



پاسخ برخی از متابولیت‌های اولیه ریشه برنج (*Oryza sativa L.*) به تنش شوری

مژده اکبرزاده لکامی^۱، محمدهادی پهلوانی^۲، خلیل زینلی نژاد^۳، کیوان مهدوی مشکی^۴، آندریاس پی.ام ویر^۵ و دومینیک بریل‌هاوس^۶

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (تویسته مسؤول: m.akbarzade67@yahoo.com)

۲- ۳- دانشیار و استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- استادیار پژوهش موسسه حقیقات برج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و تربیت کشاورزی، آمل، ایران

۵- استاد و استادیار دانشگاه HHU، دوسلدورف، آلمان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۲

صفحه: ۲۱۷ تا ۲۱۰

چکیده

به منظور بررسی واکنش‌های متابولیکی ریشه برنج به تنش شوری در مرحله گیاهچه‌ای، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در بنچ تکرار در شرایط گلخانه اجرا شد که طی آن دو ژنوتیپ متتحمل CSR28 و ژنوتیپ حساس IR28 در دو سطح شوری صفر و ۱۵۰ میلی‌مولار و دو زمان نمونه‌برداری ۶ و ۵۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع در پاسخ به شوری ۳۶ متابولیت اولیه (شامل ۱۸ اسید‌آمینه، پنج قند و قند-الکل و ۱۳ اسید آلی) در ریشه با استفاده از آنالیز GC-MS شناسایی شدند. اسیدهای آمینه بیشترین تجمع را در پاسخ به شوری بالا نشان دادند. همچین با افزایش مدت زمان تیمار شوری اختلاف بین ژنوتیپ‌ها افزایش یافت و ژنوتیپ متتحمل CSR28 به طور چشمگیری تجمع بالاتر در مقدار اسیدهای آمینه نشان داد که حاکی از نقش سازوکارهای تنظیم اسمزی در القای تحمل بود. از میان قندهای شناسایی شده، رافینوز و میوینوز تیول پیشترین افزایش را مخصوصاً در زمان نمونه‌برداری ۵۴ ساعت در ژنوتیپ متتحمل شان دادند که بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها بود. به طور کلی نتایج این تحقیق بیانگر ضرورت شناسایی و مطالعه مسیرهای متابولیکی به منظور درک مکانیسم‌های مولکولی تحمل به تنش شوری و در نتیجه اصلاح ارقام متتحمل برنج می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: مرحله گیاهچه‌ای، اسید آمینه، قند، تنظیم اسمزی، آنالیز GC-MS

اسمزی حاصل از شوری، خشکی و سرما منجر به دهیدراته شدن سلولی می‌شود. به منظور جلوگیری از این امر و محافظت از پروتئین‌های سلولی، گیاهان بسیاری از ترکیبات آلی مانند اسیدهای آمینه (ناظیر پرولین) و دیگر آمینه‌ها (گلایسین بتائین و پلی‌آمین)، انواع قندها (به طور عمده فروکتوز و ساکاراز)، قند-الکل‌ها، قندهای پیچیده (مانند تری‌هالوز و فروکتان) و اسیدهای آمی (ناظیر اگزالات و ملات) را تولید می‌کنند (۲۷). متابولیت‌ها محصولات نهایی تنظیم‌کننده سلولی هستند. تجمع آن‌ها را می‌توان به عنوان پاسخ نهایی سیستم‌های زیستی به تعییرات ژنتیکی یا محیطی در نظر گرفت و در ارتباط تنگاتنگ با فنتوتیپ هستند (۵). اسیدهای آمینه، قندها و قند-الکل‌ها متابولیت‌های گیاهی هستند که به عنوان اسموولیت در مقابل تنش شوری از گیاه محافظت می‌کنند (۳۱).

