

Comparative analysis of metabolites in order to identify genotypes with high remobilization efficiency in barley grain filling stage in response to drought stress

Zohreh Hajibarat 


PhD Student, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail address: zohreh.hajibarat@yahoo.com

Abbas Saidi 

*Corresponding author. Professor, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran. E-mail address: abbas.saidi@gmail.com

Mohammad Reza Ghaffari 

*Corresponding author. Associate professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Department of Systems and Synthetic Biology, Karaj, Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran. E-mail address: mrgghaffari52@gmail.com

Mehrshad Zienalabedini 

Associate professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Department of Systems and Synthetic Biology, Karaj, Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Iran. E-mail address: mzeinalabedini@gmail.com

Ghasem Hosseini Salakdeh 

Professor, Department of Molecular Sciences, Macquarie University, Sydney 2109, NSW, Australia. E-mail address: hosseini.salekdeh@mq.edu.au

Ahmad Mosuapour Gorji

Associate professor, Department of Vegetable Research, Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. E-mail address: mousapour_gorji@yahoo.com

Mohammad Reza Hajirezaei 

Professor, Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Corrensstr. 3, OT Gatersleben, 06466 Seeland, Germany. E-mail address: mohammad@ipk-gatersleben.de

Abstract

Objective

Drought conditions at the terminal of grain filling stage are one of the main factors limiting barley yield. In stressful conditions, due to the limitation of current photosynthesis, the importance of storing more stems and its contribution to the production of the final product will be significant. Among other internodes of the stem, the penultimate internode plays the most important role in remobilization. The aim of this study is to investigate the drought tolerance of two cultivars and

one line of barley with different degrees of remobilize of substances and also to investigate the comparative metabolic analysis on the penultimate internodes of three genotypes of barley Yousef (tolerant), Morocco (sensitive) and line PBYT17 (semi-tolerant) under the terminal of grain filling stage

Materials and methods

Evaluation of metabolomics analysis of barley genotypes (Yousef, Morocco and line PBYT17) in response to drought stress was carried out 21 and 28 days after the application of drought stress in the grain filling stage. Also, the ability to remobilize stem penultimates of Yusuf, Morocco and PBYT17 genotypes in response to drought was investigated. Identification of metabolites profile which included 17 metabolites including soluble sugars, sugar phosphate, sugar nucleotide, organic acids, phosphorylated metabolites and nucleotides.

Results

The results obtained from the metabolomics data showed that Youssef cultivar had a significantly higher efficiency than other cultivars in retransmission, related to penultimate. Among the investigated genotypes, 17 metabolites were identified. The amount of transferred reserves and the amount of remobilization efficiency were significantly different among different genotypes. Two cultivars Yousef and Morocco had the highest and lowest remobilization efficiency under stress conditions, respectively. Our results showed that the tolerant genotype, by increasing UDP-glucose and glucose-6-phosphate, led to the synthesis of trehalose-6-phosphate, which plays a key role in remobilization materials in the stem.

Conclusions

In general, the results of this research show that the effective metabolites in the remobilize of stem reserves can play a major role in maintaining the performance of barley plants during the drought stress at the end of the season, and this issue can be targeted solutions to increase the genotype performance. The desired varieties of barley that face drought stress at the end of the season should be used. This study may provide potential directions and valuable resources for further study of drought stress in the barley.

Keywords: Barley, Drought stress, Metabolomics, Penultimate, Soluble sugar

Paper Type: Research Paper.

Citation: Hajibarat Z, Saidi A, Ghaffari MR, Zienalabedini M, Hosseini Salekdeh GH, Mosuapour Gorji A, Hajirezaei MR (2024) Comparative analysis of metabolites in order to identify genotypes with high remobilization efficiency at the grain filling stage in response to drought stress. *Agricultural Biotechnology Journal* 16 (3), 111-132.

Agricultural Biotechnology Journal 16 (3), 111-132. DOI: 10.22103/jab.2024.23610.1577

Received: July 01, 2024.

Received in revised form: August 19, 2024.

Accepted: August 20, 2024.

Published online: September 30, 2024.




Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.


© the authors

آنالیز مقایسه‌ای متابولیت‌ها به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های با کارایی انتقال مجدد بالا در


مرحله پرشدن دانه جو در پاسخ به تنش خشکی

 **زهره حاجی برات**

دکتری، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: zohreh.hajbarat@yahoo.com

 **عباس سعیدی**


*نویسنده مسئول: استاد، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران. رایانامه: abbas.saidi@gmail.com

 **محمدرضا غفاری**

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ایران. رایانامه: mrghaffari52@gmail.com

 **مهرشاد زین العابدینی**


دانشیار، گروه زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ایران. رایانامه: mzeinalabedini@gmail.com

 **قاسم حسینی سالکده**

استاد، گروه علوم مولکولی، دانشگاه مک کواری، سیدنی ۲۰۹، NSW، استرالیا. رایانامه: hosseini.salekdeh@mq.edu.au

احمد موسی پور گرجی

دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. رایانامه: mousapour_gorji@yahoo.com

 **محمدرضا حاجی رضایی**

استاد، موسسه ژنتیک گیاهی و تحقیقات گیاهان زراعی لاینیز، سیلند، آلمان. رایانامه: mohammad@ipk-gatersleben.de

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۷ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۳۰

چکیده

هدف: شرایط خشکی انتهایی در مرحله پر شدن دانه یکی از عوامل اصلی محدودکننده عملکرد جو است. در شرایط تنش، به دلیل محدودیت فتوسنتز جاری، اهمیت ذخیره بیشتر ساقه و سهم آن در تولید محصول نهایی قابل توجه خواهد بود. میانگرم پنالتیمیت در میان سایر میانگرم‌های ساقه بیشترین نقش را در انتقال مجدد ایفا می‌کند. هدف این مطالعه بررسی تحمل به خشکی دو رقم و یک

لاین جو با درجات مختلف انتقال مجدد مواد و همچنین بررسی آنالیز متابولیتی مقایسه‌ای بر روی میانگروه‌های پنالتیمیت سه ژنوتیپ جو یوسف (متحمل)، موروکو (حساس) و لاین PBYT17 (نیمه متحمل) طی شرایط خشکی انتهایی بود.

مواد و روش‌ها: ارزیابی آنالیز متابولومیکس ژنوتیپ‌های جو (یوسف، موروکو و لاین PBYT17) در پاسخ به تنش خشکی در ۲۱ و ۲۸ روز بعد از اعمال تنش خشکی در مرحله پرشدن دانه انجام شد. همچنین بررسی قابلیت انتقال مجدد پنالتیمیت‌های ساقه‌ی ژنوتیپ‌های یوسف، موروکو و PBYT17 در پاسخ به خشکی صورت گرفت. شناسایی پروفاایل متابولیت‌ها که شامل ۱۷ متابولیت از جمله قندهای محلول، قند فسفات، نوکلئوتید قند، اسیدهای آلی، متابولیت‌های فسفریله و نوکلئوتیدها بود.

نتایج: نتایج حاصل از داده‌های متابولومیکس نشان داد که رقم یوسف کارایی معنی‌دار بالاتری نسبت به ارقام دیگر در انتقال مجدد، مربوط به پنالتیمیت داشت. در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ۱۷ متابولیت شناسایی شدند. میزان ذخایر انتقال یافته و مقدار کارایی انتقال مجدد به طور معنی‌داری در بین ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود. دو رقم یوسف و موروکو به ترتیب با بالاترین و کمترین کارایی انتقال مجدد در شرایط تنش، برخوردار بودند. نتایج ما نشان داد که ژنوتیپ متحمل با استفاده از افزایش UDP-گلوکز و گلوکز ۶ فسفات، منجر به تولید تریه‌هالوز ۶ فسفات شد که نقش کلیدی در انتقال مجدد مواد در ساقه به عهده دارد.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که متابولیت‌های موثر در انتقال مجدد ذخایر ساقه می‌تواند نقشی اصلی در حفظ عملکرد گیاهان جو طی تنش خشکی آخر فصل ایفا نماید و این موضوع می‌تواند راهکارهایی هدفمند برای افزایش عملکرد ژنوتیپ‌های موردنظر جو که با تنش خشکی آخر فصل مواجه می‌شوند به کار گرفته شود. این مطالعه ممکن است جهت گیری‌های بالقوه و منابع ارزشمندی را برای مطالعه بیشتر تنش خشکی در جو فراهم کند.

کلیدواژه‌ها: استرس خشکی، پنالتیمیت، قند محلول، جو، متابولومیکس

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: حاجی برات زهره، سعیدی عباس، غفاری محمدرضا، زین العابدینی مهرشاد، حسینی سالکده قاسم، موسی پور گرجی احمد، حاجی رضایی محمدرضا (۱۴۰۳) آنالیز مقایسه‌ای متابولیت‌ها به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های با کارایی انتقال مجدد بالا در مرحله پرشدن دانه جو در پاسخ به تنش خشکی. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۶(۳)، ۱۱۱-۱۳۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

کمبود آب باعث کاهش شدید بهره‌وری محصول در سراسر جهان می‌شود. ایران در یک منطقه خشک و نیمه خشک واقع شده‌است که تنش خشکی نهایی در آن فراگیر و قابل توجه است (Bannayan et al. 2010). تبخیر آب خاک در فصل بهار، به‌ویژه زمانی که غلات وارد مرحله پر شدن بذر می‌شوند، معمول است. عملکرد دانه به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر تنش خشکی انتهایی فصل است (Francia et al. 2004) تنش خشکی ممکن است تأثیرات متفاوتی در عملکرد سنبله‌ها در واحد سطح و دانه

