

Metabolic analysis of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings under high salinity stress using GC-MS method and principal component analysis (PCA)

M. Akbarzadeh Lelekami^{1*}, M.H. Pahlevani², Kh. Zaynali Nezhad³, K. Mahdavi Mashaki⁴, A.P.M. Weber⁵, D. Brillhaus⁶

1. Former PhD student, Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Associate Professor of Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3. Assistant Professor of Plant Breeding and Biotechnology Department, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
4. Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Amol, Iran
5. Professor of Plant Biochemistry Department, Heinrich Heine University (HHU), Düsseldorf, Germany
6. Assistant Professor of Plant Biochemistry Department, Heinrich Heine University (HHU), Düsseldorf, Germany

Received 03 May 2021; Accepted 22 June 2021

Extended abstract

Introduction

Salinity as one of the major abiotic stresses influences plant growth and development. Rice with a salt tolerance threshold of 3 ds/m is regarded as a very sensitive crop, especially at seedling stage. Metabolite profiling is conducted by instruments such as GC-MS (Gas chromatography–mass spectrometry) and permits the study of plant responses to environmental stresses at the molecular level. The present study assessed the primary metabolite profiles related to high salinity stress in sensitive (IR28) and tolerant (CSR28) genotypes of rice seedlings in shoots and roots after 6h and 54 h salinity exposure.

Material and methods

The seeds of two rice (*Oryza sativa* L. ssp. Indica) genotypes with different salinity tolerance were obtained from International Rice Research Institute (IRRI) in Philippines. The plants were grown hydroponically in the greenhouse of Heinrich-Heine-University (HHU), Düsseldorf, Germany. The two-week old seedlings were exposed to 150 mM (15 ds/m) NaCl salinity. The topmost parts of the plants were harvested (in five replications of 10 seedlings each) at 6h and 54h post-treatment. Metabolite extraction was performed by GC-MS method. The experiment was conducted as factorial in a completely randomized design (CRD) and significance level was tested using ANOVA in SAS v9.2 software. R software was used for Principal Component Analysis (PCA) using metabolite z-score data

Results and discussion

GC-MS analysis identified 37 primary metabolites including 18 amino acids (AAs), five sugars and sugar alcohols and 14 organic acids (OAs) in roots and shoots of the CSR28 and IR28 genotypes at 6h and 54h post-salt exposure. In response to salinity, amino acids and sugars accumulated and organic acids

* Corresponding author: Mojdeh Akbarzadeh Lelekami; E-Mail: m.akbarzade67@yahoo.com



depleted in both genotypes. Long-term stress revealed pronounced differences between the two genotypes. The major osmolyte proline indicated maximum response to salinity in CSR28 shoots, while the stress marker GABA accumulated more in IR28 shoots. Under high salinity the osmoprotectants raffinose and myo-inositol increased in CSR28 roots. Principal Component Analysis (PCA) revealed amino acid accumulations in the long-term exposure of salt stress in roots are main contributors to differentiate the genotypes for salt tolerance.

Conclusions

Based on GC-MS analysis, 83.3% increase in amino acids and 61.8% decrease in organic acids were observed in response to salinity, indicating an increase in osmotic adjustment mechanisms and a decrease in photosynthetic reactions in the genotypes, respectively. The PCA demonstrated that amino acids play the most important role in separating the samples under salinity stress and control conditions in both organs. Further, the genotypes were differentiated due to metabolic changes in roots in response to salinity particularly in the long-term stress. Proline which is one of the most important osmolytes involved in abiotic stresses was significantly higher in the shoots of CSR28 under the long-term salinity compared to that of IR28. On the other hand, GABA which is a stress marker accumulated more in the shoots of the sensitive genotype. Some metabolites such as aspartate myo-inositol, citrate, glycerate, isocitrate and shikimate were specifically accumulated in roots. Finally, proline, GABA, etc. can be used as biomarkers for selecting salt tolerant lines. The present study highlights the contribution of metabolic adaptation to salinity tolerance.

Acknowledgements

We appreciate the International Rice Research Institute (IRRI) for providing the seeds. We also acknowledge the excellent technical assistance of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GAU), Gorgan, Iran and Heinrich-Heine-University (HHU), Düsseldorf, Germany.

Keywords: Hydroponic culture, Metabolomics, Osmolytes, Proline, Salinity tolerance.

تجزیه و تحلیل متابولیکی گیاهچه‌های برنج (*Oryza sativa* L.) در پاسخ به شوری بالا با استفاده از روش GC-MS و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

مژده اکبرزاده للکامی^{۱*}، محمدهادی پهلوانی^۲، خلیل زینلی نژاد^۳، کیوان مهدوی ماشکی^۴، آندریاس پی.ام وبر^۵، دومینیک بریل هاوس^۶

۱. دانشجوی سابق دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۲. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۳. استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
۴. استادیار پژوهش موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل
۵. استاد گروه بیوشیمی گیاهی، دانشگاه HHU، دوسلدورف، آلمان
۶. استادیار گروه بیوشیمی گیاهی، دانشگاه HHU، دوسلدورف، آلمان

