

## آنالیز مقایسه‌ای متابولیت‌های اولیه به منظور شناسایی شبکه‌های متابولیکی تنظیمی در گیر در تشکیل رنگ آبی در گیاه هیدرانژیا ماکروفیلا

راضیه رحمتی<sup>۱</sup>، محمدعلی ابراهیمی<sup>۲\*</sup>، حمید سبحانین<sup>۳</sup>، سیدقاسم حسینی سالکده<sup>۴</sup>، محمدرضا غفاری<sup>۵\*</sup>

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه زیست‌شناسی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

۴. استاد، بخش زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، تهران، ایران

۵. استادیار، بخش زیست‌شناسی سیستم‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۲/۱۶)

### Comparative analysis of primary metabolites to identify regulatory metabolic networks involved in blue color formation in *Hydrangea macrophylla*

Razieh Rahmati<sup>1</sup>, Mohammad Ali Ebrahimi<sup>2\*</sup>, Hamid Sobhanian<sup>3</sup>, Ghasem Hosseini Salekdeh<sup>4</sup>,  
Mohammad Reza Ghaffari<sup>5\*</sup>

1. Ph.D. Candidate of Plant Physiology, Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2. Associate Professor, Department of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

3. Assistant Professor, Department of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

4. Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Tehran, Iran.

5. Assistant Professor, Department of Systems Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education, and Extension Organization, Karaj, Tehran, Iran.

(Received: -Accepted: )

#### Abstract

*Hydrangea macrophylla* is a plant that its blooms turn from pink to blue in the presence of aluminum (Al) and thereby could be considered as a model plant for studying blue color formation. In this study, the metabolite profiling analysis has been performed using ion chromatography coupled to mass spectrometry (IC-MS/MS) and Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) to investigate the regulatory connected network among metabolites during color turning from pink to blue in full bloom of *H. macrophylla* in the presence and absence of aluminum. The metabolite profiles resulted in identification of 35 metabolites including two soluble sugars, six sugar phosphates, two sugar nucleotides, four organic acids, four nucleotides and 17 amino acids. Further, a coordinated change was found in glycolytic metabolites showing changes in flux through a pathway during color formation. Moreover, there was a strong correlation among nitrogenous compounds including glutamine, aspartate, glutamate, glycine and threonine indicating the important role of nitrogen metabolism during blue color formation. These findings will facilitate comprehensive research on the regulatory networks of color change in full bloom in *H. macrophylla*.

**Keywords:** Primary metabolism, blue color formation, aluminum, *Hydrangea macrophylla*

#### چکیده

گیاه ادریسی (*Hydrangea macrophylla*) گیاهی است که رنگ گل‌های آن در حضور آلومینیوم از صورتی به آبی تغییر می‌کند. از این رو می‌تواند به عنوان یک گیاه مدل برای شناسایی شبکه‌های متابولیکی درگیر در تشکیل رنگ آبی مورد بررسی قرار گیرد. در این تحقیق آنالیز پروفایل متابولیت‌ها با استفاده از کروماتوگرافی یونی جفت شده با اسپکترومتری جرمی (IC-MS/MS) و کروماتوگرافی مایع در فشار بالا (UPLC) به منظور بررسی شبکه‌های تنظیمی بین متابولیت‌ها در زمان تغییر رنگ گل از صورتی به آبی، در حضور و عدم حضور آلومینیوم، در گیاه *H. macrophylla* انجام شد. تعیین پروفایل متابولیت‌ها منجر به به شناسایی ۳۵ نوع متابولیت شامل ۲ قند محلول، ۴ قندفسفات، ۲ قند نوکلئوتید، ۴ اسید آلی، ۴ نوکلئوتید و ۱۷ آمینواسید شد. همچنین یک تغییر هماهنگ در متابولیت‌های گلیکولیز یافت شد که نشانگر تغییر در شار متابولیت‌ها در یک مسیر بیوشیمیایی در زمان تغییر رنگ بود. همچنین یک همبستگی بالا بین ترکیبات نیتروژن‌دار از قبیل گلوتامین، اسپارتات، گلوتامات، گلايسین و ترونین وجود داشت که بیانگر نقش مهم متابولیسم نیتروژن در تشکیل رنگ آبی است. این یافته‌ها مطالعات جامع بر روی شبکه‌های تنظیمی تغییر رنگ در گل *H. macrophylla* را تسهیل خواهد کرد.

**واژه‌های کلیدی:** متابولیسم اولیه، تشکیل رنگ آبی، آلومینیوم، هیدرانژیا ماکروفیلا.

## مقدمه

کل گردش مالی صنعت گل و گیاهان زینتی در جهان ۳۰۰ میلیارد دلار برآورد می‌شود. بهبود کیفیت و ظاهر گیاهان زینتی می‌تواند افزایش چند برابری قیمت این گیاهان را به‌مراه داشته باشد (Chandler and Sanchez 2012). در این میان رنگ گل یکی از مهمترین معیارها و خصوصیت تعیین کننده‌ی کیفیت گیاهان زینتی است که نه تنها بر ارزش زینتی یک گیاه تأثیر می‌گذارد بلکه به‌طور مستقیم بر ارزش اقتصادی آن مؤثر است (Zhao and Tao, 2015). در میان رنگ گل‌ها، رنگ آبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. این رنگ، در تعداد زیادی از گیاهان زینتی از قبیل سه گل شاخه بریده‌ی پر فروش میخک (*Dianthus caryophyllus*) داوودی (*Chrysanthemum*) و رز (*Rosa hybrid*) وجود ندارد (Chandler and Tanaka, 2007).