در سنبله یا وزن دانه داشته باشد. همچنین از دیگر تاثیرات، ذخیره ماده خشک بیشتر در بافت‌های رویشی در عملکرد دانه‌ها تحت تنش در مقایسه با شرایط آبیاری نرمال قابل توجه می‌باشد (Ehdaie et al. 2008; Joudi et al. 2012; Ma et al. 2015). بافت ساقه جو منبع غالب ذخیره کربوهیدرات در مراحل اولیه پر شدن دانه است (Tafresh et al. 2023). این یک منبع کربن مهم برای پر شدن دانه است و در شرایط رطوبت کافی می‌تواند تقریباً ۲۰ درصد از عملکرد دانه را تامین کند (Albahri et al. 2023). گیاه جو که در مناطق نیمه خشک رشد می‌کند ممکن است در طول رشد، به ویژه در طول گرده‌افشانی و پر شدن دانه، دچار کم‌آبی شود، که این امر باعث وابستگی آنها به کربوهیدرات‌های محلول در آب (WSCs) می‌شود (Hoyle et al. 2020). مطالعات مختلف نشان داده‌است که پس از گرده‌افشانی، هیدرولیز فروکتان به ساکارز و فروکتوز برای حفظ سرعت پر شدن دانه افزایش می‌یابد، به‌ویژه زمانی که فتوسنتز جاری تحت تنش آبی به شدت مختل می‌شود. تحت شرایط تنش خشکی سهم انتقال مجدد از ساقه به میزان بیشتر 40% افزایش می‌یابد (Afsharianzadeh et al. 2024; Albahri et al. 2023). ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی معمولاً منابع ذخیره کربوهیدرات بیشتری را در ساقه نسبت به ژنوتیپ‌های حساس جمع می‌کنند. متابولومیکس می‌تواند به عنوان رویکردهای عملی برای توسعه ارقام مقاوم به خشکی با شناسایی متابولیت‌های دخیل در انتقال مجدد ذخیره ساقه مورد استفاده قرار گیرد (Miralles et al. 2021). این تکنیک توسعه نشانگرهای مولکولی مربوط به صفات انتقال مجدد ذخیره شده ساقه را برای اصلاح ارقام جو در پاسخ به تنش خشکی انتهایی امکان‌پذیر می‌کند. مطالعات اخیر نشان داد که انتقال مجدد آنزیم‌های تجزیه‌کننده ازت و کربوهیدرات در انتقال مجدد ذخیره ساقه افزایش می‌یابد (Wang et al. 2020). بنابراین یکی از راهکارهایی که در ارقام متحمل با تنش خشکی مقابله می‌کنند، افزایش جذب در ساقه طی فرآیند پر شدن دانه می‌باشد. ذخایر ساقه در طول رشد و طولانی شدن دوره انتقال مجدد افزایش می‌یابد (Ehdaie et al. 2008; Abouzar et al. 2012). مطالعات بررسی‌های به‌عمل آمده در اواخر دهه ۸۰ میلادی روشن نمود که مکانیسم‌های مولکولی در زمره مهم‌ترین فرایندهای ژنتیکی (مشمول بر همانندسازی DNA، رونویسی، ترجمه و حتی نحوه تنظیم ژن‌ها) هستند (Barazandeh et al. 2016; Safaei et al. 2022). تولید متابولیت‌ها در گیاهان تحت کنترل ژنتیکی است ولی عوامل محیطی بویژه شرایط تنش‌زا نقش عمده‌ای در کمیت و کیفیت این مواد به عهده دارند (Mohammadinejad et al. 2022; Mohammadabadi et al. 2023). یکی از اقدامات اساسی در به‌نژادی ملکولی مطالعه ژن‌ها، پروتئین‌های و متابولیت‌های مرتبط با صفات مهم و مطالعه آنها در سطح سلولی یا کروموزومی است (Mohammadinejad et al. 2022; Shahsavari et al. 2023). بنابراین در دسترس بودن ابزارهای ژنومی می‌تواند اصلاح گیاهان را در زمان کوتاه‌تر تا حد زیادی افزایش دهد. این ابزارها از جمله آنالیز بیان ژن برای تسهیل شناسایی ژن‌های مقاوم در حال توسعه هستند و بررسی الگوی بیان ژن‌ها و مشخص کردن ژن‌های مقاوم به خشکی در این راستا انجام می‌گیرد (Mohammadabadi et al. 2024).

معمولاً تکنیک‌های "omics" با کارایی بالا، محققان را قادر می‌سازد تا واکنش‌های گیاه به تنش‌های محیطی را با دیدی جامع‌تر مطالعه کنند. به طور خاص، ادغام چنین رویکردهای سامانه (به اصطلاح زیست‌شناسی سیستم‌ها) است که اجازه می‌دهد

شبکه تنظیمی پیچیده فعال شده توسط گیاهان در پاسخ به عوامل خارجی از جمله تنش‌های غیرزیستی را روشن کند (Kosová et al. 2016; Jorge et al. 2015). به ویژه، ادغام رویکردهای زیست‌شناسی سامانه‌ای است که به شبکه پیچیده تنظیمی گیاهان اجازه می‌دهد در پاسخ به عوامل خارجی مانند تنش‌های غیرزیستی فعال شوند (Kang et al. 2019). اگر چه مطالعاتی کمی در رابطه با متابولیت‌های دخیل در انتقال مجدد ساقه وجود دارد. لذا این تحقیق می‌تواند نقش مهمی جهت افزایش اطلاعات از اثر تنش خشکی در مرحله بعد از گلدهی (پرشدن دانه) بر روی بافت پنالتیمیت ساقه و شناسایی متابولیت‌های دخیل در پاسخ به تنش خشکی ارائه دهد. شناسایی متابولیت‌های کلیدی دخیل در انتقال مجدد ذخیره ساقه جو، سه ژنوتیپ متضاد جو برای ویژگی‌های تجمع و انتقال مجدد تحت شرایط تنش آبی در ۲۱ و ۲۸ روز بعد از گلدهی مورد مطالعه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در پژوهش حاضر دو رقم (یوسف و موروکو) و یک لاین (PBYT17) جو زراعی (*Hordeum vulgare* L) بر اساس بررسی منابع انتخاب شدند (Tafresh et al. 2023). بذور رقم یوسف به عنوان رقم متحمل به خشکی و لاین PBYT17 به عنوان لاین پیشرفته و نیمه حساس از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و رقم موروکو به عنوان رقم حساس به خشکی از مرکز تحقیقات بین‌المللی در مناطق خشک جهان (ICARDA) تهیه گردید.

کشت و نحوه اعمال تنش: خاک مورد نیاز برای این آزمایش از مزرعه غلات شهرک مهندسی زراعی واقع در کرج تهیه شد. این آزمایش در کرت‌های آزمایشی در بستر گلخانه (به عنوان محیط کنترل شده) (شکل ۱) به صورت کرت‌های خرد شده در زمان و مکان بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شد. در این آزمایش عامل اصلی رژیم آبیاری در ۲ سطح (شاهد و تنش خشکی) است. بذور هر ژنوتیپ با فاصله ۵ سانتی‌متر روی خطوط کاشته شدند و فاصله بین خطوط ۱۰ سانتی‌متر در نظر گرفته شد به طوری که هر ژنوتیپ در ۳ خط ۲ متری قرار گرفت. آبیاری تا زمان شروع گلدهی (شروع گلدهی طبق تعریف در گیاه جو زمانی است که سنبله‌ها هنوز به طور کامل از غلاف خارج نشده باشند) به صورت قطره‌ای و براساس نیاز گیاه صورت گرفت. میزان نیاز گیاه به آبیاری هر بار با استفاده از دستگاه رطوبت‌سنج و با توجه به ظرفیت زراعی خاک محاسبه شد. ارزیابی حجم آب مصرفی گیاه با استفاده از کنتوری که در ابتدای مسیر ورودی آب قرار داده شده بود، صورت گرفت. حجم آب مصرفی گیاه هر بار یادداشت شد. در زمان شروع مرحله گلدهی (زمانی که بطور متوسط ۵۰ درصد بوته‌ها به مرحله شروع گلدهی رسیدند) تیمار تنش به صورت قطع آبیاری اعمال شد.

نمونه برداری جهت بررسی‌های مولکولی: نمونه‌برداری برای این قسمت از تحقیق نیز به صورت تصادفی از بین

ساقه‌های اصلی شماره‌گذاری شده با طول یکسان در ۲ مرحله از ۲۱ روز پس از گلدهی (زمان صفر) و ۲۸ روز پس از گلدهی از

میانگه پنالیتیمیت برای ۳ ژنوتیپ (یوسف، PBYT17 و موروکو به ترتیب دارای بیشترین، متوسط و کمترین مقدار کارایی انتقال مجدد) انجام گرفت. نمونه‌ها به سرعت پس از برداشت در نیتروژن مایع منجمد شده و به فریزر -80 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

اندازه‌گیری قندها و اسیدهای آلی: قندها به روش کروماتوگرافی فاز معکوس و به روش (Höller et al. 2014) با

استفاده از روش آنزیمی اندازه‌گیری شدند. به این ترتیب که نمونه‌ها در اتانول ۸۰ درصد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز رویی در دستگاه خلاء تبخیر شد تا کاملاً خشک شود. نمونه‌های به‌دست آمده در آب با خلوص بسیار بالا (آب moliQ) حل شدند. قبل از تجزیه و تحلیل UPLC، نمونه‌ها با استفاده از عامل فلورسنت AQC (۶-aminoquinolyln) حل شدند. قبل از تجزیه و تحلیل hydroxysuccinimidylcarbamat مشتق سازی شدند. سه میلی‌گرم از AQC در یک میلی‌لیتر استونیتریل حل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ هفته نگهداری شد. به ۰/۱۶ میلی‌لیتر از یک بافر M22 حاوی اسید بوریک ۰/۲ مولار با pH 8.8، ۰/۰۲ میلی‌لیتر از هر نمونه و ۰/۰۲ میلی‌لیتر محلول AQC اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و برای جداسازی کروماتوگرافی استفاده شد (Holler et al. 2014). سیستم UPLC (AcQuity H-Class,) (Germany) روی یک ستون فاز معکوس (ACCQ)C18 با سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر در دقیقه و زمان ۱۰/۲ دقیقه برای اندازه‌گیری اسیدهای آمینه استفاده شد و اندازه‌گیری‌ها با استفاده از میکروپلیت ریدر (Germany, Crailsheim) انجام شد.