مشخصات مقاله	چکیده
واژه‌های کلیدی:	برنج (<i>Oryza sativa</i> L.) به‌عنوان غذای اصلی نیمی از جمعیت دنیا محسوب می‌شود. تنش‌های محیطی نظیر شوری
اسمولیت‌ها	تأثیر منفی بر عملکرد برنج دارند. با توجه به حساس بودن برنج به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای، مقایسه
پرولین	ژنوتیپ‌های متحمل و حساس در این مرحله به شناسایی مکانیسم‌های مولکولی درگیر و توسعه ارقام متحمل کمک
تحمل به شوری	خواهد کرد. در این تحقیق اثر شوری بالا روی تجمع متابولیت‌ها در اندام‌های ریشه و هوایی ژنوتیپ‌های حساس
کشت هیدروپونیک	(IR28) و متحمل (CSR28) در زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت پس از تیمار، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحقیق نشان
متابولومیکس	داد که اسیدهای آمینه و قندها در هر دو ژنوتیپ در پاسخ به شوری افزایش و اسیدهای آلی کاهش نشان دادند. تیمار
تاریخ دریافت:	طولانی‌مدت شوری منجر به تفاوت بیشتر ژنوتیپ‌ها در پاسخ‌های متابولیکی شد. پرولین به‌عنوان یکی از مهم‌ترین
۱۴۰۰/۰۲/۲۸	اسمولیت‌ها بیشترین تجمع را در اندام‌های هوایی ژنوتیپ متحمل نشان داد، در حالی که گابا به‌عنوان نشانگر وقوع
تاریخ پذیرش:	تنش در اندام‌های هوایی ژنوتیپ حساس تجمع بیشتری داشت. تجمع بیشتری از قندهای تنظیم‌کننده اسمزی نظیر
۱۴۰۰/۰۴/۰۱	رافینوز و میواینوزیتول در ریشه ژنوتیپ متحمل مشاهده شد. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که بین دو
تاریخ انتشار:	ژنوتیپ حساس و متحمل در اندام ریشه و زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت بیشترین اختلاف متابولیکی وجود دارد.
بهار ۱۴۰۲	همچنین برخی از متابولیت‌ها نظیر آسپاراتات، میواینوزیتول و سترات در شرایط مختلف به‌صورت اختصاصی تجمع
۱۶(۱): ۷۱-۸۱	یافتند که می‌توانند در غربالگری ژنوتیپ‌های برنج برای تحمل به شوری مورد توجه قرار گیرند. نتایج این تحقیق نقش
	سازگاری‌های متابولیکی نظیر تنظیم اسمزی را در القای تحمل به شوری برنج پررنگ می‌کند.

مقدمه

شوری به‌عنوان یکی از تنش‌های غیرزیستی مهم، رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Ahmad and Prasad, 2011; Reddy, 2015). حدود ۶ درصد (۸۰۰ میلیون هکتار) از مساحت کره زمین تحت تأثیر شوری قرار دارد. همچنین، شوری به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم روی ۲۰ درصد از زمین‌های تحت آبیاری کشاورزی اثر می‌گذارد

جمعیت دنیا تا سال ۲۰۵۰ به بیش از ۹ میلیارد نفر خواهد رسید و از این رو تولید محصولات زراعی می‌بایست به دو برابر مقدار کنونی برای تأمین نیاز غذایی بشر برسد (Hunter et al., 2017). تنش‌های غیرزیستی نظیر شوری، خشکی، گرما و سرما که به‌واسطه تغییرات آب‌وهوایی تشدید شده‌اند، از مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر تولید محصولات زراعی هستند.

2014; Nam et al., 2015; Wang et al., 2016; Gupta and De, 2017). با توجه به منابع ژنتیکی گسترده در برنج و همچنین دینامیک بودن پاسخ‌ها به شوری، امکان کسب اطلاعات بیولوژیکی بیشتر با استفاده از ژنوتیپ‌ها، اندام‌ها و زمان‌های نمونه‌برداری مختلف فراهم می‌شود. از این‌رو در تحقیق حاضر، متابولیت‌های اولیه شامل اسیدهای آمینه، قندها و اسیدهای آلی در پاسخ به شوری بالا در اندام‌های ریشه و هوایی از ژنوتیپ‌های برنج حساس (IR28) و متحمل (CSR28) در زمان‌های نمونه‌برداری ۶ و ۵۴ ساعت پس از تیمار، مورد مطالعه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار شوری

بذور دو ژنوتیپ حساس (IR28) و متحمل (CSR28) از دو زیرگونه برنج ایندیکا از موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج (IRRI^۳) در فیلیپین تهیه شدند. پس از ضدعفونی و جوانه‌زنی بذور، گیاهچه‌ها به درون تشت‌های حاوی محیط کشت یوشیدا (Yoshida et al., 1971) منتقل و در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه HHU^۴ واقع در شهر دوسلدورف کشور آلمان تحت شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی/۱۰ ساعت تاریکی و رژیم دمایی 28 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از دو هفته، گیاهچه‌ها در معرض تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولار (15 dS m^{-1}) قرار گرفتند، در حالی که هدایت الکتریکی گیاهان رشد یافته در تیمار شاهد 1 dS m^{-1} بود. ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گیاهان (در پنج تکرار و ۱۰ گیاهچه در هر تکرار) در زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت پس از اعمال تنش، جمع‌آوری و پس از فریزری در ازت مایع در فریزر منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

استخراج و اندازه‌گیری متابولیت‌ها

نمونه‌ها پس از خروج از فریزر پودر شده و به صورت خشک انجمادی درآمدند. ۱۰ میلی‌گرم از نمونه‌های خشک انجمادی با ۱/۵ میلی‌لیتر از مخلوط آب، متانول و کلروفرم (به نسبت حجمی ۵: ۱/۱: ۲) و ۵ میکرومول ریبتول به عنوان استاندارد داخلی استخراج و در فریزر منفی ۲۰ درجه سلسیوس ذخیره شدند. استخراج و تجزیه GC-MS با استفاده از پروتکل اقتباس شده از لیزک و همکاران (Lisek et al., 2006) و گو

(Munns and Tester, 2008). نخستین علائم تنش شوری به صورت اختلال اسمزی در نتیجه جذب نمک توسط ریشه‌های گیاه بروز می‌کند که منجر به تنش آبی می‌گردد. در ادامه سمیت یونی به واسطه عدم توازن یون‌ها در سیتوزول ایجاد می‌گردد. گیاهان متحمل از این شرایط سخت با اتخاذ مکانیسم‌های سازگاری شامل تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی عبور می‌کنند (Acosta-Motos et al., 2017; Hernández, 2019).

برنج با سطح زیر کشت ۱۶۲ میلیون هکتار و تولید ۷۵۵ میلیون تن در سال به عنوان غذای اصلی نیمی از جمعیت دنیا محسوب می‌شود. در ایران نیز این گیاه دارای وسعت کاشت ۸۹۲ هزار هکتار و تولید ۴/۴۲ میلیون تن است (FAO, 2019; Agricultural Statistics, 2019). برنج با آستانه تحمل به شوری 3 dSm^{-1} به عنوان گیاه بسیار حساس به شوری در مراحل گیاهچه‌ای و زایشی محسوب می‌شود (Lutts et al., 1995; Hoang et al., 2016). تجمع سدیم در اندام‌های هوایی برنج بیشترین نقش مخرب را در کاهش باروری و عملکرد در تیمارهای طولانی مدت شوری ایفا می‌کند (El Mahi et al., 2019).

