology* 33(1): 1-14.
- Iqbal M., Afzal A., Yaegashi S., Ruben E., Triwitayakorn K., Njiti V. and Lightfoot D. 2002. A pyramid of loci for partial resistance to *Fusarium solani* f. sp. *glycines* maintains Myo-inositol-1-phosphate synthase expression in soybean roots. *Theoretical and Applied Genetics* 105(8): 1115-1123.
- Jing W. G., Fu J., Guo Y. and Liu A. 2015. Phytochemical screening of flavonoids with their antioxidant activities from rapeseed (*Brassica napus* L.). *Phytochemistry Letters* 13: 239-245.
- Kachroo A. and Kachroo P. 2009. Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense. *The Annual Review of Phytopathology* 47:153-76.
- Kopka J., Schauer N., Krueger S., Birkemeyer C., Usadel B., Bergmüller E. and Willmitzer L. 2005. GMD@CSB. DB: the Golm metabolome database. *Bioinformatics* 21(8): 1635-1638.
- Koch E., Badawy H. M. A. and Hoppe H. H. 1989. Differences Between Aggressive and Non-Aggressive Single Spore Lines of *Leptosphaeria maculans* in Cultural Characteristics and Phytotoxin Production. *Journal of*

- phytopathology 124(1): 52-62.
- Lingner U., Münch S., Sode B., Deising H. B. and Sauer N. 2011. Functional characterization of a eukaryotic melibiose transporter. *Plant physiology* 156(3): 1565-1576.
- López-Gresa M.P., Lisón P., Kim H.K., Choi Y.H., Verpoorte R., Rodrigo I., Conejero V. and Bellés J.M. 2012. Metabolic fingerprinting of Tomato Mosaic Virus infected *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Physiology* 169: 1586-1596.
- Lucas K. A., Filley J. R., Erb J. M., Graybill E. R. and Hawes J. W. 2007. Peroxisomal metabolism of propionic acid and isobutyric acid in plants. *Journal of Biological Chemistry* 282(34): 24980-24989.
- Majee M., Maitra S., Dastidar K. G., Pattnaik S., Chatterjee A., Hait N. C. and Majumder A. L. 2004. A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salt tolerance phenotype. *Journal of Biological Chemistry* 279(27): 28539-28552.
- Mandal S. M., Chakraborty D. and Dey S. 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant signaling & behavior* 5(4): 359-368.
- Matsuura H. N. and Fett-Neto A. G. 2017. Plant alkaloids: main features, toxicity, and mechanisms of action. *Plant Toxins* 243-261.
- McGaw L. J., Jäger A. K., Van Staden J. and Houghton P. J. 2002. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African journal of botany* 68(4): 417-423.
- Meena M., Prasad V., Zehra A., Gupta V. K. and Upadhyay R. S. 2015. Mannitol metabolism during pathogenic fungal-host interactions under stressed conditions. *Frontiers in microbiology* 6.
- Mengistu A., Rimmer S. R., Koch E. and Williams P. H. 1991. Pathogenicity grouping of isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* cultivars and their disease reaction profiles on rapid-cycling Brassicas. *Plant Disease* 75: 1279-1282.
- Moghaddam M. R. B. and Van den Ende W. 2013. Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *Journal of experimental botany* 64(6): 1439-1449.
- Pang Y. L. J., Poruri K. and Martinis S. A. 2014. tRNA synthetase: tRNA aminoacylation and beyond. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 5(4): 461-480.
- Pedras M. S. C., Zheng Q. A., Gadagi R. S. and Rimmer S. R. 2008. Phytoalexins and polar metabolites from the oilseeds canola and rapeseed: differential metabolic responses to the biotroph *Albugo candida* and to abiotic stress. *Phytochemistry* 69(4): 894-910.
- Raman H., Raman R. and Larkan N. 2013. Genetic dissection of blackleg resistance loci in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Plant Breeding from Laboratories to Fields* 85-120.
- 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. *The Plant Journal* 23(1): 131-142.
- Simoh S., Quintana N., Kim H. K. Choi Y. H. and Verpoorte R. 2009. Metabolic changes in *Agrobacterium tumefaciens*-infected *Brassica rapa*. *Journal of Plant Physiology* 166(10): 1005-1014.
- Sinha A. K., Hofmann M. G., Römer U., Köckenberger W., Elling L. and Roitsch T. 2002. Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiology* 128(4): 1480-1489.
- Szabados L. and Savoure A. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science* 15(2): 89-97.
- 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.
- Williams S. P., Gillaspay G. E. and Perera I. Y. 2015. Biosynthesis and possible functions of inositol pyrophosphates in plants. *Frontiers in plant science* 6: 67.
- Williams P. H. 1985. Crucifer genetics cooperative (CRGC) resource book. Department of Plant Pathology, University of Wisconsin, Madison.
- Zeier J. 2013. New insights into the regulation of plant immunity by amino acid metabolic pathways. *Plant, Cell & Environment* 36(12): 2085-2103.
- Zhang Y., Swart C., Alseekh S., Scossa F., Jiang L., Obata T. and Fernie A. R. 2018. The extra-pathway interactome of the TCA cycle: expected and unexpected metabolic interactions. *Plant physiology* 177(3): 966-

979.

Zhang Y., Zhao J., Xiang Y., Bian X., Zuo1 Q., Shen Q., Gai1 J. and Xing H. 2011. Proteomics study of changes in soybean lines resistant and sensitive to *Phytophthora sojae*. Proteome Science 9:1-13.