اندازه‌گیری متابولیت‌های اولیه: متابولیت‌های اولیه بر اساس روش (Ghaffari et al. 2016) با تغییراتی اندازه‌گیری

شدند. به این ترتیب که ۱۰۰ میلی‌گرم بافت مرطوب با استخراج حاوی نسبت‌های مساوی کلروفرم و اتانول به ۱ میلی‌لیتر اضافه شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر آب HPLC به هر نمونه اضافه شد و به مدت یک دقیقه به طور کامل ورتکس شد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز بالایی در خلاء در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد. نمونه‌ها در آب HPLC حل شدند. کروماتوگرافی یونی- طیف سنجی جرمی (IC-MS/MS) با استفاده از سیستم (ICS-5000) متصل به ستون چهار قطبی LC / MS Agilent-6490 انجام شد. جداسازی کروماتوگرافی با استفاده از یک ستون AS11 2 × 250 میلی‌متر متصل به یک ستون محافظ ۲ × ۱۰ میلی‌متر و یک ستون تله آنیون انجام شد. این ستون بین محلول‌ها و ستون جداسازی قرار داده شد تا آلاینده‌های آنیونی موجود در محلول حذف شوند. ستون، توسط مخلوطی از ۰/۹۶ آب (HPLC) و ۰/۰۴ KOH با سرعت جریان ۰/۳۸ میلی‌لیتر در دقیقه متعادل شد. این ستون بین محلول‌ها و ستون جداسازی قرار داده شد تا آلاینده‌های آنیونی موجود در محلول حذف شوند. ستون با مخلوطی از ۰/۹۶ درصد آب (HPLC) و ۰/۰۴ KOH با سرعت جریان ۰/۳۸ میلی‌لیتر در دقیقه متعادل شد. اندازه‌گیری‌های طیف سنجی جرمی در یک سیستم کروماتوگرافی مایع متصل به طیف سنجی جرمی (LC/MS) با استفاده از ستون سه قطبی Agilent ۶۴۹۰ انجام شد. برای

یونیزاسیون نمونه‌ها از روش الکترواسپری یون‌های منفی استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار آنالیز کمی MassHunter نسخه B.07.01 محاسبه شدند. به‌منظور نرمال کردن داده‌ها، قبل از آنالیزها، به هر نمونه پیروات - C13 به عنوان استاندارد داخلی اضافه شد.

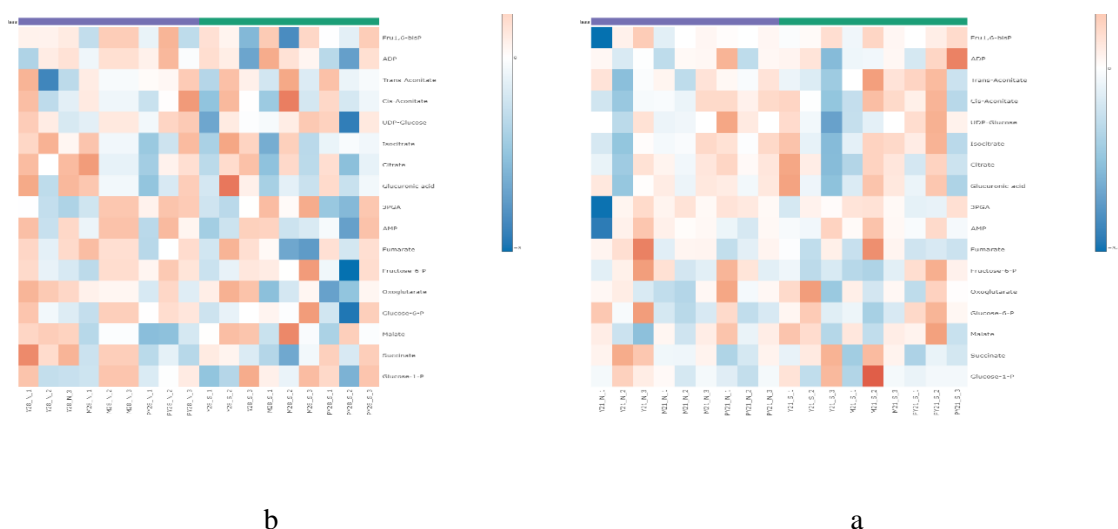
تجزیه آماری داده‌ها: داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پروفایل متابولیت‌ها جهت انجام آنالیزهای آماری و رسم نمودار به نرم افزار Metaboanalyst نسخه ۶ وارد شدند. قبل از انجام محاسبات آماری، تمام داده‌ها با محاسبه (pareto) Pareto_sacaled و معیار \log_2 نرمال سازی شدند. آنالیزهای آماری چند متغیره تفکیکی حداقل مربعات انجام شد. همچنین اهمیت متابولیت‌ها در مدل OsPLSDA با استفاده از $VIP > 1$ از حد آستانه معناداری به‌دست آمد.

نتایج و بحث

آنالیز متابولومیکس: در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ۱۷ متابولیت انباشته شده متفاوت شناسایی شد: اسیدهای آلی (Oxoglutarate, Succinate, Fumarate, Malate, Cis-Aconitate, Trans-Aconitate, Isocitrate,) (3PGA, Glucuronic acid, Citrate) متابولیت فسفریله (Glucose-6-P, Fructose-6-P, Glucose-6-P)، نوکلئوتید (Fru1,6-bisP, 1-P, Fructose-6-P)، فسفات نوکلئوتید (ADP, AMP) (شکل ۱). یافته‌های ما نشان داد که در مجموع ۱۷ متابولیت شناسایی شدند. گلوکز-۶-فسفات و UDP-گلوکز به عنوان پیش‌نیاز برای تولید تره‌هالوز-۶-فسفات عمل می‌کنند. در ۲۸ روز پس از گلدهی، رقم متحمل افزایش گلوکز-۶-فسفات و UDP-گلوکز را نشان داد که نشان‌دهنده این است که این رقم تعادلی بین متابولیسم قند (گلوکز-۶-فسفات) و مرگ سلولی (UDP-گلوکز) ایجاد می‌کند. در ژنوتیپ حساس، گلیکولیز و متابولیسم انرژی در ۲۱ روز پس از گلدهی افزایش یافت که احتمالاً این ژنوتیپ در متابولیسم نشاسته و ساکارز و متابولیسم انرژی نقش دارد. در ۲۸ روز پس از گلدهی، فروکتوز-۱،۶-فسفات، UDP-گلوکز و ۳PGA افزایش یافت. حتی ژنوتیپ حساس در مراحل انتهایی رشد باعث افزایش گلیکولیز، مسیرهای چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک (TCA) و متابولیسم نشاسته در گیاهان شد. UDP-گلوکز در ژنوتیپ حساس (موروکو) در روزهای ۲۱ و ۲۸ پس از گلدهی افزایش یافت. در ژنوتیپ‌های متحمل و نیمه متحمل، چرخه چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک، گلیکولیز، پنتوز فسفات و چرخه گلی‌اکسیلات افزایش یافت که نشان می‌دهد ژنوتیپ‌های با توانایی بالا در پاسخ به تنش خشکی داشته و با استفاده از حدواسط‌های متابولیسم انرژی، مالات تولید می‌کنند تا شرایط اسمزی را کنترل کنند. در نتیجه با افزایش این متابولیت‌ها در مقابل با ROS پاسخ بهتر و کاهش عملکرد کمتری نشان دهند. معمولاً تنش خشکی در طول پر شدن بذر باعث پیری زودرس می‌شود و مدت زمان پر شدن بذر را کاهش می‌دهد و باعث انتقال مجدد جذب از منبع تا مخزن می‌شود. تنش خشکی عامل اصلی کنترل کننده رشد بذر و پر شدن بذر است. فرآیندهای مربوط به سنتز و تجمع ذخایر مختلف بذر تا حد زیادی تحت تأثیر وضعیت رطوبت سلول‌های ذخیره کننده قرار دارد. کاهش آب در این مرحله پر شدن دانه

را مختل می‌کند. تفاوت‌های ژنوتیپی در انتقال مجدد مواد در پروفایل‌های متابولیکی در شرایط خشکی مشاهده شد (Chun et al. 2020). در روزهای ۲۱ و ۲۸ پس از گلدهی، چرخه اسید تری کربوکسیلیک، پنتوز فسفات و چرخه گلیوکسیلات در ژنوتیپ متحمل افزایش یافت. بنابراین، تنظیم متابولیسم نشاسته و ساکارز و مسیرهای مرتبط، یعنی تبدیل پنتوز و گلوکونات، نقش مهمی در تولید نشاسته و ساکارز دارند (Gao et al. 2018). در ژنوتیپ متحمل، گلوکز ۶-فسفات و UDP-گلوکز در ۲۸ روز پس از گلدهی افزایش یافتند، که نشان‌دهنده این است که این متابولیت‌ها برای تولید تره‌هالوز ۶-فسفات ضروری هستند. گلوکز ۶ فسفات و UDP-گلوکز پیش‌نیازهای تولید تره‌هالوز ۶-فسفات هستند (Watanabe et al. 2013).

تره‌هالوز ۶-فسفات به عنوان یک سیگنال مولکولی برای در دسترس بودن کربن بالا و در تنظیم تعدادی از فرآیندهای رشد در گیاهان شناسایی شده‌است (Paul et al. 2010; Schlupepmann et al. 2012). مطالعه قبلی نشان داد که تره‌هالوز ۶ فسفات پر شدن دانه را با امکان تجمع نشاسته در جنین بالغ تنظیم می‌کند، بنابراین استفاده موثر از ساکارز ورودی را فراهم می‌کند (Meitzel et al. 2021). تره‌هالوز ۶ فسفات تبدیل ساکارز به نشاسته را با فعال کردن آنزیم‌های کلیدی در سنتز نشاسته در سطح رونوشت افزایش می‌دهد. براساس این نتایج می‌توان استدلال کرد که تره‌هالوز ۶-فسفات عامل کلیدی پر شدن دانه دارد. همچنین براساس نتایج مطالعات مختلف، تره‌هالوز ۶ فسفات واسط بیوسنتز تره‌هالوز می‌باشد، یک متابولیت سیگنال ضروری در گیاهان که رشد را به متابولیسم کربن مرتبط می‌کند (Figueroa et al. 2016). در ژنوتیپ‌های متحمل و نیمه متحمل، چرخه اسید تری کربوکسیلیک، گلیکولیز، پنتوز فسفات و چرخه گلی‌اکسیلات افزایش یافت که نشان‌دهنده توانایی بالای ژنوتیپ‌ها در پاسخ به تنش خشکی از طریق تولید مالات برای کنترل شرایط اسمزی است. به عنوان مثال، چرخه اسید تری کربوکسیلیک، پنتوز فسفات و گلی‌اکسیلات تحت تنش خشکی فعال می‌شوند که منجر به افزایش گلوکز و مالات برای تنظیم اسمز و مقابله با تولید ROS و مهار نور می‌شود (Cramer et al. 2007). سطح بالای سوکسینات در (ژنوتیپ متحمل) TR39477، می‌تواند به استفاده از چرخه اسید تری کربوکسیلیک برای تولید انرژی بیشتر در شرایط تنش خشکی مرتبط باشد (Ullah et al. 2017). بر اساس نتایج مطالعه انجام شده بر روی متابولیت‌های گندم در مرحله گیاهچه‌ای تحت تنش خشکی، قندها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه نقش مهمی در تحمل به خشکی در ارقام متحمل دارند. در نتیجه این رقم متحمل در مقایسه با رقم حساس از توانایی بالایی برای فتوسنتز برخوردار است (Guo et al. 2018). در ۲۸ روز پس از گلدهی، متابولیت‌های سوکسینات در سه ژنوتیپ افزایش یافت که سوکسینات جزء میانی متابولیت اولیه مسیر ATP، چرخه کربس و متابولیسم انرژی است (Voss et al. 2013).