فناوری‌های امیکس^۱ نظیر متابولومیکس یک تجزیه و تحلیل گسترده از فرایندهای متابولیکی را در پاسخ به عواملی نظیر تنش شوری ارائه می‌دهند (Kumar et al., 2017). پروفایلینگ متابولیت‌ها از طریق ابزارهایی نظیر GC-MS^۲ انجام می‌شود که امکان مطالعه واکنش‌های گیاهان به تنش‌های محیطی را در سطح مولکولی فراهم می‌آورند. اندازه‌گیری جامع از سطوح کمی و کیفی متابولیت‌های سلولی در بافت‌های در معرض تنش، یک دید وسیع از واکنش‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاهان به تنش‌ها به وجود می‌آورد. همچنین متابولیت‌ها به عنوان محصول نهایی بیان ژن محسوب می‌شوند که در ارتباط نزدیک با فنوتیپ هستند که ارزش مطالعه آن‌ها را دوچندان می‌کند (Fiehn, 2002; Kim et al., 2006; Piasecka et al., 2019).

نقش برخی از متابولیت‌ها نظیر اسیدهای آمینه، قند-الکل‌ها و اسیدهای آلی در تنظیم اسمزی، هومئوستازی یونی، فتوسنتز و پیری برگ در بعضی مطالعات صورت گرفته در برنج تحت تیمار شوری ارزیابی شده است (Zhao et al., 2019).

³ International Rice Research Institute

⁴ Heinrich-Heine-University

¹ Omics

² Gas chromatography-mass spectrometry

اسیدهای آمینه

از ۱۸ اسید آمینه شناسایی شده، ۹۴/۴ درصد از تغییرات در پاسخ به شوری معنی‌دار بودند که ۸۳/۳ درصد از این تغییرات به صورت افزایش و ۱۱/۱ درصد به صورت کاهش تجمع در مقایسه با شرایط شاهد بودند. بیشترین مقدار افزایش در پاسخ به شوری مربوط به اسیدهای آمینه ایزولوسین (۴۲/۸ برابر)، لوسین (۳۱/۰۶ برابر) و پرولین (۳۶/۰۵ برابر) بود که هر سه متعلق به اندام هوایی ژنوتیپ CSR28 در زمان ۵۴ ساعت پس از اعمال شوری بودند. در مقایسه بین ژنوتیپ‌ها در ۶ ساعت پس از شوری در اندام ریشه، تنها سه اسید آمینه آلفا-آلانین، گابا و متیونین افزایش معنی‌دار در CSR28 نسبت به IR28 نشان دادند، در حالی که در زمان ۵۴ ساعت پس از تیمار شوری، به طور قابل توجه در ۱۴ اسید آمینه افزایش تولید معنی‌دار نسبت به IR28 وجود داشت. علاوه بر این در اندام‌های هوایی نیز، در زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت پس از اعمال شوری، ژنوتیپ CSR28 نسبت به IR28 به ترتیب در ۶ و ۱۲ اسید آمینه دارای تجمع بیشتر بود. اسیدهای آمینه به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی عمل می‌کنند و با حفظ تورژسانس سلولی، از اجزای سلول در برابر تنش‌های اکسیدکننده محافظت می‌کنند (Batista-Silva et al., 2019). در این تحقیق در هر دو اندام با افزایش مدت زمان تیمار شوری تجمع اسیدهای آمینه افزایش یافت که نشان می‌دهد که با تجمع بیشتر سدیم در اثر تنش شوری طولانی مدت، نقش حفاظت اسمزی اسیدهای آمینه حیاتی‌تر می‌شود. به طور قابل توجه، در شوری طولانی مدت در هر دو اندام اختلاف ژنوتیپ‌ها در تجمع اسیدهای آمینه افزایش یافت، به طوری که در ریشه‌ها تجمع اکثر اسیدهای آمینه شناسایی شده در زمان ۵۴ ساعت در ژنوتیپ CSR28 بیشتر از IR28 بود که بیانگر نقش ویژه مسیرهای متابولیکی ریشه در القای تحمل به شوری در CSR28 است.

پرولین به عنوان یکی از مهم‌ترین متابولیت‌های اولیه علاوه بر نقش به عنوان اسمولیت و تنظیم‌کننده اسمزی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محافظت از ماکرومولکول‌ها در برابر ROSها نیز هست (Yoshiba et al., 1997; Liang et al., 2013). تجمع پرولین در ارتباط مستقیم با تحمل به تنش‌های غیرزیستی گزارش شده است (Szabados and Savoure, 2010).

و همکاران (Gu et al., 2012) که قبلاً توسط شیم و همکاران (Shim et al., 2020) تشریح شده است، صورت پذیرفت. برای کمی‌سازی نسبی، سطح پیک متابولیت‌ها با استفاده از وزن نمونه‌ها و سطح پیک استاندارد داخلی ریپیتول نرمال شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