رنگ آبی به‌وسیله آنتوسیانین دلفینیدین-۳-گلیکوزید و از طریق مسیر فنیل پروپانویید تولید می‌شود (Zhang et al., 2014). تاکنون، پژوهش‌های زیادی برای تولید کولتوارهای جدید با رنگ آبی مطلوب در گیاهان زینتی پرفروش، از طریق دست‌کاری ژنتیکی مسیر بیوسنتز آنتوسیانین انجام شده است. Meyer et al., (1987) از ژن دی‌هیدروفلاونول ردوکتاز (DFR) ذرت برای دست‌کاری ژنتیکی مسیر بیوسنتز آنتوسیانین اطلسی استفاده کردند (Meyer et al., 1987). Tanaka et al., (1966) از طریق انتقال ژن *F3'5'H* بنفشه به میخک سفید، میخک متمایل به رنگ بنفش تولید کردند (Tanaka et al., 1998). در سال ۲۰۰۷ انتقال ژن *F3'5'H* بنفشه به گل رز منجر به تولید گل‌هایی شد که با وجود تولید آنتوسیانین‌های با پایه دلفینیدین، رنگ آبی مطلوبی را تولید نکردند (Tanaka et al., 2009). اخیراً، مهندسی ژنتیک

واریته‌های گل داوودی از طریق رویکردی مشابه با مهندسی میخک و رز از طریق انتقال ژن *F3'5'H* انجام شد که منجر به تولید گل‌های اغوانی و بنفش گردید (Noda et al., 2013). با وجود تمام تلاش‌های صورت گرفته، همچنان دستیابی به واریته‌های زینتی جدید با رنگ آبی مطلوب، ناموفق بوده است (Noda et al., 2017).

پیشرفت در زمینه‌های مختلف امیکس از قبیل ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس و متابولومیکس در سال‌های اخیر، منجر به شناسایی هزاران ژن، پروتئین و متابولیت مختلف شده است. ادغام داده‌های حاصل از زمینه‌های مختلف امیکس از طریق رویکرد زیست‌شناسی سامانه‌ای، امکان ایجاد تصویری جامع و روشن از نحوه فعالیت ژنوم، را فراهم آورده است و بدین ترتیب شناسایی ژن‌های کاندیدا برای دست‌ورزی ژنتیکی و مهندسی گیاهان در جهت بهبود صفات موردنظر، امکان‌پذیر شده است (Gupta et al., 2013).

متابولومیکس، بررسی جامع پروفایل متابولیت‌ها در یک سیستم (سلول، بافت و یا موجود زنده) است (Horgan & Kenny, 2011). اندازه‌گیری کمی و کیفی تعداد زیادی از متابولیت‌های سلولی، با استفاده از روش‌های مختلف گروماتوگرافی از قبیل HPLC و کروماتوگرافی یونی (IC) و ترکیب این روش‌ها با طیف‌سنجی جرمی (Mass spectrometry)، دید گسترده‌ای از وضعیت بیوشیمیایی موجود زنده فراهم می‌آورد. پروفایل متابولیت‌ها می‌تواند همراه با سایر داده‌ها، برای بررسی فعالیت ژن‌های درگیر در مسیرهای متابولیکی به‌کار رود (Fiehn, 2002).

به‌منظور بررسی مسیرهای شیمیایی منجر به تولید رنگ، مطالعات مختلفی با رویکرد متابولومیکس در گیاهان انجام شده است. به‌عنوان مثال Lou et al. (2013) به‌منظور یافتن دلیل عدم تشکیل رنگ در

درختچه‌های هورتنسیا از کمپانی آلمانی Kötterheinrich (Lengerich, Germany) تهیه شدند و در موسسه ژنتیک گیاهی و تحقیقات علوم زراعی (IPK) آلمان، در بستری از پیت‌ماس و کوکوپیت به نسبت ۱ به ۱، تحت شرایط گلخانه‌ای ۱۸ ساعت روشنایی با شدت نور ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه، رطوبت نسبی ۶۰ درصد و دمای شبانه ۱۹ و روزانه ۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای تمام گیاهان به‌صورت هفتگی از محلول یک گرم بر لیتر کود Universol Weiß با ترکیب عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم به‌ترتیب با نسبت (۱۹، ۰، ۱۵) استفاده شد.

گیاهان به دو گروه کنترل و تیمار تقسیم شدند. برای گروه تیمار، آلومینیوم به صورت یک گرم بر لیتر آلومینیوم سولفات یکبار در هفته به محلول مذکور اضافه گردید. تیمار آلومینیوم از هفته دوم پس از انتقال گلدان‌ها به گلخانه، به مدت شش هفته انجام شد. نمونه‌برداری از گل‌ها ۷۰ روز پس از آغاز کشت، در شرایطی که گل‌ها کاملاً باز شده و رنگ آن‌ها برای گروه کنترل، صورتی و برای گروه تیمار، آبی رنگ بود، انجام شد. کاسبرگ‌های جمع‌آوری شده فوراً در نیتروژن مایع قرار داده شده و برای استفاده در آزمایشات بعدی در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد درون فریزر نگهداری شدند. این آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی و در شش تکرار انجام شد.

#### اندازه‌گیری قندها و آمینواسیدها

آمینواسیدها و قندها بر اساس روش Höller *et al.* (2014) به‌ترتیب با استفاده از کروماتوگرافی فاز معکوس و روش آنزیمی اندازه‌گیری شدند. به این ترتیب که نمونه‌ها در اتانول ۸۰ درصد به مدت ۶۰ دقیقه در ۸۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. فاز رویی در دستگاه

گل‌های موسکاری (grape hyacinth) سفید، پروفایل متابولیت‌های گل‌های موسکاری سفید و آبی را با یکدیگر مقایسه کردند. این بررسی، حضور آنتوسانین‌های دلفینیدین و سیانیدین را در گل‌های آبی نشان داد. همچنین گل‌های سفید با وجود فقدان آنتوسانین، حاوی متابولیت‌های حد واسط مسیر بیوستنز آنتوسانین بودند. این نتایج بیانگر بلوکه شدن ژن‌های پایین دست مسیر بیوستنز آنتوسانین در گل‌های سفید بود (Lou *et al.*, 2014).