شکل ۱. نقشه حرارتی مشخصات متابولیت‌ها در نمونه‌های شاهد و تیمار شده با خشکی در ۲۱ DAA (a) و ۲۸ DAA (b). در بالای شکل، رنگ بنفش نشان‌دهنده گروه شاهد و رنگ سبز نشان‌دهنده گروه تحت تیمار با خشکی است. در هر گروه از سه تکرار استفاده شد. محدوده شدت رنگ از ۳- تا ۳+ فراوانی نسبی هر ماده را به ترتیب از فراوانی زیاد (قرمز) تا کم فراوانی (سبز) نشان می‌دهد

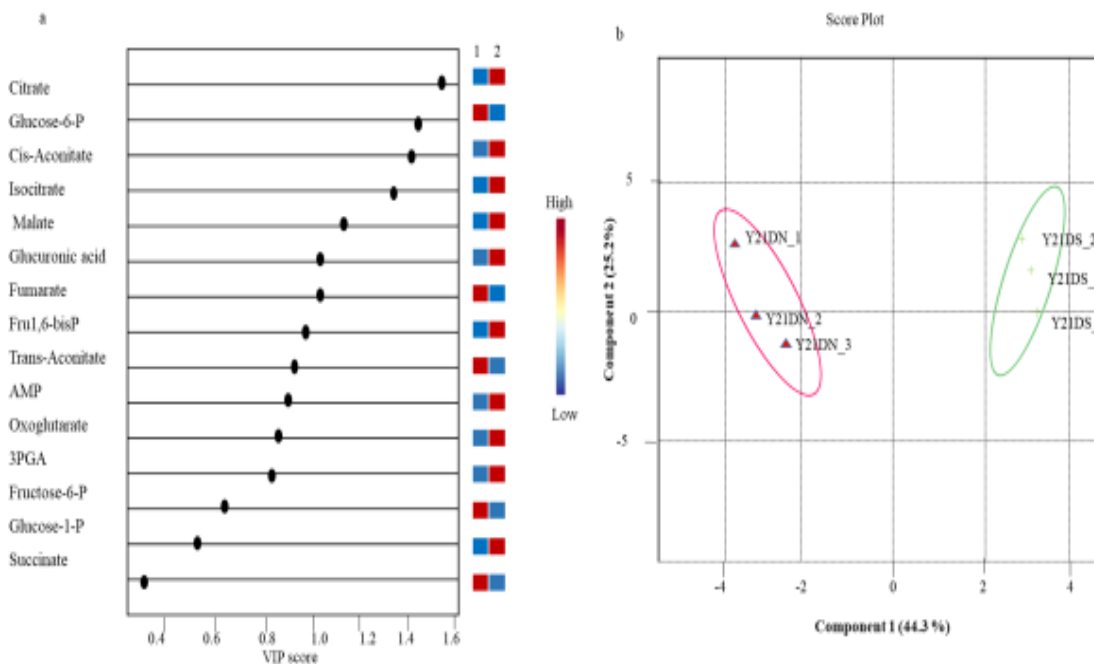
Figure 1. Heatmap of the profile of metabolites for control and drought-treated samples at 21 DAA (a) and 28 DAA (b). At top, the purple color represents the control group and the green color represents the group treated with drought stress. Three replicates were used in each group. The range of color intensity from -3 to 3 indicates the relative abundance of each substance, respectively from high abundance (red) to low abundance (green)

تجزیه و تحلیل (OsPLS-DA) برای تعیین متابولیت‌های بالقوه رایج مکانیسم تنش خشکی در سه ژنوتیپ جو انجام شد و متابولیت‌هایی با نمره $VIP > 1$ توصیف شدند. برای تعیین اینکه آیا فراوانی متابولیت‌های شناسایی شده بین شاهد و ۲۱ روز بعد از اعمال تنش تفاوت معنی‌داری وجود دارد یا خیر، از $VIP > 1.0$ استفاده شد (شکل 2 a, c, e). متابولیت‌هایی که تحت تنش خشکی تجمع قابل توجهی از خود نشان می‌دهند، متابولیت‌های کلیدی در نظر گرفته می‌شوند و با مسیرهای بیوشیمیایی، آنزیم‌ها و مکان‌های ژنی برای درک بهتر مکانیسم‌های استرس مرتبط بین شاهد و ۲۸ روز بعد از گلدهی هستند (شکل 3 a, c, e). یک آزمون آماری چند متغیره، آنالیز (OsPLS-DA)، برای شناسایی متابولیت‌هایی که می‌توانند تا ۶۹/۵ درصد و ۴۹/۴ درصد از تغییرات متابولیت را در بین شاهد، شرایط خشکی در ژنوتیپ یوسف تشخیص دهند (شکل 2b و 3b) استفاده شد. در این مطالعه متابولیت‌هایی را شناسایی شدند که می‌توانند تا ۶۸/۷ درصد و ۵۴/۲ درصد از تغییرات متابولیت را در بین شاهد، شرایط خشکی در ژنوتیپ مورکو (شکل 2f و 3f) و شرایط خشکی در ژنوتیپ PBYT17 (شکل 2d و 3d) تشخیص دهند. مفهوم نتایج مورد مطالعه این است که

فراوانی متابولیت‌ها توسط میزان تنش آبی تنظیم می‌شود. متابولیت‌ها به طور مستقیم با صفات مرتبط هستند و می‌توانند کیفیت صفات گیاهی، از جمله عملکرد، و اجزای تغذیه‌ای را منعکس کنند و نقش مهمی در رشد، نمو و پاسخ گیاه به تنش‌های زنده و غیرزیستی ایفا کنند (Fiehn, 2002; Dixon et al. 2006). در مجموع ۱۷ متابولیت در تمام تیمارها شناسایی گردید. مطالعه قبلی نشان داد که بر اساس پارامتر $VIP > 1$ ، ۱۶ و ۱۴ متابولیت پاسخگو به خشکی با تغییرات مهم به ترتیب در برگ‌های تحت تنش در ارقام بهار و کویر شناسایی شد. آنها شامل نوکلئوتیدها و نوکلئوتیدهای قند، واسطه‌های چرخه اسید تری کربوکسیلیک، متابولیت‌های گلیکولیتیک و فسفات‌های قند و اسید آلی بودند. علاوه بر این، یک تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بین تیمارهای مختلف برای شناسایی متابولیت‌های تولید شده متفاوت متابولیسم اولیه تحت خشک شدن و بازیابی انجام شد. تنش خشکی باعث کاهش واسطه‌های چرخه اسید تری کربوکسیلیک به‌ویژه سیس-اکونیتات، سیترات، سوکسینات و فومارات در گندم شد که با نتایج ما متضاد بود (Michaletti et al. 2018). سیس-اکونیتات یک متابولیت حدواسط در چرخه اسید تری کربوکسیلیک است و که فعالیت یک آنزیم برای رشد سلول را تنظیم می‌کند. مطالعه قبلی نشان داد که پاسخ‌های چرخه اسید تری کربوکسیلیک تحت خشکی شدید تغییر کرد، اما چرخه اسید تری کربوکسیلیک در تنش خشکی متوسط تغییری نکرد (Araújo et al. 2012). سوکسینات جزء واسطه‌ای از مسیر ATP، چرخه اسید سیتریک است که نقش حیاتی در تولید انرژی ایفا می‌کند و چرخه اسید تری کربوکسیلیک میتوکندری را تنظیم می‌کند (Kunze et al. 2006). با سنتز بیش از حد سوکسینات، میتوکندری‌ها ATP بیشتری را برای شرایط نامطلوب ذخیره می‌کنند. سطح بالای سوکسینات در گندم باعث تحمل بالای آن در برابر تنش خشکی می‌شود (Kunze et al. 2002; Samokhvalov et al. 2004). سوکسینات می‌تواند به استفاده کارآمد از چرخه اسید تری کربوکسیلیک برای تولید انرژی بیشتر در شرایط تنش مرتبط باشد. یافته‌های ما نشان داد که رقم یوسف متابولیت‌های دخیل در مسیر پنتوز فسفات (PPP) را در روزهای ۲۱ و ۲۸ پس از گلدهی افزایش می‌دهد. مسیر پنتوز فسفات می‌تواند هوازی یا بی‌هوازی باشد و برای بیوسنتز و همچنین کاتابولیسم مهم است و اثر محافظتی در برابر ROS و استرس دارد. یک مطالعه نشان داد که تحت تنش خشکی، چرخه اسید تری کربوکسیلیک به صفر کاهش یافت، اما مسیر پنتوز فسفات به طور قابل توجهی در میوه *A. auricula* افزایش یافت. مسیر پنتوز فسفات می‌تواند قدرت کافی برای حذف ROS تولید کند، بنابراین میوه را قادر می‌سازد تا از تنش خشکی محفوظ بماند. علاوه بر این، پلی‌ساکاریدهای محلول ممکن است برای محافظت از میوه در برابر تنش خشکی مفیدتر باشند (Ma et al. 2015).