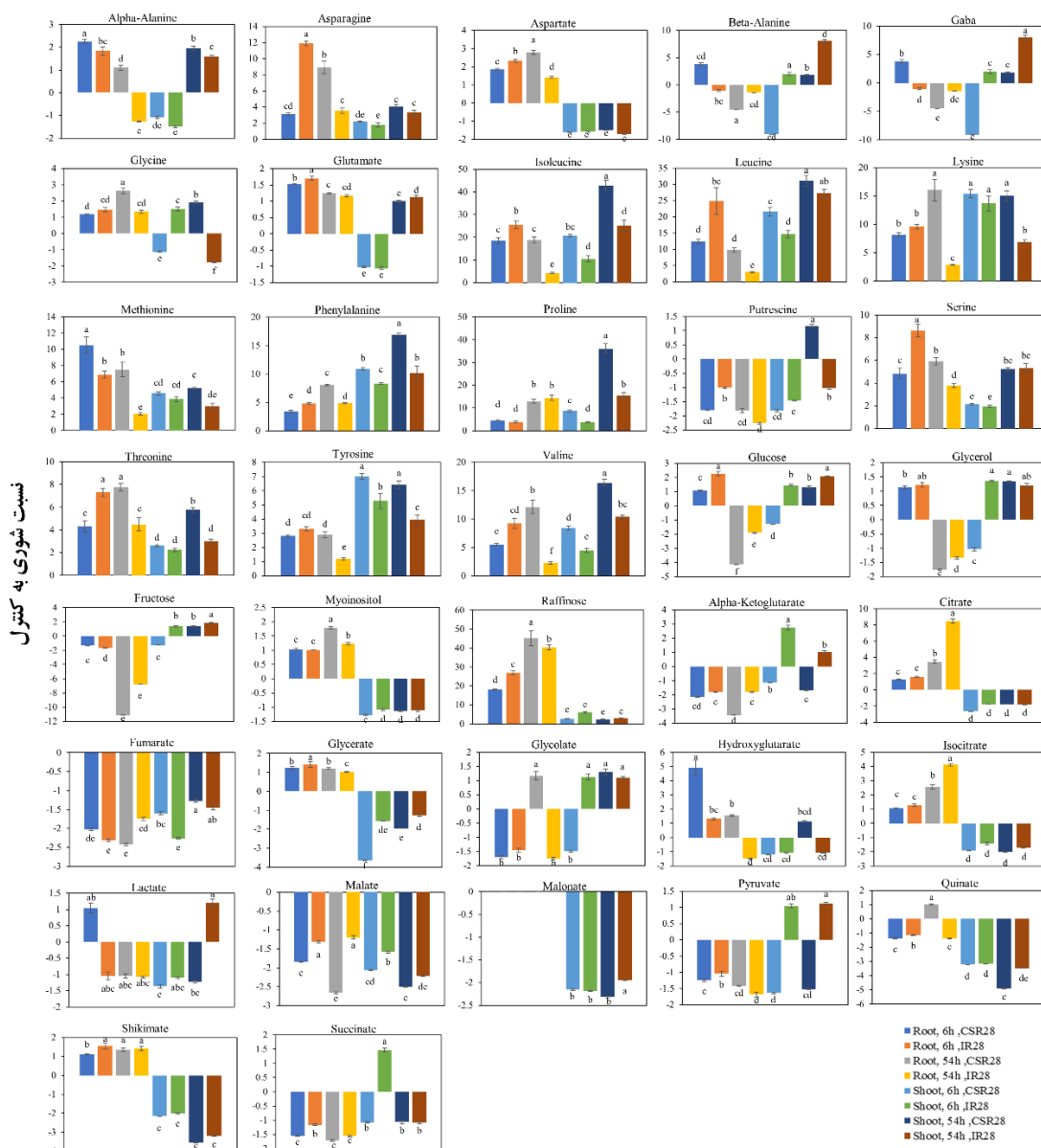
آزمایش به صورت فاکتوریل (دو سطح اندام ریشه و اندام هوایی، دو سطح نمونه‌برداری ۶ و ۵۴ ساعت و دو ژنوتیپ حساس و متحمل) در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی اجرا و به کمک نرم‌افزار SAS v9. 2 تجزیه شدند. به منظور تجزیه داده‌ها ابتدا در هر یک از شرایط آزمایش مقادیر شوری به مقادیر شاهد مربوطه تقسیم شدند و از نسبت شوری به شاهد در تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. مقایسه میانگین به کمک آزمون LSD و در سطح احتمال ۵ درصد صورت پذیرفت. از داده‌های استاندارد شده برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)^۵ به کمک نرم‌افزار R استفاده شد.

نتایج و بحث

پروفایلینگ متابولیت‌های اولیه

تجزیه GC-MS، ۳۷ متابولیت اولیه شامل ۱۸ اسید آمینه، پنج قند و قند-الکل و ۱۴ اسید آلی را در ریشه و اندام هوایی ژنوتیپ‌های CSR28 و IR28 و در زمان‌های نمونه‌برداری ۶ و ۵۴ ساعت پس از اعمال تنش شوری شناسایی کرد. تجزیه واریانس (جدول نشان داده نشده است) تفاوت‌های معنی‌دار بین ریشه و اندام هوایی در ۳۵ متابولیت نشان داد، در حالی که تفاوت‌های معنی‌دار بین دو زمان و بین دو ژنوتیپ به ترتیب در ۲۶ و ۲۸ متابولیت مشاهده شد. همچنین اثر متقابل سه‌جانبه اندام، زمان نمونه‌برداری و ژنوتیپ برای ۲۵ متابولیت معنی‌دار شد. شکل ۱ مقایسه میانگین داده‌های نسبت شوری به شاهد را در شرایط مختلف نشان می‌دهد. به طور کلی ۸۹/۳ درصد از تغییرات متابولیت‌ها نسبت به مقادیر شاهد مربوطه معنی‌دار بودند. ۵۶/۵ درصد از تغییرات به صورت افزایش تجمع و ۳۲/۸ درصد به صورت کاهش تجمع در پاسخ به شوری بودند. در این میان لاکتات کمترین واکنش را به شوری در شرایط مختلف نشان داد.

⁵ Principal Component Analysis



شکل ۱. تغییرات متابولیت‌ها در گیاهچه‌های برنج ارقام متحمل (CSR28) و حساس (IR28) در اندام‌ها و زمان‌های نمونه‌برداری مختلف. داده‌ها به صورت میانگین نسبت شوری به شاهد (به‌دست‌آمده از پنج تکرار) می‌باشند. برای هر ترکیب از ارقام، اندام‌ها و زمان‌های نمونه‌برداری، حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون LSD است ($P \leq 0.05$).