به‌منظور درک بهتر از فرایند تشکیل رنگ طی رسیدن میوه، Hyun *et al.* (2014) پروفایل متابولیت‌ها را طی مراحل مختلف رسیدن میوه در گیاه *Rubus coreanun Miquel* مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده افزایش تجمع آنتوسانین‌ها و کاهش میزان ساکاروز و آمینواسیدها، همزمان با افزایش در میزان تشکیل رنگ بود. همچنین بررسی ترانسکریپتوم در این تحقیق، وجود ارتباط مثبت بین بیان ژن‌های بیوستنز آنتوسانین و تجمع آنتوسانین را آشکار کرد (Hyun *et al.*, 2014).

در تحقیق حاضر، با استفاده از رویکرد متابولومیکس هدفمند، تغییرات مسیرهای متابولیکی اولیه، در زمان تشکیل رنگ آبی در گیاه هیدرانژیا ماکروفیلا مورد بررسی قرار گرفت. در این تحقیق از گیاه هورتنسیا به عنوان مدل برای بررسی تغییرات متابولیکی متابولیت‌های درگیر در تشکیل رنگ گل، در حضور و عدم حضور آلومینیوم در مرحله تشکیل گل کامل استفاده شد. نتایج حاصل از این بررسی مقایسه‌ای می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های متابولیکی درگیر در تشکیل رنگ آبی کمک کرده و در تحقیقات مرتبط با تشکیل رنگ در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد.

#### مواد و روش‌ها

##### کشت گلخانه‌ای گیاهان

اندازه‌گیری شود (Holler et al., 2014).

#### اندازه‌گیری متابولیت‌های اولیه

اندازه‌گیری متابولیت‌های اولیه بر طبق روش Ghaffari et al. (2016) با اندکی تغییرات انجام شد. به این ترتیب که میزان ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت تر به ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج شامل نسبت مساوی از کلروفورم و اتانول اضافه شد و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر آب مخصوص HPLC به هر نمونه اضافه شد و به مدت یک دقیقه به‌طور کامل ورتکس شد و در ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه در rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. فاز بالایی در دمای ۴۰ درجه در دستگاه خلأ قرار گرفت و تبخیر شد. نمونه‌ها در آب مخصوص HPLC حل شدند. کروماتوگرافی یونی متصل به اسپکترومتری جرمی (IC-MS/MS) با استفاده از سیستم ICS-5000 (Dionex) متصل شده به یک ستون چهار قطبی سه گانه Agilent 6490 Triple Quadrupole LC/MS (Agilent) انجام شد. جداسازی کروماتوگرافی با استفاده از ستون AS11-HC با ابعاد ۲×۲۵۰ میلی‌متر متصل به یک ستون محافظ AG11-HC با ابعاد ۱۰×۲ میلی‌متر و یک ستون دام آنیونی (anion trap) انجام شد. این ستون، بین محلول‌ها و ستون جداسازی قرار گرفت تا آلودگی‌های آنیونی موجود در محلول را حذف کند. ستون، به وسیله مخلوطی از آب ۹۶ درصد (آب HPLC) و ۴ درصد KOH با سرعت جریان ۰/۳۸ میلی‌لیتر بر دقیقه متعادل شد. یک شیب برای محلول به‌صورت زیر برقرار شد. ۴ دقیقه برای KOH با غلظت ۴ درصد، ۱۰-۴ دقیقه برای ۱۵ درصد، ۱۴-۱۰ دقیقه ۲۵ درصد، ۲۴-۱۴ دقیقه ۸۰ درصد، ۳۰-۲۴ دقیقه بازگشت به ۴ درصد و در پایان ۳۰-۴۰ دقیقه متعادل سازی در KOH با

خلأ تبخیر شد تا کاملاً خشک شود. نمونه‌های حاصل در آب با درجه خلوص بسیار بالا (moliQ water) حل شدند. قبل از آنالیز با UPLC نمونه‌ها با استفاده از عامل فلورسنت AQC (6-aminoquinolyln-hydroxysuccinimidylcarbamate) مشتق‌سازی (derivatized) شدند. سه میلی‌گرم از AQC در یک میلی‌لیتر استونیتریل حل شد و برای ۴ هفته در منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به ۰/۱۶ میلی‌لیتر از بافر حاوی بوریک اسید ۰/۲ مولار با pH معادل ۸/۸، ۰/۰۲ میلی‌لیتر از هر نمونه و ۰/۰۲ میلی‌لیتر از محلول AQC اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و برای جداسازی با کروماتوگرافی مورد استفاده قرار گرفت (Holler et al., 2014).

سیستم UPLC (AcQuity H-Class, Waters) روی یک ستون فاز معکوس C18 (ACCQ-Tag UltraC18) با سرعت جریان ۰/۷ میلی‌لیتر بر دقیقه و زمان ۱۰/۲ دقیقه برای اندازه‌گیری امینواسیدها استفاده شد.

برای اندازه‌گیری قندهای محلول از همان محلول تهیه شده برای اندازه‌گیری آمینو اسیدها استفاده شد. اندازه‌گیری با استفاده از میکروپلیت ریدر (Synergy HT, Tecan, Crailsheim, Germany) انجام شد. آنزیم‌های کمکی گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (Leuconostoc mesenteroides, 1 U)، هگزوکیناز (1U)، فسفوگلوکزایزومراز (0.3 U) و ۱ میکرولیتر از بتافروکتوزیداز (۱۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میکرولیتر بافر بدون NAD و ATP به‌صورت پشت سر هم به بافر محتوی ۱۰۰ میلی‌مولار imidazole-HCl با pH=۶/۹، ۲ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub>، ۲ میلی‌مولار NAD و ۱ میلی‌مولار ATP افزوده شد تا به ترتیب غلظت گلوکز، فروکتوز و سوکروز

### اندازه‌گیری پروفایل متابولیت‌ها، آمینواسیدها و قندهای محلول

اندازه‌گیری پروفایل متابولیت‌ها، آمینواسیدها و قندهای محلول، در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تیمار شده با آلومینیوم، به‌ترتیب با روش UPLC، IC/MS/MS و Elisa Reader منجر به شناسایی جمعاً ۳۵ نوع متابولیت شد. این متابولیت‌ها شامل ۱۶ متابولیت از انواع متابولیت‌های فسفریله، اسیدهای آلی، نوکلئوتیدها و نوکلئوتید-قندها، ۱۷ آمینواسید و دو قند محلول بودند. لیست متابولیت‌های اندازه‌گیری‌شده در جدول ۱ آورده شده است.