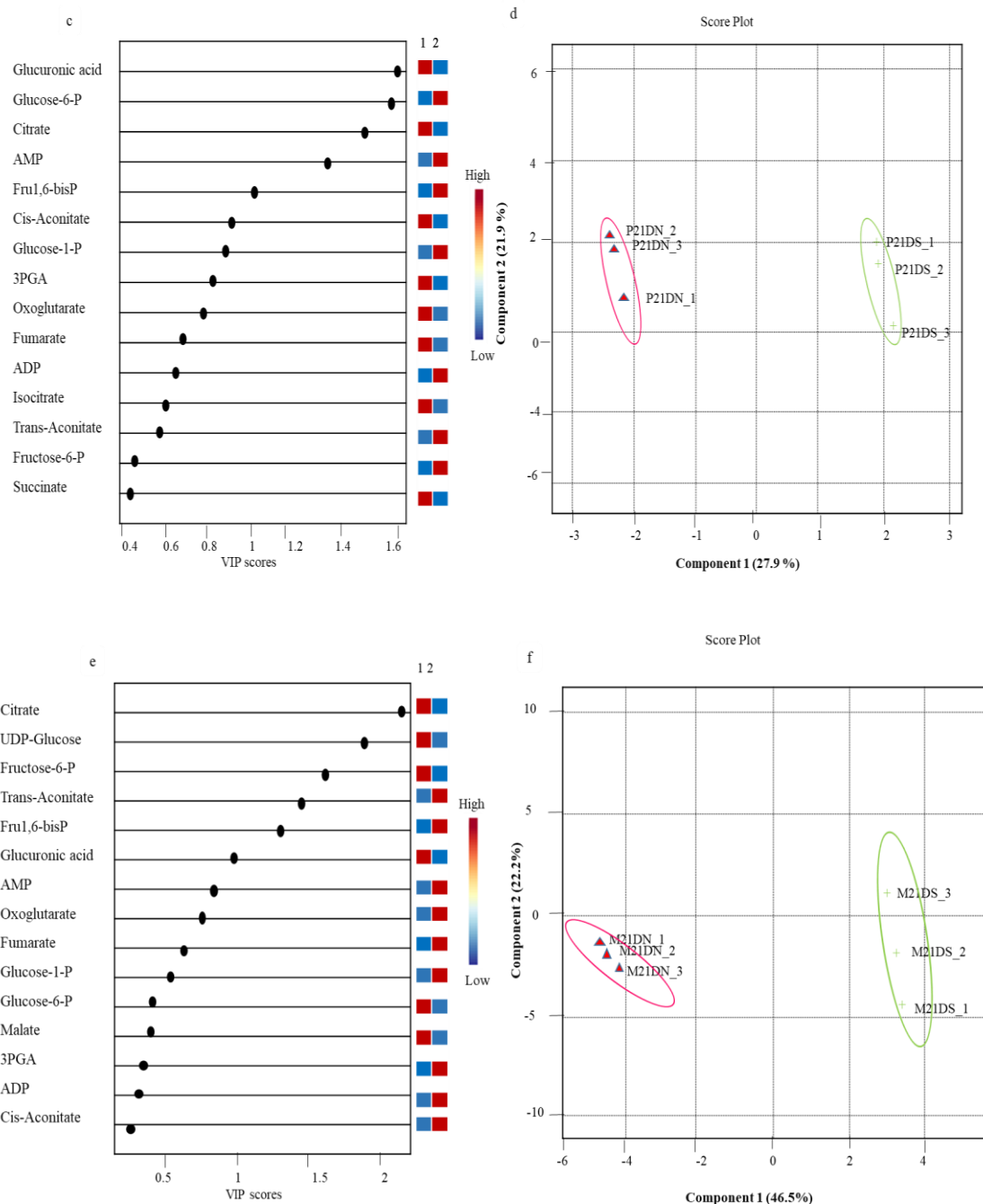
چرخه گلی‌اکسیلات بر تبدیل استیل کوآ به سوکسینات برای سنتز کربوهیدرات‌ها تمرکز دارد (Voss et al. 2013). چرخه اسید تری کربوکسیلیک انرژی سلول و همچنین اسکلت کربنی را برای سنتز اسیدهای آمینه خاص فراهم می‌کند (Vasquez- et al. 2010; Robinet et al. 2008). در یک مطالعه گزارش شد که خشکی چرخه کربس را افزایش می‌دهد، در حالی که دیگران گزارش دادند که خشکی بر آن تأثیر نمی‌گذارد یا تأثیر نامطلوبی بر آن ندارد (Araújo et al. 2012). با اعمال تنش خشکی در روزهای ۲۱ و ۲۸ پس از گلدهی، ژنوتیپ‌های جو تبدیل به برگ‌های پیر می‌شوند و باید متابولیسم کربن خود را تا پایان دوره رشد خود تنظیم کنند. متابولیسم کربن نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیکی (فتوسنتز) و متابولیک گیاه دارد (Paul et al. 2015).

al. 2010). متابولیسم کربن (متابولیسم قند، گلیکولیز، چرخه اسید تری کربوکسیلیک و چرخه گلی اکسیلات) در تولید انرژی و اسکلت‌های کربنی برای رشد و توسعه نقش دارد (Araújo et al. 2012). در ژنوتیپ نیمه متحمل، میزان فروکتوز-۶-فسفات، 3PGA و گلوکز ۶ فسفات در ۲۸ روز پس از گلدهی افزایش یافت که نشان دهنده توانایی این ژنوتیپ در تولید قند است. یک مطالعه نشان داد که میزان فروکتوز ۶ فسفات و گلوکز ۶ فسفات افزایش یافته که نشان دهنده متابولیسم قند در پاسخ به تنش خشکی در JD17 (ژنوتیپ متحمل) افزایش یافته است (Guo et al. 2018). در ژنوتیپ‌های متحمل و نیمه متحمل، گلوکز ۶ فسفات و فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات در ۲۱ روز پس از گلدهی افزایش یافت که این ژنوتیپ متابولیسم نشاسته بالایی برخوردار است. در ژنوتیپ متحمل، ۲۸ روز پس از گلدهی، گلوکز-۶-فسفات و UDP-گلوکز افزایش یافت که نشان می‌دهد. در ژنوتیپ متحمل، تعادل بین متابولیسم قند (گلوکز-۶-فسفات) و مرگ سلولی (UDP-گلوکز) حفظ می‌شود. در ژنوتیپ‌های حساس، فروکتوز ۱، ۶-فسفات، UDP-گلوکز و فروکتوز-۶-فسفات در ۲۱ روز پس از گلدهی افزایش یافت که نشان می‌دهد این ژنوتیپ در متابولیسم نشاسته و ساکارز و PCD نقش دارد. در ۲۸ روز پس از گلدهی، فروکتوز ۱،۶-بیس فسفات، UDP-گلوکز و 3PGA افزایش یافت. UDP-گلوکز در رقم حساس (موروکو) در روزهای ۲۱ و ۲۸ پس از گلدهی افزایش یافت. طبق مطالعه قبلی، UDP-گلوکز به عنوان یک مولکول سیگنال دهنده در گیاهان و تجمع بیش از حد آن در مرگ برنامه ریزی شده سلولی ناشی از UDP-گلوکز (PCD) است (Janse van Rensburg et al. 2018). UDP-گلوکز را می‌توان به عنوان واسطه درون سلولی سیگنال دهی ROS و PCD پیشنهاد کرد. فروکتوز ۱،۶-بیس فسفات (FBP) یک واسطه با انرژی بالا در مسیر گلیکولیتیک است و تولید ATP را افزایش می‌دهد (Veras et al. 2015). در سه ژنوتیپ، سطح نوکلئوتیدها افزایش یافت که نشان دهنده سنتز اسید نوکلئیک هستند که ممکن است منبع انرژی نهایی را برای گیاهان فراهم کند. علاوه بر این، تنش خشکی و پیری منجر به افزایش مشابهی در بیان آنزیم‌های چرخه گلی اکسیلات می‌شود که نشان دهنده عملکرد مهم این متابولیسم در این شرایط است (Singh et al. 2004; Samokhvalov et al. 2005). ژنوتیپ متحمل با استفاده از تره‌هالوز و گلوکز ۶-فسفات تعادلی بین کاهش سرعت فتوسنتز و پیری برگ ایجاد کرد. تجمع قند از اکسید شدن غشای سلولی در اثر کمبود آب جلوگیری می‌کند و سرعت فتوسنتز را در گیاهانی که در شرایط آبی محدود رشد می‌کنند، کاهش می‌دهد. فتوسنتز یکی از فرآیندهای کلیدی است که تثبیت کربن و متابولیسم را تنظیم می‌کند. تنش خشکی سرعت فتوسنتز را کاهش می‌دهد و توزیع و متابولیسم کربن را در گیاه تغییر می‌دهد که منجر به کاهش انرژی و کاهش عملکرد دانه می‌شود (Singh et al. 2005). طبق یک مطالعه، تجمع نشاسته در اندام ذخیره‌سازی یک فعالیت مداوم است که شامل سنتز، انتقال، تجزیه و متابولیسم نشاسته و ساکارز است (Schreiber et al. 2014). پیری نقش کلیدی در شکستن ساکارز دارد که به طور بالقوه نقش کلیدی در تجمع نشاسته دارد.



شکل ۲. تجزیه و تحلیل آماری چند متغیره داده‌های متابولومیکس از جو. نمودارهای امتیاز تجزیه و تحلیل تفکیک حداقل مربعات جزئی (osPLS-DA) ارائه شده است. گروه‌های شاهد (۲۱ روز پس از گلدهی) گروه‌ها قرمز هستند. گروه‌های تحت تنش خشکی به رنگ سبز (b, d, f) هستند. اهمیت متغیر در نمرات پیش بینی (VIP) متابولیت‌های برتر توسط osPLS-DA به دست آمده از طریق پلت فرم مبتنی بر وب MetaboAnalyst (a, c, e) شناسایی شد. جعبه‌های رنگی نشان‌دهنده فراوانی نسبی متابولیت‌های مربوطه در هر گروه تحت مطالعه فعلی است. رنگ‌های قرمز و آبی به ترتیب افزایش و کاهش متابولیت‌ها را توصیف می‌کنند

Figure 2. Multivariate statistical analysis of metabolomics data from barley. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (osPLS-DA) score plots are presented. Control groups (21 days after anthesis) groups are red. Groups under drought stress are in green (b, d, f). Variable significance was identified in the prediction scores (VIP) of top metabolites by osPLS-DA obtained through the MetaboAnalyst web-based platform (a, c, e). The colored boxes indicate the relative abundance of the corresponding metabolites in each group under the current study. Red and blue colors describe the increase and decrease of metabolites, respectively