Fig. 1. Metabolite changes of the rice seedlings of salt-sensitive (IR28) and salt-tolerant (CSR28) genotypes in roots and shoots at time points of 6h and 54h after 150 mM salt treatment. The data are Mean \pm SE of salt/control ratios ($n=5$). Mean comparisons by Duncan's Multiple Range test ($P \leq 0.05$) are represented by the letters

تنش محسوب می‌شود (Bouche and Fromm, 2004) و تجمع این اسیدآمین به دلیل بر تأثیرپذیری بیشتر نسبت به عامل محیطی تنش‌زا، تجزیه پروتئین‌ها و آنزیم‌ها و در نهایت پیری زودرس و نکروزه شدن برگ‌ها بیان شده است (Patterson et al., 2009). به‌طور کلی نتایج تحقیق حاضر با گزارش‌های پیشین در ارتباط با نقش اسیدهای آمینه در

تجمع پرولین در پاسخ به شوری در همه شرایط آزمایش افزایش یافت. تولید بیشتر پرولین در اندام‌های هوایی CSR28 نسبت به IR28 نشان داد که ژنوتیپ متحمل برنج از پتانسیل بالایی برای مقابله با چالش‌های اسمزی برخوردار است. از طرف دیگر اسیدهای آمینه نظیر گابا با اعمال تیمار شوری بلندمدت در اندام هوایی در ژنوتیپ حساس IR28 به‌طور چشمگیری افزایش یافت. گابا به‌عنوان نشانگر عمومی

القای تحمل به شوری برنج در مرحله گیاهچه‌ای مطابقت داشت (Zhao et al., 2014; Wang et al., 2016).

قندها و قندالکل‌ها

از پنج قند و قند-الکل شناسایی شده در تجزیه GC-MS، در مجموع ۹۰ درصد از تغییرات در پاسخ به تنش شوری معنی‌دار بودند که ۵۵ درصد به صورت افزایش و ۳۵ درصد به صورت کاهش تجمع بودند. بیشترین و کمترین پاسخ به ترتیب در قندهای رافینوز (۴۵/۲ برابر) و فروکتوز (۱۱/۱- برابر) رخ داد که هر دو به ریشه‌های ژنوتیپ CSR28 در زمان ۵۴ ساعت پس از تنش شوری تعلق داشتند. پس از گذشت ۶ ساعت از اعمال تیمار شوری، مقدار قندهای گلوکز و رافینوز در ریشه IR28 بیشتر و مقدار فروکتوز کمتر از CSR28 بود، در حالی که در زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت، تجمع رافینوز و میواینوزیتول در CSR28 بیشتر و گلوکز و گلیسرول کمتر از IR28 بودند. در اندام هوایی، در هر دو زمان نمونه‌برداری پس از اعمال تیمار شوری کمیت قندها در IR28 بیشتر از CSR28 بود.

قندها علاوه بر اینکه به عنوان منابع متابولیکی عمل می‌کنند و دارای نقش‌های ساختاری هستند، در تنظیم اسمزی و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نیز نقش دارند (Yancey, 2005; Jia et al., 2019). رافینوز در همه شرایط آزمایش به خصوص در ریشه‌ها در پاسخ به شوری افزایش یافت. بیشترین تجمع این قند مربوط به ریشه CSR28 و زمان ۵۴ ساعت پس از شوری بود. در گزارش نیشیزاوا و همکاران (Nishizawa et al., 2008) از قندهای گالاکتینول و رافینوز به عنوان قندهای مؤثر در پاک‌سازی رادیکال‌های هیدروکسیل از سلول‌های گیاهی و محافظت در برابر تنش‌های اکسیداتیو یاد شد. میواینوزیتول نیز تجمع بیشتری در ریشه‌های CSR28 نسبت به IR28 در شوری طولانی‌مدت داشت. کاربرد میواینوزیتول در درخت‌های میوه نظیر سیب موجب ممانعت از آسیب‌های حاصل از تجمع نمک، با بهره‌گیری از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه، هومئوستازی یون‌های سدیم و پتاسیم و تنظیم اسمزی در شرایط شوری شد (Hu et al., 2018). در مطالعه جریده و همکاران (Jarideh et al., 2021) از قندهای محلول و اسیدهای آمینه به عنوان شاخص‌های مؤثر در گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به شوری در برنج یاد شده است.

اسیدهای آلی

از مجموع ۱۴ اسید آلی شناسایی شده در پروفایلینگ متابولیت‌ها، ۸۴/۲ درصد از تغییرات در پاسخ به شوری معنی‌دار بودند که ۲۲/۴ درصد از این تغییرات به صورت افزایش و ۶۱/۸ درصد به صورت کاهش تجمع بودند. بیشترین (۸/۴ برابر) و کمترین (۴/۹- برابر) تغییر در پاسخ به شوری، در زمان ۵۴ ساعت پس از تیمار و به ترتیب مربوط به سیترات در ریشه‌های IR28 و کوئینات در اندام‌های هوایی CSR28 بودند. در ریشه پس از ۶ ساعت از تیمار شوری، مقادیر شش اسید آلی در IR28 بالاتر از CSR28 بود، در حالی که تنها هیدروکسی گلوکارات در CSR28 کمیت بیشتری نسبت به IR28 داشت. در مقایسه بین دو ژنوتیپ در زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت از تیمار شوری، مقادیر پنج اسید آلی در IR28 و چهار اسید آلی در CSR28 به طور معنی‌دار بیشتر بود. در اندام هوایی نیز پس از ۶ ساعت از تیمار شوری، مقادیر شش اسید آلی در IR28 بیشتر از CSR28 بود، در حالی که تنها فومارات در CSR28 به طور معنی‌دار بالاتر از IR28 بود. در زمان ۵۴ ساعت از تیمار شوری، پنج اسید آلی به طور معنی‌دار کمیت بیشتری در IR28 نسبت به CSR28 داشتند و در سایر ترکیبات اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها مشاهده نشد.

در بررسی متابولیت‌های اولیه مشخص گردید که بسیاری از اسیدهای آلی در هر دو اندام در پاسخ به شوری کاهش یافتند، اما مقدار و الگوی تجمع آن‌ها در اندام‌ها، ژنوتیپ‌ها و زمان‌های نمونه‌برداری متفاوت، یکسان نبود. کاهش کمتر اسیدهای آلی در ریشه هر دو ژنوتیپ در شرایط شوری طولانی‌مدت می‌تواند در ارتباط با جبران عدم بالانس یونی باشد (Jones, 1998). افزایش کمیت آنیون‌هایی مثل سیترات و ایزوسیترات در حفظ تعادل یونی ناشی از ورود بیش‌ازحد کاتیون‌های سمی Na^+ مؤثر است. همچنین تجمع اسیدهای آلی در ریشه می‌تواند به عنوان تنظیم‌کننده اسمزی عمل کند. نتایج به دست آمده با گزارش ژائو و همکاران (Zhao et al., 2014) انطباق داشت.