شناسایی مسیرهای تعادلی متابولیت‌های اولیه در ریشه رقم متتحمل در شرایط تنش شوری و مقایسه آن با وضعیت رقم حساس از دو جنبه فیزیولوژی تنش و اصلاح ژنتیکی ارقام حائز اهمیت می‌باشد. زیرا ارتقاء اطلاعات و داشتن از چنین مسیرهایی منجر به رفع موانع و محدودیت‌های فیزیولوژی تولید در شرایط تنش شوری و همچنین توسعه سطح زیر کشت برنج به مناطقی می‌گردد که با این تنش رو به رو هستند. در این مطالعه آنالیز متابولیت‌های اولیه ریشه دو ژنوتیپ برنج متتحمل به شوری CSR28 (۹) و حساس IR28 (۲۹) در پاسخ به شوری بالا با استفاده از روش GC-MS مورد بررسی قرار گرفت. این آنالیز شامل تعیین مقادیر اسیدهای آمینه، قندها و اسیدهای آلی و ارزیابی الگوی تجمع آنها بود.

مقدمه

تنش شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های محیطی است که بسیاری از فرایندهای رشدی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۵). برنج غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان محسوب می‌شود. سطح زیر کشت برنج در دنیا ۱۶۷ میلیون هکتار، تولید کل ۷۸۲ میلیون تن و عملکرد متوسط ۴/۶۷ تن در هکتار می‌باشد. در ایران نیز این گیاه در وسعت ۵۸۰ هزار هکتار کشت و کار می‌شود و تولید کل و عملکرد متوسط آن به ترتیب ۱/۹۹ میلیون تن و ۳/۴۳ تن در هکتار می‌باشد (۶). تنش شوری یکی از مخرب‌ترین تنش‌های غیر زیستی در برنج است (۲۱). شوری به دلایل مختلفی مانند استفاده از آب نامناسب برای آبیاری، زهکشی نامناسب زمین‌های مرطوب، وارد شدن آب دریا به زمین‌های مجاور آن و در نواحی خشک به دلیل بالا بودن میزان تبخیر نسبت به بارندگی افزایش می‌یابد. در شرایط تنش شوری مسمومیت یونی (در اثر وجود یون‌هایی مثل سدیم و کلر)، تنش اسمزی و سوء تغذیه (در اثر کم شدن جذب فسفر، پتاسیم، نیترات و کلسیم) رشد گیاه را محدود نموده و باعث برهخوردن تعادل متابولیکی سلول و ایجاد تنش اکسیداتیو می‌شود (۳۴). برنج با آستانه تحمل ۳ دسی‌زیمنس بر متر (dsm) یکی از گیاهان بسیار حساس به شوری محسوب می‌شود. این گیاه در مراحل جوانه‌زنی، پنجه‌زنی و بلوغ از تحمل نسبی به شوری برهخوردار است اما در مرحله گیاهچه‌ای و فاز زایشی به شوری حساس است (۱۳). غلظت بالای نمک سلولی منجر به عدم تعادل یونی و اسمزی شده که هوموستازی یونی و آبی گیاه را مختل کرده، منجر به آسیب متابولیک، توقف رشد و حتی مرگ می‌شود (۲۶). تنش‌های

ابتدا نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در speed vac concentrator قرار گرفته و سپس glass insert به ویال‌های GC منتقل شدند. مراحل بعدی توسط نمونه‌گیر اتوماتیک Gerstel MPS 2 XL انجام شد. ابتدا ۱۰ میکرولیتر متوكسی‌آمین-هیدروکلراید (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به نمونه‌های خشک شده اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تکان داده شدند. سپس ۹۰ میکرولیتر MSTFA^۵ مجدداً به نمونه‌ها افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تکان داده شدند. قبل از تزریق، انتظار به مدت ۱۲۰ دقیقه طول کشید. آنالیز GC-MS (با شرکت Agilent 7200 GC-QTOF) و آنالیز داده‌ها نیز توسط Mass Hunter Software (با شرکت Agilent) انجام شد. به منظور کمی کردن نسبی، ناحیه پیک همه متابولیت‌ها بر اساس ناحیه پیک استاندارد داخلی ریبیتول که قابلً در بافر استخراج به کار رفته بود و همچنین وزن نمونه‌ها نرمال سازی شدند. گروه‌بندی داده‌های متابولیت (بر اساس لگاریتم ۱۰) در نمونه‌های مختلف توسط رسم نقشه دمایی در نرمافزار v4.9.0 MeV انجام شد.