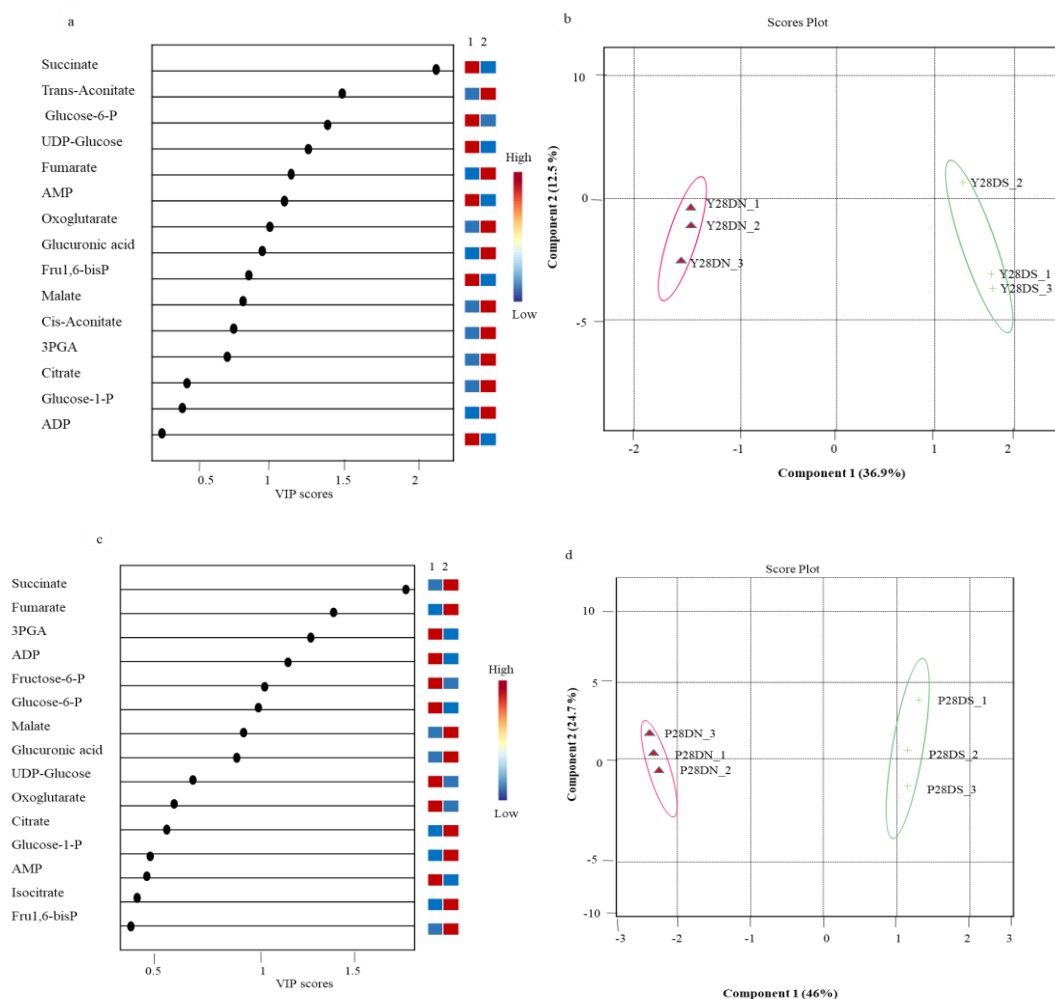
ادامه شکل ۲. c, d, e و f

Figure 2. continued c, d, e and f

بنابراین، انتقال مجدد نشاسته در شرایط تنش، منبع جایگزینی از انرژی و کربن را فراهم می‌کند که باعث می‌شود دانه‌ها حتی در شرایط محیطی استرس‌زا به نتاج سالم بالغ شوند. براساس نتایج حاصل از متابولومیکس می‌توان نتیجه گرفت که متابولیت‌های

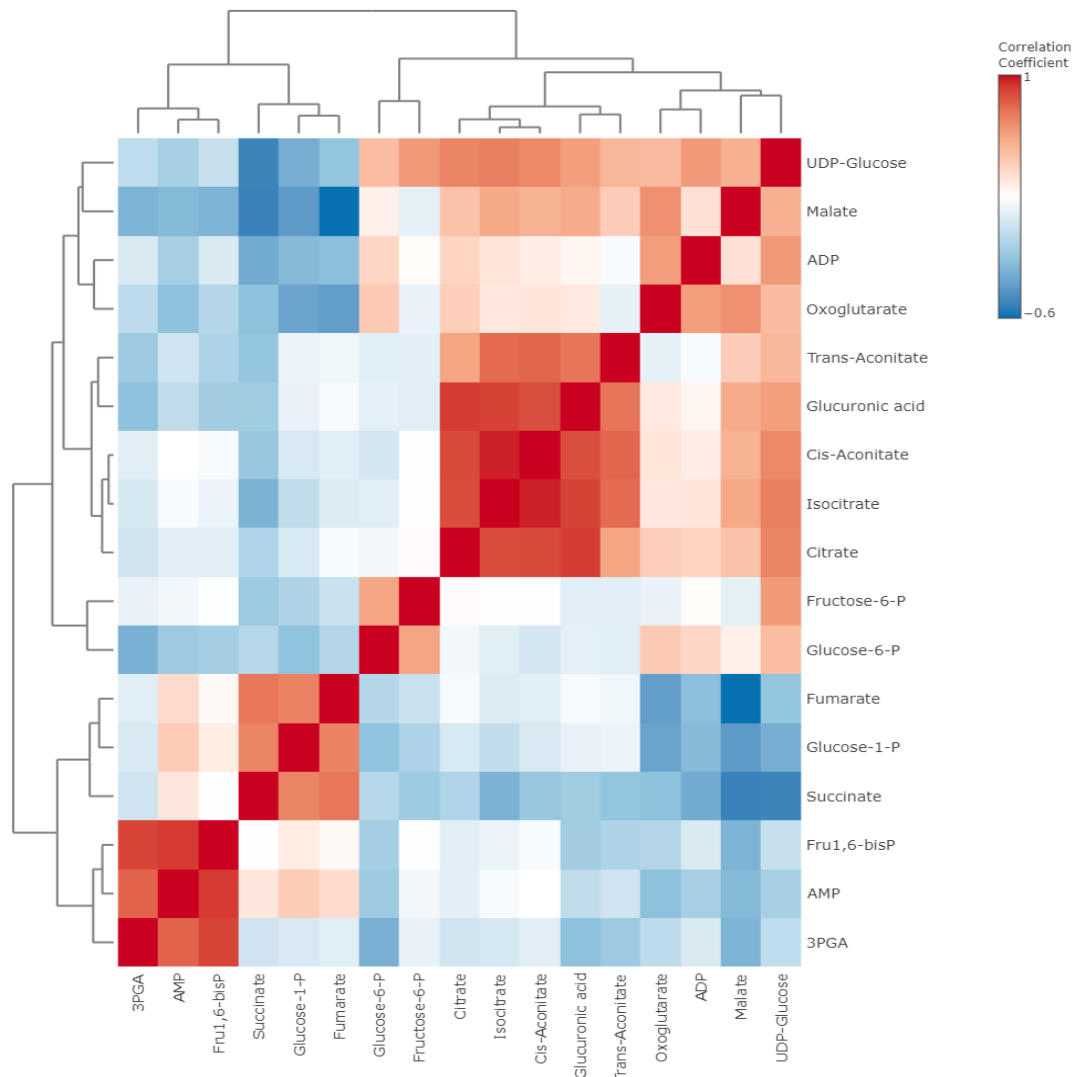
مربوط به پیری مثل (UDP-گلوکز و گلوکز ۶ فسفات) که برای مسیر بیوستنز ترهالوز مناسب بوده در رقم متحمل شناسایی شد که این نشان دهنده تحمل بالای یوسف به تنش خشکی می‌باشد. رقم موروکو متابولیت‌های مرتبط با متابولیسم انرژی، چرخه کربس و گلیکولیز را افزایش داده و انرژی بیشتری در مقایسه با رقم متحمل برای تولید بذر در شرایط تنش خشکی مصرف می‌نماید. در ۲۸ روز بعد از گلدهی، UDP-گلوکز و گلوکز ۶ فسفات در رقم یوسف افزایش یافت. این بسترها پیش نیاز تولید ترهالوز ۶ فسفات هستند. ترهالوز ۶ فسفات سنتاز همبستگی مثبتی با راندمان انتقال مجدد میانگه‌های پنالتیمیت نشان داد که به‌عنوان یک مولکول سیگنال برای در دسترس بودن کربن و در تنظیم تعدادی از فرآیندهای رشد در گیاهان پیشنهاد می‌شود (Meitzel et al. 2020; Wingler, 2011). ترهالوز ۶ فسفات سنتاز با فعال کردن آنزیم‌های کلیدی در سنتز نشاسته در سطح رونویسی، تبدیل ساکارز به نشاسته را ارتقا می‌دهد، که ممکن است آن را به عنوان یک عامل کلیدی در پر کردن دانه پیشنهاد کند (Kolbe et al. 2005). گلوکز ۶ فسفات در رقم یوسف افزایش یافت. گلوکز ۶ فسفات برای تعیین تعادل بین این دو مسیر متابولیک (گلیکولیز و مسیر اکسیداتیو پنتوز فسفات (OPPP) کلیدی است (Liu et al. 2023). ژنوتیپ متحمل توانایی مناسبی برای محافظت از مواد فتوسنتزی خود در شرایط تنش دارد و ژنوتیپ متحمل تعادلی بین کاهش سرعت فتوسنتزی و انتقال مجدد ساقه با استفاده از UDP-گلوکز و گلوکز ۶ فسفات ایجاد کرد. UDP-گلوکز را می‌توان به عنوان واسطه درون سلولی سیگنال‌دهی ROS پیشنهاد کرد (Janse van Rensburg et al. 2018).