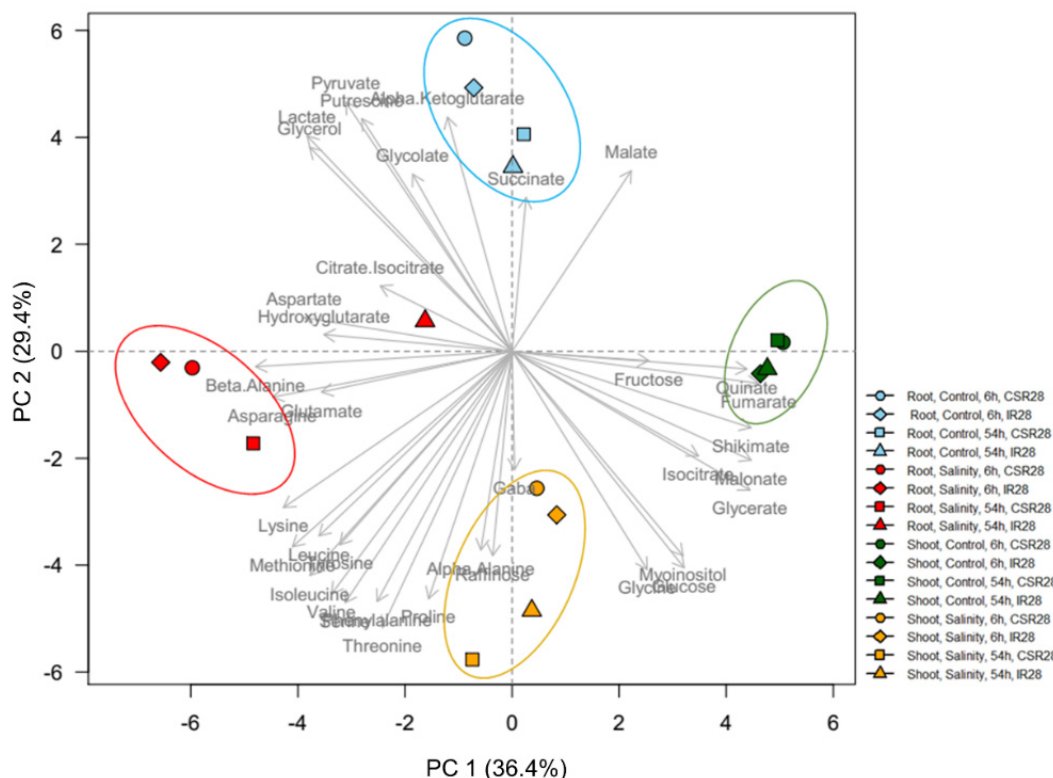
در اندام هوایی علی‌رغم کاهش تجمع اسیدهای آلی نسبت به شرایط شاهد در هر دو ژنوتیپ، مقدار کاهش در ژنوتیپ متحمل CSR28 به مراتب شدیدتر بود و تجمع اکثر اسیدهای آلی در اندام‌های هوایی IR28 بیشتر بود. گزارش شده است که در ارقام متحمل به شوری و خشکی، در نتیجه وقوع تنش و با بسته شدن روزنه‌ها، هدایت روزنه‌ای

مؤلفه توجیه شد. مؤلفه اصلی دوم ۲۹/۴ درصد از تغییرات را توجیه کرد و بررسی ضرایب آن نشان داد که اسیدهای آمینه مثل آلفا-آلانین، پرولین، گلیسین، گابا، والین، ترئونین، سرین، پوترسین و فنیل‌آلانین و اسیدهای آلی مثل گلیکولات، سوکسینات، مالات، آلفا-کتوگلوئارات، پیروات، لاکتات و قندهایی نظیر گلیسرول، گلوکز و رافینوز مسئول اصلی جداسازی هستند. شکل ۲ نمودار بای‌پلات میانگین داده‌های متابولیت‌ها در نمونه‌های مختلف را برحسب مؤلفه اصلی اول و دوم نشان می‌دهد. مجموعه نمونه‌های مربوط به ریشه در شرایط تنش شوری (به‌استثنای ژنوتیپ IR28 در زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت) در یک خوشه قرار گرفتند (خوشه قرمز) که از طریق مؤلفه اصلی اول از خوشه مربوط به نمونه‌های اندام هوایی در شرایط شاهد (خوشه سبز) تفکیک شدند. مؤلفه اصلی دوم نیز داده‌های متابولیت مربوط به اندام ریشه در شرایط شاهد (خوشه آبی) را از نمونه‌های اندام‌های هوایی در شرایط تنش شوری (خوشه نارنجی) جدا کرد. نمونه‌های ریشه در شرایط شاهد در بخش مثبت مؤلفه اصلی دوم که اسیدهای آلی مثل سوکسینات و آلفا-کتوگلوئارات در آن مشارکت داشتند واقع شده بودند که با اعمال تنش شوری به بخش منفی از مؤلفه اصلی اول که اسیدهای آمینه مثل بتا-آلانین، گلوتامات و اسپارژین نقش داشتند تغییر موقعیت دادند. به‌طور بالعکس، نمونه‌های اندام هوایی از ناحیه مثبت مؤلفه اصلی اول که اسیدهای آلی نظیر کوئینات، فومارات و شیکیمات مشارکت داشتند، با اعمال شوری به ناحیه منفی از مؤلفه اصلی دوم که اسیدهای آمینه نظیر گابا، پرولین، آلفا-آلانین و قند رافینوز نقش داشتند، تغییر موقعیت دادند. در شرایط تنش شوری در هر دو اندام ریشه و هوایی اختلاف بین ژنوتیپ‌ها در زمان نمونه‌برداری ۶ ساعت کم بود، درحالی‌که با افزایش مدت‌زمان تیمار شوری اختلاف بین ژنوتیپ‌ها افزایش یافت که این تفاوت در ریشه شدیدتر از اندام هوایی بود. به‌طور قابل‌توجه، با اعمال تیمار شوری و افزایش مدت‌زمان آن از ۶ به ۵۴ ساعت، ژنوتیپ CSR28 به سمت پایین که نقش اسیدهای آمینه پررنگ‌تر بود تمایل پیدا کرد. استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در گزارش گوپتا و دی (Gupta and De, 2017) در تفکیک و شناسایی وارته‌های مختلف برنج در پاسخ به سطوح مختلف شوری بر اساس پروفایل‌های متابولیکی نقش داشت.