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌های حاصل به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور ژنوتیپ (CSR28 و IR28)، تیمار (کنترل و سوری) و زمان نمونه‌برداری (۶ و ۵۴ ساعت پس از اعمال تنفس شوری) با پنج تکرار تجزیه شدند. آنالیز تجزیه واریانس توسط نرمافزار SAS v9.2 و مقایسه میانگین به روش دانکن با سطح احتمال ≤ 0.05 انجام شد.

نتایج و بحث

آنالیز GC-MS، تعداد ۳۶ متابولیت اولیه شامل ۱۸ اسید آمینه، ۵ قند و قند-الکل و ۱۳ اسید آلی را در ریشه دو ژنوتیپ برنج 28 و CSR28 در زمان‌های نمونه‌برداری ۶ و ۵۴ ساعت پس از تیمار شوری شناسایی کرد. نتایج تجزیه واریانس (جدول تجزیه واریانس نشان داده نشده است) بیانگر اختلاف معنی‌دار بین شرایط کنترل و تنفس برای ۳۶ متابولیت با متوسط تنوغ فنوتیپی ۱۳/۸۵ درصد بود. از متابولیت‌های شناسایی شده، ۳۳ متابولیت تفاوت معنی‌دار بین دو زمان نمونه‌برداری ۶ و ۵۴ ساعت پس از شوری نشان دادند که به طور متوسط ۳/۶۵ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند. اختلاف بین ژنوتیپ‌ها در ۲۸ متابولیت معنی‌دار بود که به طور متوسط ۱/۷۰ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کردند. همچنین اثر متقابل اندام \times زمان نمونه‌برداری \times ژنوتیپ در ۲۷ متابولیت معنی‌دار بود و به طور متوسط ۰/۷ درصد از تنوع فنوتیپی را توجیه کرد.

اسیدهای آمینه:

در این مطالعه تعداد ۱۸ اسید آمینه، در زمان‌ها، ژنوتیپ‌ها و تیمارهای مختلف شناسایی شدند (جدول ۱). پس از گذشت ۶ ساعت از اعمال تیمار شوری ۱۵۰ میلی‌مولاًر در ریشه‌های هر دو ژنوتیپ، تجمع تمامی اسیدهای آمینه (به استثنای پوتریسین) تغییرات معنی‌دار و افزایشی نسبت به شرایط کنترل نشان دادند. به طوری که بیشترین افزایش معنی‌داری،

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اعمال تیمار تنفس شوری

بذور دو ژنوتیپ برنج (*Oryza sativa L. ssp. indica*) با تحمل شوری متفاوت، از موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج در فیلیپین (IRRI)^۱ تهییه شدند. ژنوتیپ IR28 (با شجره nivara به عنوان ژنوتیپ حساس و CSR28 (با شجره IR42/IR4630-22-2-5-1-3 به عنوان ژنوتیپ متتحمل به ترتیب در IRRI و موسسه تحقیقات شوری خاک در هند) به‌منظور به مدت دو روز درون پتروی دیش در دمای ۲۸ درجه (CSSRI)^۲ اصلاح شدند. سپس از ضدغوفونی به‌منظور تهییه نمونه ۲/۵ درصد، به منظور تهییه نمونه بافت ریشه، بذور به مدت دو روز درون پتروی دیش در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی جوانهدار شدند. سپس جهت کشت در شرایط هیدروبیونیک (آبکشت)، جوانه‌ها به درون تشت‌های حاوی محیط کشت پوشیدا (۳۳) منتقل شدند و رشد گیاهچه‌ها در دمای 28 ± 2 درجه سلسیوس و شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه Heinrich-Heine (واقع در شهر دوسلدورف کشور آلمان) انجام شد. محیط کشت هر سه روز تعویض و pH محيط با استفاده از KOH و HCl روی ۵/۵ تنظیم شد. اعمال تیمار شوری پس از ۱۴ روز در مرحله دو تا سه برگی، با استفاده از نمک کلریدسیم ۱۵۰ میلی‌مولاًر انجام شد. مقدار هدایت الکتریکی برای شرایط کنترل و شوری به ترتیب ۱ و ۱۵ دسی‌زیمنس (dsm^{-1}) بود. نمونه‌برداری از اندام ریشه در زمان‌های ۶ و ۵۴ ساعت پس از اعمال تیمار تنفس شوری صورت پذیرفت. نمونه‌ها پس از آبکشی بالا‌فصله در ازت مایع منجمد و سپس به فریزر منفی ۸۰ درجه سلسیوس منتقل شدند.