در ژنوتیپ‌های متحمل و نیمه متحمل، میزان گلوکز-۶-فسفات و سیس-اکونیتات در ۲۱ و ۲۸ روز پس از گلدهی افزایش یافت. بنابراین، گلوکز-۶-فسفات به عنوان یک بستر برای تبدیل به ترهالوز از طریق آنزیم ترهالوز-۶-فسفات فسفاتاز (T6PP) عمل می‌کند. آنالیز همبستگی متابولیت‌ها در پاسخ به تنش خشکی در ۲۱ روز بعد از گلدهی نشان داد که 3PGA همبستگی مثبت و معنی‌داری با AMP و فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات دارد. همچنین AMP با فروکتوز ۱،۶ بیس فسفات و سوکسینات با گلوکز ۱ فسفات و فومارات همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد. همبستگی مثبت بین گلوکز ۱ فسفات و فومارات و همبستگی منفی بین فومارات و ملات مشاهده شد. سیترات با ایزوسیترات و سیس اکونیتات و گلوکورونیک اسید و UDP-گلوکز همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد. ایزوسیترات با سیس اکونیتات، گلوکورونیک اسید، ترانس اکونیتات و UDP-گلوکز همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین سیس اکونیتات با گلوکورونیک اسید و ترانس اکونیتات مشاهده شد (شکل 4a). آنالیز همبستگی متابولیت‌ها در پاسخ به تنش خشکی در ۲۸ روز بعد از گلدهی نشان داد که 3PGA همبستگی مثبت و معنی‌داری با گلوکز ۶ فسفات و فروکتوز ۶ فسفات دارند. گلوکز ۶ فسفات با فروکتوز ۶ فسفات و UDP-گلوکز همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد. فروکتوز ۶ فسفات با گلوکز ۶ فسفات و UDP-گلوکز همبستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد. AMP با گلوکز ۱ فسفات همبستگی معنی‌داری نشان داد. گلوکز ۱ فسفات با UDP-گلوکز و فومارات با گلوکورونیک اسید همبستگی مثبت و معنی‌داری از خود نشان دادند. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین سیس اکونیتات با ترانس اکونیتات و ایزوسیترات مشاهده شد. گلوکورونیک اسید با سیترات و ایزوسیترات با گلوکورونیک اسید و سیترات همبستگی مثبت و معنی‌داری داشتند (شکل 4b).



شکل ۳. تجزیه و تحلیل آماری چند متغیره داده‌های متابولومیکس از جو. نمودارهای امتیاز تجزیه و تحلیل تفکیک حداقل مربعات جزئی (PLS-DA) ارائه شده است. گروه‌های شاهد (28 روز پس از گلدهی) گروه‌ها قرمز هستند. گروه‌های نمونه تحت تنش خشکی به رنگ سبز (b, d, f) هستند. اهمیت متغیر در نمرات پیش بینی (VIP) متابولیت‌های برتر توسط osPLS-DA به دست آمده از طریق پلت فرم مبتنی بر وب (MetaboAnalyst (a, c, e) شناسایی شد. جعبه‌های رنگی نشان دهنده فراوانی نسبی متابولیت‌های مربوطه در هر گروه تحت مطالعه فعلی است. رنگ‌های قرمز و آبی به ترتیب افزایش و کاهش متابولیت‌ها را توصیف می‌کنند

Figure 3. Multivariate statistical analysis of metabolomics data from barley. Orthogonal partial least squares discriminant analysis (OsPLS-DA) score plots are presented. Control groups (28 days after anthesis) groups are red. Sample groups under drought stress are green (b, d, f). Variable importance was identified in the prediction scores (VIP) of top metabolites by osPLS-DA obtained through the MetaboAnalyst web-based platform (a, c, e). The colored boxes indicate the relative abundance of the corresponding metabolites in each group under the current study. Red and blue colors describe the increase and decrease of metabolites, respectively

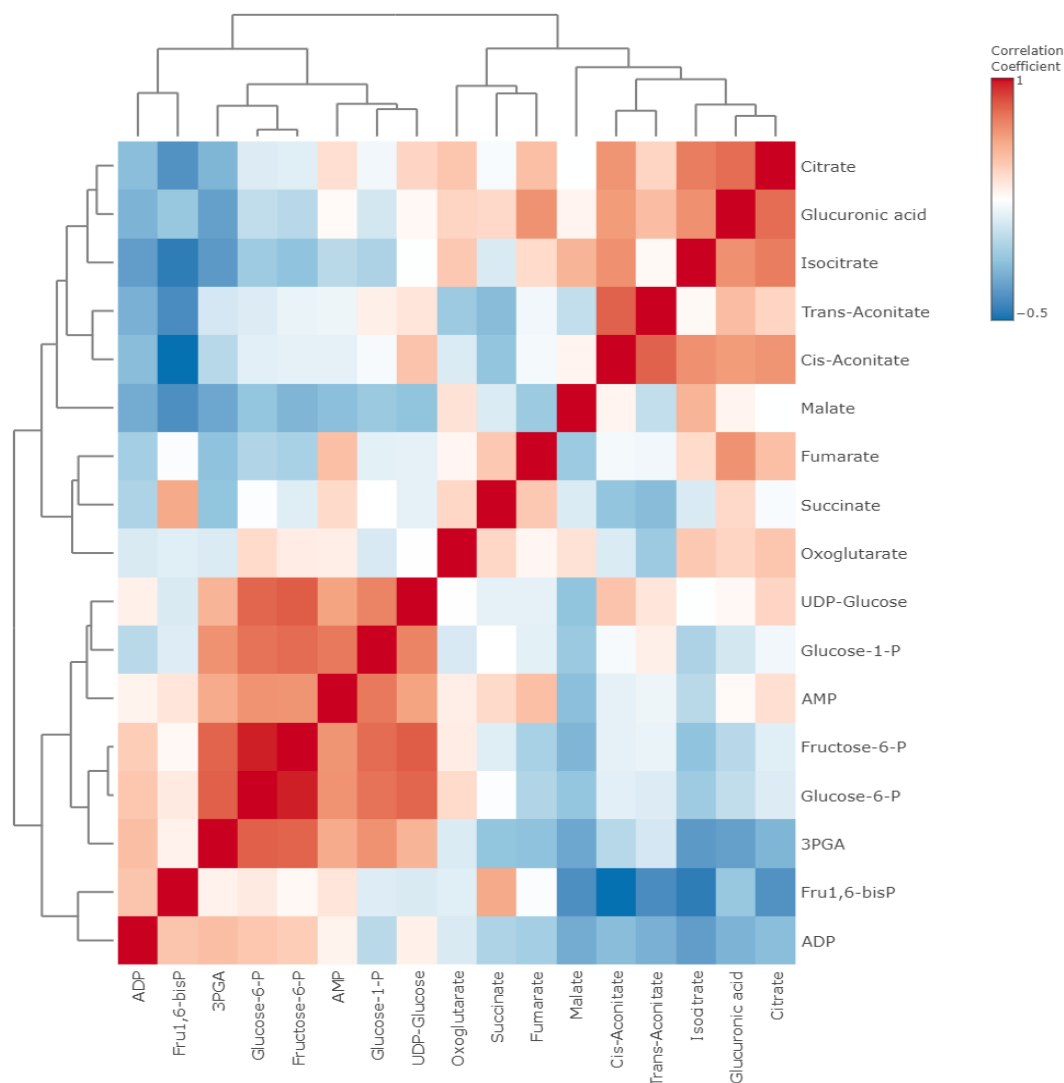


شکل ۴. نقشه حرارتی ضریب همبستگی پیرسون برای ۱۷ نوع متابولیت اندازه‌گیری شده در پنالتیمیت در ۲۱ (a) و ۲۸ (b) روز بعد از گلدهی. رنگ قهوه‌ای نشان‌دهنده همبستگی مثبت و رنگ آبی همبستگی منفی بین متابولیت‌ها و قندها را نشان می‌دهند

Figure 4. Heat map of Pearson correlation coefficient for 17 types of metabolites measured in penultimate at 21 (a) and 28 (b) days after flowering. Brown color shows positive correlation and blue color shows negative correlation between metabolites or amino acids

تجزیه و تحلیل متابولیسی دو رقم گندم به نام‌های بهار (حساس به خشکی) و کویر (متحمل به خشکی) نشان داد که اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی و قندها به‌عنوان متابولیت‌های اصلی به‌دلیل تنش آبی به‌وفور تغییر می‌کنند. به طور خاص، افزایش سطح اسیدهای آمینه پرولین، متیونین، آرژنین، لیزین، آروماتیک و زنجیره شاخه‌ای در رقم بهار مشاهده شد. به نظر می‌رسد تجمع تریپتوفان

باعث حفظ تولید اکسین می‌شود. متابولیت‌های کوپیر تحت تأثیر تنش خشکی قرار گرفتند، جایی که تنها متابولیسم پورین به‌طور قابل توجهی تغییر کرد (Michaletti et al. 2018).



ادامه شکل ۴. b

Figure 4. continued b

تره‌هالوز ۶- فسفات، یک متابولیت سیگنال ضروری، بیوستنز تره‌هالوز را واسطه می‌کند، شاخصی از وضعیت ساکارز در گیاهان که رشد را به متابولیسم کربن مرتبط می‌کند (Figueroa et al. 2016). بیوستنز تره‌هالوز شامل تولید تره‌هالوز ۶- فسفات از گلوکز-۶- فسفات و UDP- گلوکز توسط تره‌هالوز ۶- فسفات سنتاز است (Fichtner and Lunn, 2021). UDP- گلوکز به عنوان یک سیگنال مولکولی در گیاهان و تجمع بیش از حد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ناشی از UDP- گلوکز (PCD) و سیگنالینگ ROS عمل می‌کند (Janse van Rensburg et al. 2018). بنابراین تنش خشکی باعث افزایش قندها و کاهش آمین‌ها و پلی‌آمین‌ها

می‌شود. با افزایش قندها می‌توان به محافظت در پاسخ به تنش خشکی کمک کرد. به این ترتیب، ما چارچوبی را برای درک بهتر مکانیسم‌های کنترل سلول‌های گیاهی در برابر تنش خشکی، با بینشی در مورد مولکول‌هایی که می‌توانند در پروژه‌های اصلاح جو یا انتقال ژن استفاده شوند. در این مطالعه، پروفایل متابولومیکس را در سه ژنوتیپ جو با توانایی مختلف برای مقابله با تنش خشکی توصیف شد و ژن‌های کاندید و مسیرهای متابولیکی کلیدی درگیر در پاسخ به خشکی در جو را با تجزیه و تحلیل متابولومیک شناسایی شد. ROS اضافی تحت تنش خشکی به دلیل اختلال در عملکردهای متابولیکی مختلف و اختلالات فیزیولوژیکی تولید می‌شود. مسیرهای دفاعی آنتی‌اکسیدانی مانند مسیر آسکوربات-گلوتاتیون مورد نیاز برای حذف H_2O_2 اضافی در گیاهان در شرایط خشکی نقش دارد. پاسخ گیاه به تنش خشکی می‌تواند شامل مسیرهای متابولیکی مانند سنتز قند، چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک، گلیکولیز و مسیر پنتوز فسفات اکسیداتیو باشد (Guo et al. 2023).