کاهش یافته که این خود موجب کاهش تعرق و هدررفت آب می‌شود (Chaves et al., 2009). اگرچه کاهش هدایت روزنه‌ای موجب کاهش CO₂ قابل‌دسترس برای فتوسنتز و در نتیجه کاهش رشد در شرایط تنش می‌گردد (Osakabe et al., 2014)، ولی بسته شدن روزنه‌ها و به دنبال آن کاهش تنفس، تقاضا برای انرژی را نیز کم می‌کند (Lambers et al., 1998). از آنجایی‌که اندام‌های هوایی محل تولید و مصرف کربوهیدرات‌ها هستند به نظر می‌رسد گیاه متحمل CSR28 با کاهش تقاضا و در نتیجه کاهش فتوسنتز، یک مکانیسم سازگاری برای حفظ وضعیت آبی گیاه در شرایط شوری بالا ایجاد می‌کند. از طرف دیگر با ادامه تنش و کاهش RWC در ژنوتیپ حساس IR28، آسیب‌های سلولی و پروتئینی بیشتر شده، آنزیم‌های درگیر در فتوسنتز تجزیه‌شده و گیاه قابلیت فتوسنتز و رشد را از دست خواهد داد (Chaves et al., 2009)، درحالی‌که ژنوتیپ متحمل CSR28 می‌تواند با کاهش هدررفت آب و تنظیم اسمزی، از مرحله گیاهچه‌ای که بسیار حساس به شوری است با آسیب کمتر عبور کند. از بین اسیدهای آمینه اسپاراتات، از بین قندها میواینوزیتول و از بین اسیدهای آلی سیترات، گلیسرات، ایزوسیترات و شیکیمات اختصاصی اندام بودند، به‌طوری‌که تنها در ریشه در پاسخ به شوری افزایش تجمع نشان دادند و در اندام هوایی نسبت به شرایط شاهد با کاهش تجمع مواجه شدند. در بررسی متابولیت‌های اختصاصی بین ژنوتیپ‌ها، تنها دو اسید آلی آلفاکتوگلوئارات و پیرووات به‌طور اختصاصی تجمع پیدا کردند، به‌طوری‌که هر دو اسید آلی در پاسخ به شوری در اندام هوایی در CSR28 کاهش و در IR28 افزایش یافتند.

گروه‌بندی بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA)

جهت به دست آوردن تصویر کلی از پروفایلینگ متابولیت‌ها در شرایط مختلف، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی انجام شد. نتایج تجزیه مشخص کرد که سه مؤلفه اصلی اول در مجموع ۷۶/۳ درصد از واریانس کل داده‌های متابولیت را توجیه کردند (جدول نشان داده نشده است). بررسی ضرایب مؤلفه اصلی اول نشان داد که اسیدهای آمینه بتا-آلانین، گلوتامات و اسپارژین و اسیدهای آلی نظیر کوئینات، فومارات، شیکیمات، مالونات، اسپاراتات و هیدروکسی گلوئارات مسئول اصلی جداسازی هستند و ۳۶/۴ درصد از واریانس کل توسط این



شکل ۲. نمودار بای پلات متابولیت‌ها بر اساس مؤلفه‌های اصلی اول و دوم. داده‌ها به صورت میانگین کمیت‌های استاندارد شده (به دست آمده از پنج تکرار) می‌باشند. نمونه‌های مختلف آزمایش توسط علائم و رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند

Fig. 2. Biplot of the first and second principal components (PC) of the metabolite profiles. The data are z-score normalized means (n=5). The blue, red, green and orange colors indicate control and salt stress conditions in roots and shoots. In each color, the genotypes and time points are represented by the shapes

از طرف دیگر گابا به‌عنوان نشانگر وقوع تنش در اندام هوایی ژنوتیپ حساس تجمع بیشتری داشت. برخی متابولیت‌ها نظیر آسپاراتات، میواینوزیتول، سیترات، گلیسیرات و شیکیمات به صورت اختصاصی در ریشه‌ها تجمع یافتند. متابولیت‌هایی نظیر پرولین و گابا می‌توانند به‌عنوان نشانگر زیستی برای غربالگری لاین‌های متحمل به شوری بکار روند. مطالعه حاضر نقش سازگاری‌های متابولیکی را در القای تحمل به شوری برجسته می‌کند.

قدردانی

در پایان لازم است از موسسه تحقیقات بین‌المللی برنج جهت در اختیار قرار دادن بذور و از دانشگاه‌های علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و HHU آلمان جهت فراهم کردن امکانات و تجهیزات انجام آزمایش سپاسگزاری شود.

نتیجه‌گیری نهایی

بر اساس تجزیه GC-MS، ۸۳/۳ درصد افزایش در اسیدهای آمینه و ۶۱/۸ درصد کاهش در اسیدهای آلی در واکنش به تنش شوری مشاهده شد که بیانگر افزایش در مکانیسم‌های تنظیم اسمزی و کاهش در واکنش‌های فتوسنتزی در ژنوتیپ‌های برنج است. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که اسیدهای آمینه مهم‌ترین نقش را در تفکیک نمونه‌ها تحت شرایط تنش شوری و شاهد در هر دو اندام داشتند. همچنین ژنوتیپ‌ها به واسطه تغییرات متابولیکی رخ داده در پاسخ به شوری طولانی‌مدت، بیشترین تفاوت در تحمل را نشان دادند. پرولین به‌عنوان یکی از مهم‌ترین اسمولیت‌های درگیر در تنش‌های غیر زیستی به‌طور معنی‌داری در اندام هوایی ژنوتیپ متحمل CSR28 تجمع بیشتری نسبت به ژنوتیپ حساس IR28 تحت شرایط تنش شوری طولانی‌مدت داشت.