### آنالیز تفکیکی پروفایل متابولیکی با استفاده از PLSDA

به‌منظور تعیین درصد تغییرات فنوتیپی بین نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تیمار شده با آلومینیوم در مرحله تشکیل رنگ آبی، آنالیز تفکیکی حداقل مربعات جزئی (PLSDA partial least squares) که یک آزمون آماری چند متغیره است، انجام شد (شکل ۱). نمونه‌های کاسبرگ تیمار شده با آلومینیوم و نمونه‌های کنترل در طول PCA1 به‌آسانی قابل تفکیک بودند.

PCA1 و PCA2، در مجموع ۴۹ درصد تغییرات را شامل شدند. به‌منظور اعتبارسنجی و تایید آزمون PLSDA، مقادیر  $R^2_x$  و  $Q^2_y$  و نیز میزان دقت (accuracy) آزمون، محاسبه شد (جدول ۲). مقادیر به‌دست‌آمده، نشان‌دهنده سازگاری داده‌ها با مدل مربوطه است.

غلظت ۴ درصد انجام شد. دمای ستون روی ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اندازه‌گیری با اسپکترومتری جرمی، در یک سیستم کروماتوگرافی مایع متصل به اسپکترومتری جرمی (LC/MS) با استفاده از یک ستون چهار قطبی سه گانه Agilent 6490، انجام شد. روش اسپری الکترون (electrospray) یون‌های منفی برای یون دار کردن نمونه‌ها استفاده شد. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار 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.

### آنالیز داده‌ها

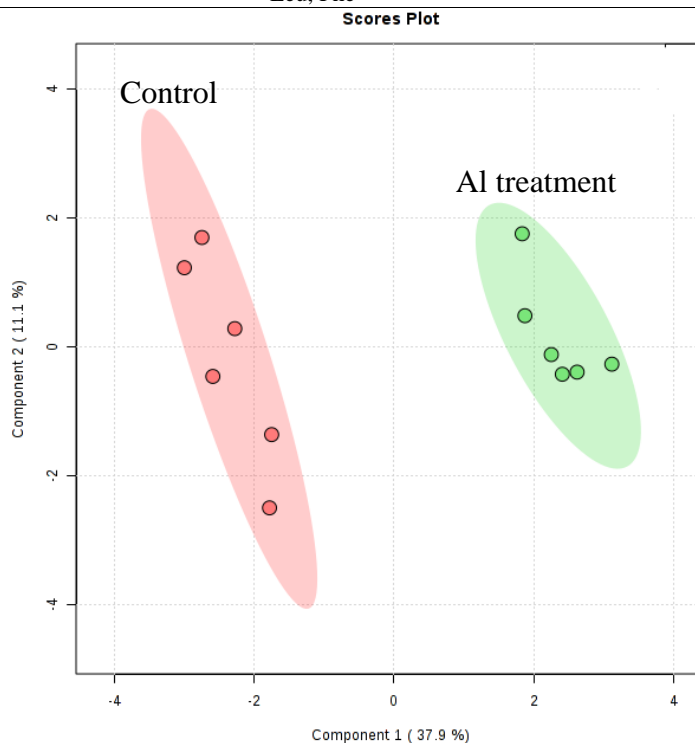
داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پروفایل متابولیت‌ها جهت انجام آنالیزهای آماری و رسم نمودار به نرم‌افزار Metaboanalyst نسخه ۴ وارد شدند. قبل از انجام محاسبات آماری، تمام داده‌ها با محاسبه  $\log_2$  و معیار pareto (Pareto\_scaled) نرمال‌سازی شدند. آنالیزهای آماری چند متغیره (multivariate) شامل آنالیز تفکیکی حداقل مربعات جزئی (PLSDA) انجام شد. همچنین اهمیت متابولیت‌ها و آمینواسیدها در مدل PLSDA، با استفاده از حد آستانه معناداری  $VIP > 1$  به‌دست آمد. همبستگی بین متابولیت‌های اندازه‌گیری‌شده با استفاده از نرم‌افزار metaboanalyst و تحلیل همبستگی پیرسون محاسبه شد.

## نتایج و بحث

جدول ۱. لیست متابولیت‌های اندازه‌گیری‌شده با استفاده از روش‌های مختلف کروماتوگرافی و آنزیمی

Metabolic pathway	Name of metabolites	Metabolite type	Analysis method
Glycolysis, Pentose Phosphate	Fructose-6-P, Glucose-6-P, Manose-6-P,	Phosphorylated metabolites	IC/MS/MS
	Ribulose-5-P, 3-phosphoglycerate, Phosphoenolpyruvate		
Energy metabolism	AMP, UDP, ATP, NADPH	nucleotides	

TCA Cycle	Malate, Citrate, Cis-Aconitate, Oxoglutarate	Organic acids	
Sucrose and Starch metabolism	ADP-Glucose, UDP-Glucose	sugar nucleotides	
Carbon metabolism	Glucose, Fructose	Soluble sugars	Elisa Reader
Nitrogen metabolism	Ala, His, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, Thr, Pro, Orn, Lys, Tyr, Val, GABA, Ilu, Leu, Phe	Amino acids	UPLC



شکل ۱. گراف آنالیز تفکیکی حداقل مربعات جزئی (PLSDA) متابولیت‌ها و آمینواسیدها. گراف، نشان‌دهنده آنالیز PLSDA متابولیت‌ها و آمینواسیدهای کاسبرگ‌های نمونه‌های کنترل (قرمز) و تیمار شده با آلومینیوم (سبز) است. مولفه‌های اصلی (PC1 و PC2) برای ۴۹ درصد از تغییرات فنوتیپی محاسبه شد.