نتیجه‌گیری: تجزیه و تحلیل متابولیکس مقایسه‌ای از پاسخ ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی و ژنوتیپ‌های حساس به خشکی

باید برای تعیین مکانیسم‌های مرتبط با سازگاری تحمل به خشکی و درک تحمل به خشکی گیاه انجام شود. برای ارزیابی تحمل تنش غیرزیستی در گیاهان از آنالیز متابولیک استفاده شد. اجزای چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک و چرخه گلی‌اکسیلات مانند سترات، سوکسینات و فومارات در ژنوتیپ متحمل در روزهای ۲۱ و ۲۸ پس از گلدهی افزایش یافت، در حالی که ایزوسترات و سترات در ژنوتیپ متحمل در ۲۱ روز پس از گلدهی افزایش یافت. حدواسطه‌های چرخه اسید تری‌کربوکسیلیک و گلی‌اکسیلات که مهم‌ترین چرخه برای تأمین انرژی و اسکلت کربنی هستند، نسبت به متابولیسم قندها و اسیدهای آمینه، تناوب بیشتری نسبت به متابولیسم قندها و اسیدهای آمینه دارند، بنابراین احتمالاً نقش برجسته‌تری در القای مقاومت به خشکی دارد. این مطالعه ممکن است جهت‌گیری‌های بالقوه و منابع ارزشمندی را برای مطالعه بیشتر تنش خشکی در جو فراهم کند. نتایج ما نشان داد که تنش خشکی تفاوت پاسخ‌های متابولومیکس را در دو رقم یوسف، موروکو و لاین PBYT17 نشان می‌دهد. یوسف در مقایسه با موروکو و PBYT17 در شرایط طبیعی و تنش آبی عملکرد عملکرد دانه بالاتری داشت. نتایج ما نشان داد که تنش خشکی باعث افزایش انتقال مجدد ذخایر ساقه در رقم متحمل می‌شود. در مطالعه حاضر، کارایی مرتبط با انتقال مجدد به طور قابل توجهی در میانگه پنا‌تیمیت ژنوتیپ متحمل تحت شرایط تنش خشکی افزایش یافت. این مشاهدات نشان می‌دهد که ژنوتیپ متحمل در مقایسه با ژنوتیپ حساس، انتقال مجدد بیشتری به بذور در حال رشد تحت تنش خشکی دارد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید بهشتی / پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به خاطر حمایت

مالی / حمایت معنوی / همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

References

- Abouzar M, Shahbazi M, Torabi S, et al. (2012) Post-anthesis changes in internodes dry matter, stem mobilization and their relation to the grain Yield of Barley (*Hordeum vulgare* L.). Iran J Plant Physiol 2, 553-557.

- Afsharianzadeh R, Heravan EM, Nasri M, et al. (2024) Water stress affect water relations, photosynthesis and oxidative defense mechanism in wheat (*Triticum aestivum* L.). Emir J Food Agric 36, 1-11.
- Albahri G, Alyamani AA, Badran A, et al. (2023) Enhancing essential grains yield for sustainable food security and bio-safe agriculture through latest innovative approaches. Agronomy 13, e1709.
- Araújo WL, Nunes-Nesi A, Nikoloski Z, et al. (2012) Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. Plant Cell Environ 35, 1–21.
- Bannayan M, Sanjani S, Alizadeh A, et al. (2010) Association between climate indices, aridity index, and rainfed crop yield in northeast of Iran. Field Crops Res 118, 105-114.
- Barazandeh A, Mohammadabadi MR, Ghaderi-Zefrehei M, Nezamabadipour H (2016) Predicting CpG Islands and Their Relationship with Genomic Feature in Cattle by Hidden Markov Model Algorithm. Iran J Appl Anim Sci 6, 571-579.
- Cramer GR, Ergul A, Grimplet J, et al. (2007) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. Funct Integr Genomic 7, 111–134.
- Ehdaie B, Alloush GA, Waines JG (2008) Genotypic variation in linear rate of grain growth and contribution of stem reserves to grain yield in wheat. Field Crops Res 106, 34-43.
- Fichtner F, Lunn JE (2021) The role of trehalose 6-phosphate (Tre6P) in plant metabolism and development. Annu Rev Plant Biol 72, 737-360.
- Figuroa CM, Feil R, Ishihara H, et al. (2016) Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. Plant J 85, 410-423.
- Francia E, Rizza F, Cattivelli L, et al. (2004) Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure'(winter)×'Tremois'(spring) barley map. Theor Appl Genet 108, 670-680.
- Ghaffari MR, Ghabooli M, Khatabi B, et al. (2016) Metabolic and transcriptional response of central metabolism affected by root endophytic fungus *Piriformospora indica* under salinity in barley. Plant Mol Biol 90, 699-717.
- Guo M, Shao Z, Zheng Z, et al. (2023) Downregulation of ferredoxin-NADP⁺ oxidoreductase enhances oxidized pentose phosphate pathway via NADPH/NADP⁺ ratio in the strong resurrection intertidal red alga *Neopyropia yezoensis* with economic value. Algal Res 74, e103204.
- Guo R, Shi L, Jiao Y, et al. (2018) Metabolic responses to drought stress in the tissues of drought-tolerant and drought-sensitive wheat genotype seedlings. AoB Plants 10(2), ply016.

- Höller S, Hajirezaei MR, von Wirén N, et al. (2014) Ascorbate metabolism in rice genotypes differing in zinc efficiency. *Planta* 239, 367-379.
- Hoyle A, Brennan M, Rees L, et al. (2020) Post-anthesis water-stressed barley maintains grain specific weight through altered grain composition and plant architecture. *Plants* 9, e1564.
- Janse van Rensburg HC, Van den Ende W (2018) UDP-glucose: a potential signaling molecule in plants?. *Front Plant Sci* 8, e2230.
- Jorge TF, Rodrigues JA, Caldana C, et al. (2016) Mass spectrometry-based plant metabolomics: Metabolite responses to abiotic stress. *Mass Spectrom. Rev* 35, 620-649.
- Joudi M, Ahmadi A, Mohamadi V, et al. (2012) Comparison of fructan dynamics in two wheat cultivars with different capacities of accumulation and remobilization under drought stress. *Physiol Plant* 144, 1–12.
- Kang Z, Babar MA, Khan N, et al. (2019) Comparative metabolomic profiling in the roots and leaves in contrasting genotypes reveals complex mechanisms involved in post-anthesis drought tolerance in wheat. *PLoS One* 14, e0213502.
- Kolbe A, Tiessen A, Schluepmann H, et al. (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc Natl Acad Sci* 102, 11118-11123.
- Kosová K, Vítámvás P, Urban MO, et al. (2015) Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops—A proteomic perspective. *Int J Mol Sci* 16, 20913–20942.
- Kunze M, Pracharoenwattana I, Smith SM et al. (2006) A central role for the peroxisomal membrane in glyoxylate cycle function. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1441-1452.
- Liu H, Si X, Wang Z, Cao L, et al. (2023) TaTPP-7A positively feedback regulates grain filling and wheat grain yield through T6P-SnRK1 signalling pathway and sugar–ABA interaction. *Plant Biotechnol J* 21, 1159-75.
- Ma HL, Xu XH, Zhao XY, et al. (2015) Impacts of drought stress on soluble carbohydrates and respiratory enzymes in fruit body of *Auricularia auricula*. *Biotechnol Biotechnol Equip* 29, 10-14.
- Meitzel T, Radchuk R, McAdam EL, et al. (2021) Trehalose 6-phosphate promotes seed filling by activating auxin biosynthesis. *New Phytol* 229, 1553-1565.
- Michaletti A, Naghavi MR, Toorchi M, et al. (2018) Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Sci Rep* 8, 1-8.
- Miralles DJ, Abeledo LG, Prado SA, et al. (2021) Barley. In *Crop physiology case histories for major crops* 164-195. Academic Press.

- Mohammadabadi M, Golkar A, Askari Hesni M (2023) The effect of fennel (*Foeniculum vulgare*) on insulin-like growth factor 1 gene expression in the rumen tissue of Kermani sheep. *Agric Biotechnol J* 15, 239-256.
- Mohammadabadi M, Kheyroodin H, Afanasenko V, et al. (2024) The role of artificial intelligence in genomics. *Agric Biotechnol J* 16, 195-279.
- Mohammadinejad F, Mohammadabadi M, Roudbari Z, Sadkowski T (2022) Identification of Key Genes and Biological Pathways Associated with Skeletal Muscle Maturation and Hypertrophy in *Bos taurus*, *Ovis aries*, and *Sus scrofa*. *Animals* 12, 3471
- Safaei SMH, Dadpasand M, Mohammadabadi M, et al. (2022) An *Origanum majorana* Leaf Diet Influences Myogenin Gene Expression, Performance, and Carcass Characteristics in Lambs. *Animals* 13, e14
- Samokhvalov V, Ignatov V, Kondrashova M (2004) Inhibition of Krebs cycle and activation of glyoxylate cycle in the course of chronological aging of *Saccharomyces cerevisiae*. Compensatory role of succinate oxidation. *Biochimie* 86, 39-46.
- Shahsavari M, Mohammadabadi M, Khezri A, et al. (2023) Effect of Fennel (*Foeniculum Vulgare*) Seed Powder Consumption on Insulin-like Growth Factor 1 Gene Expression in the Liver Tissue of Growing Lambs. *Gene Expr* 21, 21-26.
- Tafresh RS, Shobbar ZS, Shahbazi M, et al. (2023) Role of barley stem reserves in the maintenance of grain yield under terminal drought. *Crop Sci* 63,1408-1420.
- Ullah N, Yüce M, Gökçe ZN (2017) Comparative metabolite profiling of drought stress in roots and leaves of seven Triticeae species. *BMC Genom* 18, 1-2.
- Voss I, Sunil B, Scheibe R, et al. (2013) Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biol* 15, 713–722.
- Wang G, Li H, Wang K, et al. (2020) Regulation of gene expression involved in the remobilization of rice straw carbon reserves results from moderate soil drying during grain filling. *Plant J* 101, 604-618.
- Watanabe M, Balazadeh S, Tohge T, et al. (2013) Comprehensive dissection of spatiotemporal metabolic shifts in primary, secondary, and lipid metabolism during developmental senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 162, 1290-1310.
- Wingler A, Delatte TL, O'Hara LE, et al. (2012) Trehalose 6-phosphate is required for the onset of leaf senescence associated with high carbon availability. *Plant Physiol* 158, 1241-1251.