منابع

- Acosta-Motos J.R., Ortuño, M.F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M.J., Hernandez, J.A., 2017. Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms. *Agronomy*. 7, 18.
- Agricultural Statistics, 2019. Annual Report. Ministry of Agriculture Press. <https://www.maj.ir/Index.aspx>. [In Persian]
- Ahmad, P., Prasad, M.N.V., 2011. *Abiotic Stress Responses in Plants*. Springer. 473p.
- Batista-Silva, W., Heinemann, B., Rugen, N., Nunes-Nesi, A., Araújo, W.L., Braun, H.P., Hildebrandt, T.M., 2019. The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. *Plant, Cell Environment*. 42, 1630-1644.
- Bouche, N., Fromm, H., 2004. GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science*. 9, 110-115.
- Chaves, M., Flexas, J., Pinheiro C., 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103, 551-560.
- El Mahi, H., Pérez-Hormaeche, J., De Luca, A., Villalta, I., Espartero, J., Gámez-Arjona, F., et al., 2019. A critical role of sodium flux via the plasma Membrane Na⁺/H⁺ exchanger SOS1 in the salt tolerance of rice. *Plant Physiology*. 180, 1046-1065.
- Fiehn, O., 2002. Metabolomics—the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology*. 48, 155–171.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAOSTAT. Rome, Italy. FAO; 2019. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accessed 15 May 2021).
- Gu, J., Weber, K., Klemp, E., Winters, G., Franssen, S.U., Wienpahl, I., et al., 2012. Identifying core features of adaptive metabolic mechanisms for chronic heat stress attenuation contributing to systems robustness. *Integrative Biology*. 4, 480-493.
- Gupta, P., De, B., 2017. Metabolomics analysis of rice responses to salinity stress revealed elevation of serotonin, and gentisic acid levels in leaves of tolerant varieties. *Plant Signaling and Behavior*. 12, e1335845.
- Hernández, J.A., 2019. Salinity Tolerance in Plants: Trends and Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 2408.
- Hoang, T.M.L., Tran, T.N., Nguyen, T.K.T., Williams, B., Wurm, P., Bellairs, S., Mundree, S., 2016. Improvement of salinity stress tolerance in rice: challenges and opportunities. *Agronomy*. 6, 54.
- Hu, L., Zhou, K., Li, Y., Chen, X., Liu, B., Li, C., et al., 2018. Exogenous myo-inositol alleviates salinity-induced stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Plant Physiology and Biochemistry*. 133, 116-126.
- Jarideh, P., Amiri-Fahliani, R., Masoumi-Asl, A., Moradi, A., Hosseini-Chaleshtory, M., 2021. Genetic parameters estimation and factor analysis of morphological and physiological characteristics of F2:4 rice (*Oryza sativa* L.) genotypes in germination stage under salinity conditions. *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 4, 183-194. [In Persian with English Summary]
- Jia, Q., Kong, D., Li, Q., Sun, S., Song, J., Zhu, Y., et al., 2019. The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 3999.
- Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant and Soil*. 205, 25-44.
- Hunter, M.C., Smith, R.G., Schipanski, M.E., Atwood, L.W., Mortensen, D.A., 2017. Agriculture in 2050: Recalibrating targets for sustainable intensification. *Bioscience*. 67, 386-391.
- Kim, J.K., Bamba, T., Harada, K., Fukusaki, E., Kobayashi, A., 2006. Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *Journal of Experimental Botany*. 58, 415-424.
- Kumar, R., Bohra, A., Pandey, A.K., Pandey, M.K., Kumar, A., 2017. Metabolomics for plant improvement: status and prospects. *Frontiers in Plant Science*. 8, 1302.
- Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L., 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer. 623p.
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker, D.F., 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants and Redox Signaling*. 19, 998-1011.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A., 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*. 1, 387–396.

- Lutts, S., Kinet, J., Bouharmont, J., 1995. Changes in plant response to NaCl during development of rice (*Oryza sativa* L.) varieties differing in salinity resistance. *Journal of Experimental Botany*. 46, 1843-1852.
- Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*. 59, 651-681.
- Nam, M., Bang, E., Kwon, T., Kim, Y., Kim, E., Cho, K., et al., 2015. Metabolite profiling of diverse rice germplasm and identification of conserved metabolic markers of rice roots in response to long-term mild salinity stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 16, 21959-21974.
- Nishizawa, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S., 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*. 147, 1251-1263
- Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L.S.P., 2014. Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science*. 5, 86.
- Patterson, J.H., Newbigin, E., Tester, M., Bacic, A., Roessner, U., 2009. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salinity tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 60, 4089-4103.
- Piasecka, A., Kachlicki, P., Stobiecki, M., 2019. Analytical methods for detection of plant metabolomes changes in response to biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 20, 379.
- Reddy, P.P., 2015. *Climate Resilient Agriculture for Ensuring Food Security*. Springer. 373p.
- Shim, S.H., Lee, S.K., Lee, D.W., Brillhaus, D., Wu, G., Ko, S., et al., 2020. Loss of function of rice plastidic glycolate/glycerate translocator 1 impairs photorespiration and plant growth. *Frontiers in Plant Science*. 10, 1726.
- Szabados, L., Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*. 15, 89-97.
- Wang, W.S., Zhao, X.Q., Li, M., Huang, L.Y., Xu, J.L., Zhang, F., et al., 2016. Complex molecular mechanisms underlying seedling salt tolerance in rice revealed by comparative transcriptome and metabolomic profiling. *Journal of Experimental Botany*. 67, 405-419.
- Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Botany*. 208, 2819-2830.
- Yoshida, Y., Kiyosue, T., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., 1997. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. *Plant and Cell Physiology*. 38, 1095-1102.
- Yoshida, S., Forno, D.A., Cock, J.H., 1971. *Laboratory Manual for Physiological Studies of Rice*. Los Baños, the Philippines: International Rice Research Institute.
- Zhao, X., Wang, W., Zhang, F., Deng, J., Li, Z., Fu, B., 2014. Comparative metabolite profiling of two rice genotypes with contrasting salt stress tolerance at the seedling stage. *Plos One*. 9, e108020.