شدند (شکل ۲). بر اساس نمودار حاصل از آزمون VIP مشخص شد که به ترتیب، گلوکز (Glc)، ADP-گلوکز (ADP-Glc)، UDP، گلوکز-۶ فسفات (Glc6-P)، فروکتوز، ۲-اکسوگلوکوتارات (2-Oxo)، فروکتوز-۶ فسفات (Fru6-P)، ۳-فسفوگلیسرات (3PGA)، آسپاراژین (Asn)، گلیسین (Gly)، سیس-آکونیتات (Cis-Aconitate)، ترئونین (Thr)، مالات (malate)، آسپاراتات (Asp) و اورنیتین (Orn) می‌توانند تأثیر بیشتری در تمایز نمونه‌های کنترل و تیمار شده با آلومینیوم داشته باشند.

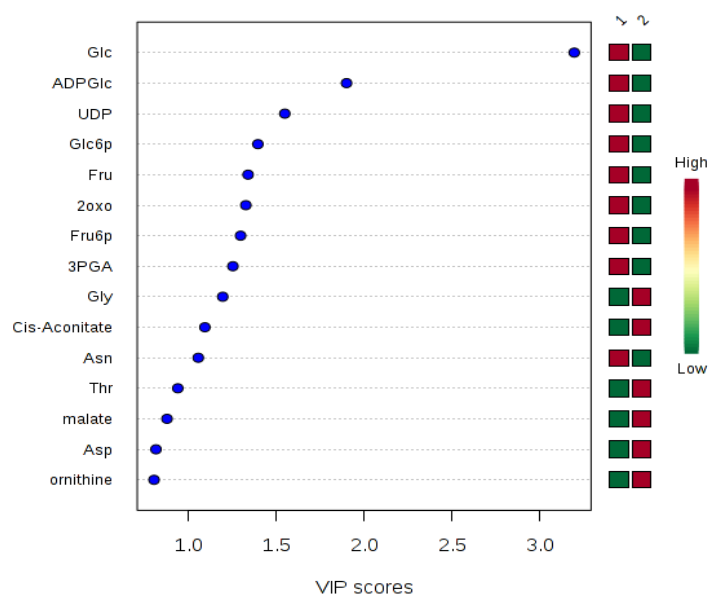
جدول ۲. میزان دقت، R2x و Q2y برای هر یک از مولفه‌های اصلی حاصل از آنالیز PLSDA

	Component 1	Component 2
Accuracy	1	1
R2x	0.98	0.96
Q2y	0.87	0.87

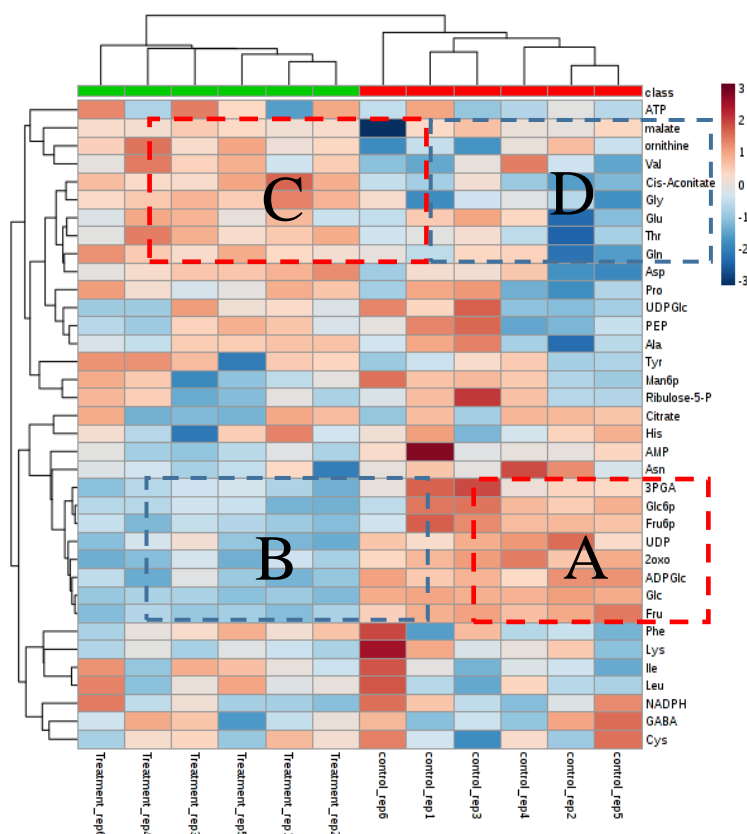
برای شناسایی متابولیت‌هایی که اثرات قوی‌تری بر تفکیک نمونه‌های کنترل و تیمار شده با آلومینیوم از یکدیگر داشتند، مقادیر اهمیت متغیر در طرح‌ریزی (Variable importance in the projection) (VIP) محاسبه شد. مقادیر VIP بزرگ‌تر و یا مساوی ۱ به‌عنوان مقادیر معنی‌دار در نظر گرفته

نمونه‌های تیمار (B) نشان دادند. در حالی که برخی از آمینواسیدها از قبیل اورنی‌تین، والین، آسپاراتات، گلایسین، گلوتامات، گلوتامین، ترئونین، فراوانی بیشتری را در نمونه‌های تیمار شده با آلومینیوم (C) نسبت به نمونه‌های کنترل (D) نشان دادند.

بررسی فراوانی پروفایل متابولیت‌ها و اسیدهای آمینه با استفاده از نقشه حرارتی بیانگر تفاوت در فراوانی متابولیت‌ها بین نمونه‌های کنترل و تیمار بود (شکل ۳). متابولیت‌های مرتبط با متابولیسم کرین از قبیل گلوکز، فروکتوز، فروکتوز-۶-فسفات، گلوکز-۶-فسفات، 3PGA، ADP-گلوکز، 2-OxO فراوانی بیشتری را در نمونه‌های کنترل (A) نسبت به



شکل ۲. مقادیر اهمیت متغیر در طرح‌ریزی (VIP)، برای متابولیت‌ها و آمینواسیدها. مربع‌های رنگی در سمت راست نشان‌دهنده غلظت نسبی متابولیت مربوطه در نمونه‌های کنترل (۱) و تیمار شده با آلومینیوم (۲) است. مقدار VIP بزرگ‌تر، نشان‌دهنده اثر قوی‌تر این ترکیبات در جداسازی نمونه‌ها است.



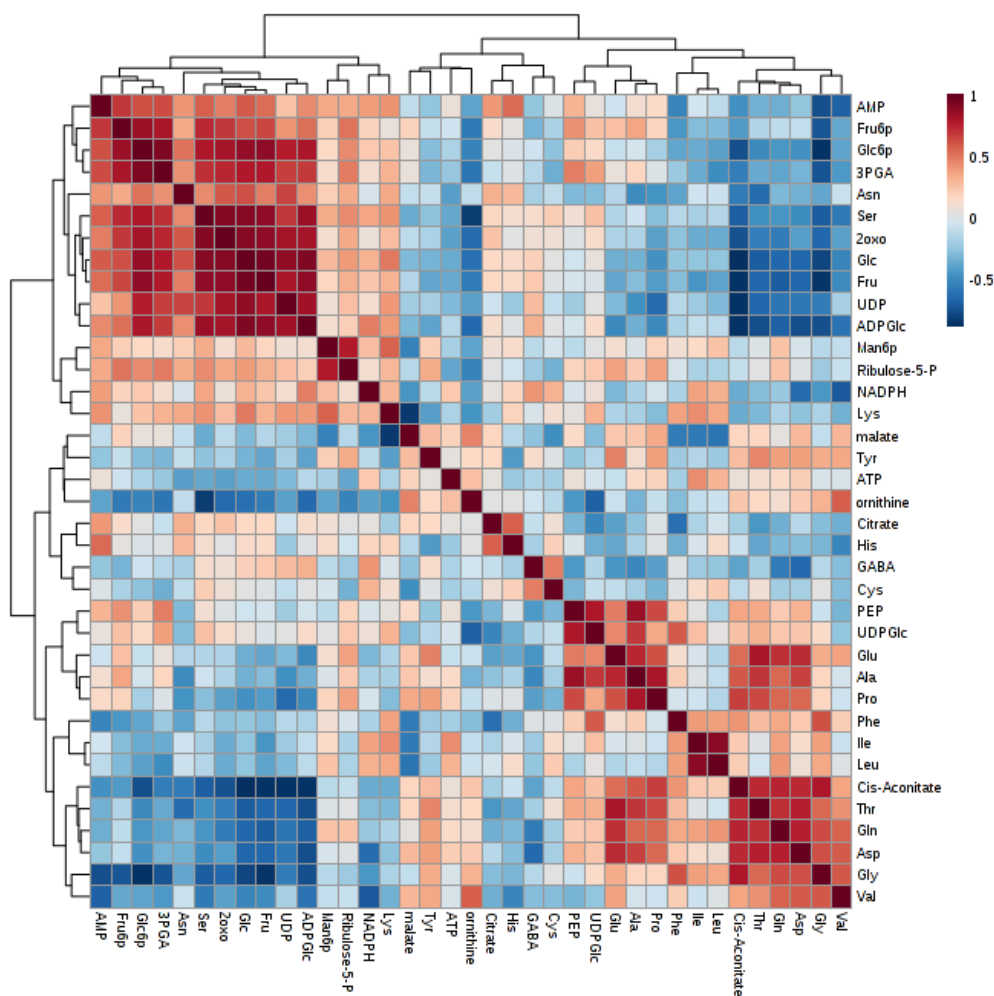
شکل ۳. نقشه حرارتی پروفایل متابولیت‌ها و آمینواسیدها در نمونه‌های کنترل و تیمار شده با آلومینیوم. در بالای شکل رنگ قرمز نشان‌دهنده گروه کنترل و رنگ سبز نشان‌دهنده گروه تیمار شده با آلومینیوم است. تعداد شش تکرار در هر گروه مورد استفاده قرار گرفت. محدوده شدت رنگ از +۳ تا -۳ فراوانی نسبی هر ماده را به ترتیب از فراوانی زیاد (قهوه‌ای) به فراوانی کم (آبی) نشان می‌دهد. حروف A تا D بیانگر گروه‌های تفکیک‌شده‌ای از متابولیت‌ها در نمونه‌های کنترل و تیمار است.

### آنالیز همبستگی بین متابولیت‌ها و آمینواسیدها

از آنجاکه بر اساس مقدار اهمیت متغیر (VIP)، گلوکز به‌عنوان مؤثرترین متابولیت در جداسازی نمونه‌ها شناسایی شد، همبستگی آن با سایر متابولیت‌ها و آمینواسیدها مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۱۶ متابولیت و ۱۷ آمینواسید اندازه‌گیری‌شده، گلوکز دارای همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد با 2-Oxo با ضریب همبستگی (۰/۹۱)، گلوکز ۶-فسفات (۰/۸۱)، فروکتوز ۶- فسفات (۰/۸۴)، 3PGA (۰/۷۸) UDP (۰/۸۷) ADP-گلوکز

(۰/۹۲)، فروکتوز (۰/۹۵) و همبستگی منفی با سیس-اکونیتات (۰/۸۷-)، گلوتامین (۰/۶۴-)، گلایسین (۰/۷۸-)، آسپاراتات (۰/۶۵-)، ترئونین (۰/۶۹-) و اورنی تین (۰/۶۱-) درصد بود. همچنین، نتایج آنالیز همبستگی نشان داد که گلوکز با متابولیت‌های مرتبط با مسیر گلیکولیز و سنتز نشاسته همبستگی مثبت و با برخی از آمینواسیدها همبستگی منفی دارد. نتایج بررسی همبستگی جفتی، در شکل ۴ آورده شده است.





شکل ۴. نقشه حرارتی ضریب همبستگی پیرسون برای ۳۵ نوع متابولیت اندازه‌گیری شده در کاسبرگ‌های هورتنسیا. رنگ قهوه‌ای نشان‌دهنده همبستگی مثبت و رنگ آبی همبستگی منفی بین متابولیت‌ها و یا آمینواسیدها را نشان می‌دهد.

گل‌های تیمار شده می‌تواند به دلیل نیاز به تولید انرژی برای نقل و انتقال آلومینیوم به داخل واکوئل باشد. تاکنون چندین تحقیق، نحوه انتقال آلومینیوم به داخل واکوئل را مورد بررسی قرار داده‌اند (Negishi *et al.*, 2012; Negishi *et al.*, 2013). این بررسی‌ها، چندین ناقل از قبیل HmPALT1، HmVALT1 و HmPALT2، را که از انواع آکوپورین‌ها و آنیون پرمنازها هستند، در کاسبرگ‌های هورتنسیا جهت نقل و انتقال آلومینیوم شناسایی کرده‌اند، اما چگونگی انتقال آلومینیوم توسط این ناقلین همچنان ناشناخته است (Negishi, *et al.*, 2013). با توجه به نتایج بدست آمده از این آزمایش به نظر می‌رسد تجمع آلومینیوم در واکوئل توسط ناقلین، نیازمند شدت مصرف قند و تولید

همچنین مقایسه میزان متابولیت‌های مرتبط با مسیر گلیکولیز از قبیل گلوکز ۶- فسفات، فروکتوز ۶- فسفات، ۳- فسفوگلیسرات و نیز ADP- گلوکز که در متابولیسم نشاسته نقش دارد، بیانگر مقدار بیشتر این متابولیت‌ها در نمونه‌های کنترل نسبت به نمونه‌های تیمار شده با آلومینیوم بود. همچنین محتوای قندهای محلول گلوکز و فروکتوز در نمونه‌های کنترل نسبت به نمونه‌های تیمار شده با آلومینیوم بالاتر بود که نشان دهنده مصرف بیشتر کربن در نمونه‌های تیمار شده با آلومینیوم است. از آنجاکه رنگ آبی در گل‌های هورتنسیا با تجمع آلومینیوم در واکوئل و تشکیل کمپلکس آلومینیوم با دلفینیدین ۳- گلیکوزید ایجاد می‌شود (Schreiber *et al.*, 2011)، افزایش مصرف قند در

انرژی می‌باشد.

مطالعات اندکی بر روی تأثیر آلومینیوم بر متابولیسم کربوهیدرات‌ها انجام شده است (Silva, 2012). در این مطالعات افزایش گلیکولیز تحت تیمار آلومینیوم در تعداد محدودی از گیاهان گزارش شده است. در بررسی ترنسکریپتوم ریشه گیاه هورتنسیا تحت تیمار آلومینیوم، افزایش بیان ژن ۶ فسفوفروکتوکیناز مشاهده شد (Chen *et al.*, 2015). به علاوه در تحقیقی که بر روی پروتئوم ریشه برنج تحت تیمار آلومینیوم انجام شد، مشخص شد که اغلب پروتئین‌های مرتبط با گلیکولیز، از جمله پیروات کیناز، در مواجهه با تیمار آلومینیوم افزایش بیان داشتند (Wang *et al.*, 2014). این نتایج نشان می‌دهد که تحت تیمار آلومینیوم، ATP بیشتری از طریق مسیر گلیکولیز در پاسخ به آلومینیوم تولید می‌شود.

آنالیز همبستگی، همچنین وجود یک همبستگی منفی بین میزان گلوکز، فروکتوز و سایر فرم‌های قندها از قبیل گلوکز-۶-فسفات و فروکتوز-۶-فسفات، با آمینواسیدهای گلوتامین، گلايسين، آسپاراتات و ترئونین را در نمونه‌های تیمار شده با آلومینیوم نشان داد. کاهش محتوای قندها در این نمونه‌ها می‌تواند بر مصرف قندها به منظور تولید اسکلت کربنی مورد نیاز برای تولید آمینواسیدها دلالت داشته باشد. در تطابق با این نتایج، افزایش محتوای آمونیوم و آمینواسیدها در اثر تیمار آلومینیوم در برگ‌های دو رقم ذرت مشاهده شده است (de Souza *et al.*, 2016).

همچنین کاهش میزان نترات- نیتروژن ( $\text{NO}_3\text{-N}$ ) و آسپاراژین و افزایش غلظت  $\text{N}$ - آمینواسید و گلوتامین در شیره آوند چوبی رقم سورگوم متحمل به آلومینیوم مشاهده شد (Gomes *et al.*, 1985).

افزایش آمینواسیدها می‌تواند به افزایش محتوای آمونیوم در گیاه در زمان تیمار آلومینیوم نسبت داده شود. افزایش آمونیوم نیازمند فعالیت آنزیم گلوتامین سنتتاز برای انتقال آمونیوم به گلوتامات و تولید گلوتامین است (de Souza *et al.*, 2016). به علاوه اثر فعال‌سازی کمپلکس آلومینیوم- اسید آلی روی فعالیت گلوتامین سنتتاز (GS) در ریشه‌ها و برگ‌های گندم گزارش شده است (Kertész, 2009; Pécsváradi *et al.*, 2009).

اگرچه گزارش‌ها در مورد تأثیر آلومینیوم بر آمینواسیدها بر ریشه و برگ تعداد محدودی از گیاهان متمرکز شده‌اند اما نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند بیانگر افزایش بیوستنز برخی از آمینواسیدها همزمان با کاهش قندها در گل‌های هورتنسیا تحت تیمار آلومینیوم باشد. با وجود این که قسمت اعظم آمینواسیدها از ریشه و برگ‌ها به گل منتقل می‌شوند اما مطالعات انجام‌شده بر روی گل‌های گیاهان مدل آراییدوپسیس و اطلسی نشان‌دهنده بیوستنز آمینواسیدها در این اندام است (Borghi and Fernie, 2017). به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق، بیانگر تغییر متابولیسم مرکزی کاسبرگ‌های هورتنسیا به صورت کاهش نسبت کربن به نیتروژن با افزایش مصرف قندها و افزایش میزان آمینواسیدها در زمان تشکیل رنگ آبی در حضور آلومینیوم در شکوفه کامل است.

### سپاسگزاری

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران جهت تأمین مالی پروژه و همچنین مؤسسه تحقیقاتی IPK آلمان جهت فراهم کردن امکانات لازم برای تحقیقات متابولومیکس، تشکر و قدرانی می‌شود.

### REFERENCES

- Borghgi M, Fernie AR (2017). Floral metabolism of sugars and amino acids: implications for pollinators' preferences and seed and fruit set. *PLANT PHYSIOL.* 175(4):1510-1524.
- Chandler SF, and Sanchez C (2012). Genetic modification; the development of transgenic ornamental plant varieties. *Plant Biotechnol. J.* 10(8): 891-903.
- Chen H, Lu C, Jiang H, Peng J (2015). Global transcriptome analysis reveals distinct aluminum-tolerance pathways in the Al-accumulating species *Hydrangea macrophylla* and marker identification. *PLoS One.* 10(12): e0144927.
- de Souza LC, Nogueira DCS, Machado LC, Costa TC, da Silva Martins JT, Mendes CAP, de Araujo Brito AE (2016). Nitrogen compounds, proteins and amino acids in corn subjected to doses of aluminum. *AJAR.* 11(17): 1519-1524.
- Fiehn O (2002). Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes. In *Functional genomics* (pp. 155-171): Springer.
- Ghaffari MR, Ghabooli M, Khatabi B, Hajirezaei MR, Schweizer P, Salekdeh GH (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
- Gomes M, Cambraia J, Sant'Anna R, Estevao M (1985). Aluminum effects on uptake and translocation of nitrogen in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). *J Plant Nutr.* 8(6): 457-465.
- Gupta P, Goel R, Pathak S, Srivastava A, Singh SP, Sangwan R.S, Trivedi PK (2013). De novo assembly, functional annotation and comparative analysis of *Withania somnifera* leaf and root transcriptomes to identify putative genes involved in the withanolides biosynthesis. *PLoS One:* 8(5): e62714.
- Höller S, Hajirezaei MR, von Wirén N, Frei M (2014). Ascorbate metabolism in rice genotypes differing in zinc efficiency. *PLANTA.* 239(2): 367-379.
- Horgan RP, Kenny LC (2011). 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics. *Obstet. Gynecol.* 13(3): 189-195.
- Hyun TK, Lee S, Rim Y, Kumar R, Han X, Lee SY, Kim JY (2014). De-novo RNA sequencing and metabolite profiling to identify genes involved in anthocyanin biosynthesis in Korean black raspberry (*Rubus coreanus* Miquel). *PLoS One:* 9(2): e88292.
- Kertész S (2002). Changes in glutamine synthetase activity in presence of aluminium complexes. *Acta Biol.* 46(3-4): 103-104.
- Lou Q, Liu Y, Qi Y, Jiao S, Tian F, Jiang L, Wang Y (2014). Transcriptome sequencing and metabolite analysis reveals the role of delphinidin metabolism in flower colour in grape hyacinth. *J. Exp. Bot.* 65(12): 3157-3164.
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H (1987). A new petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature* 330(6149): 677.
- Negishi T, Oshima K, Hattori M, Kanai M, Mano S, Nishimura M, Yoshida K (2012). Tonoplast-and plasma membrane-localized aquaporin-family transporters in blue hydrangea sepals of aluminum hyperaccumulating plant. *PLoS One* 7(8): e43189.
- Noda N, Aida, R, Kishimoto S, Ishiguro K, Fukuchi-Mizutani, M, Tanaka Y, Ohmiya A (2013). Genetic engineering of novel bluer-colored chrysanthemums produced by accumulation of delphinidin-based

- anthocyanins. *Plant Cell Physiol.* 54(10): 1684-1695.
- Noda N, Yoshioka S, Kishimoto S, Nakayama M, Douzono M, Tanaka Y, Aida R (2017). Generation of blue chrysanthemums by anthocyanin B-ring hydroxylation and glucosylation and its coloration mechanism. *Sci Adv.* 3(7): e1602785.
- Pécsváradi A, Nagy Z, Varga A, Vashegyi Á, Labádi I, Galbács G, Zsoldos F (2009). Chloroplastic glutamine synthetase is activated by direct binding of aluminium. *PHYSIOL PLANTARUM.* 135(1), 43-50.
- Schreiber HD, Jones AH, Lariviere CM, Mayhew KM, Cain JB (2011). Role of aluminum in red-to-blue color changes in *Hydrangea macrophylla* sepals. *Biometals.* 24(6): 1005-1015.
- Silva S (2012). Aluminium toxicity targets in plants. *J Bot.* 2012.
- Tanaka Y, Brugliera F, Chandler S. (2009). Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *Int. J. Mol. Sci.* 10(12): 5350-5369.
- Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T. (1998). Metabolic engineering to modify flower color. *Plant Cell Physiol.* 39(11): 1119-1126.
- Wang ZQ, Xu XY, Gong QQ, Xie C, Fan W, Yang JL, Zheng SJ (2014). Root proteome of rice studied by iTRAQ provides integrated insight into aluminum stress tolerance mechanisms in plants. *J. Proteomics.* 98: 189-205.
- Zhao D, Tao J (2015). Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. *Front Plant Sci.* 6: 261.