استخراج و اندازه‌گیری متابولیت‌ها

ابتدا نمونه‌های ریشه توسط ازت مایع پودر و سپس لیوفیلیز^۳ شدند سپس مقدار ۱۰ میلی‌گرم به صورت مساوی از تمامی نمونه‌های لیوفیلیز شده برداشت و به داخل تیوب‌های دیگری که داخل ازت مایع قرار داشتند، منتقل شدند. جهت استخراج متابولیت‌ها، ابتدا بافر استخراج از آب، متانول و کلروفرم به نسبت ۱:۲/۵:۱ تهییه شد و سپس بهازای هر ۵۰ میلی‌لیتر محلول مادری، ۵۰ میکرولیتر ریبیتول پنج میلی‌مولاًر اضافه شد و در فریزر منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۱،۲۲). به هر کدام از تیوب‌ها ۱/۵ میلی‌لیتر از بافر استخراج به آن‌ها اضافه و به مدت ۲۰ ثانیه ورتكس شده و سپس روی یخ قرار گرفتند. دو تیوب بلانک حاوی ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استخراج تهییه شده و به همراه نمونه‌های اصلی به مدت شش دقیقه در دمای چهار درجه سلسیوس هم زده شدند. نمونه‌ها به مدت دو دقیقه با ۱۴۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق ساتریفیوژ شدند و مقدار یک میلی‌لیتر از مایع رویی به تیوب جدید منتقل شدند سپس به مدت ۱۰ ثانیه ورتكس شده و مقدار ۳۰ میکرولیتر هر کدام داخل glass insert قرار گرفتند. نمونه‌ها در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس در خشکانه^۴ آنالیز در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس در خشکانه^۵ نگهداری شدند. به منظور مشتق شدن^۶ برای آنالیز GC-MS

در پاسخ به شوری کاهش یافت. قندها علاوه بر منابع متابولیکی و نقش‌های ساختاری، به عنوان اسمولیت و آنتی‌اکسیدان نیز عمل می‌کنند (۱۶، ۳۲). در پاسخ به تنفس شوری و به منظور جلوگیری از اثر اسمزی ناشی از نمک موجود در محیط گیاه ستر و تجمع قندهای محلول را افزایش می‌دهد تا پتانسیل اسمزی خود را کاهش دهد و جذب آب از محیط شور ادامه یابد (۲۵). نیشیزاوا و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که قندهای گالاکتینول و رافینوز با پاکسازی رادیکال‌های هیدروکسیل از سلول‌های گیاهی در برابر تنفس‌های اکسیداتیو محافظت می‌کنند.

قندها و قند-الکل‌ها: آنالیز GC-MS منجر به شناسایی پنج قند و قند-الکل شد (جدول ۲). پس از گذشت ۶ ساعت از اعمال تنفس شوری، تجمع گلیسرول و رافینوز در ریشه هر دو ژنوتیپ افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان کنترل مربوطه نشان دادند. مقدار گلوكز در ریشه رقم متحمل تغییری نشان نداد در صورتی که در رقم حساس افزایش یافت با افزایش مدت زمان تنفس شوری، تنها میوانوزیتول و رافینوز نسبت به گیاهان کنترل در هر دو ژنوتیپ تجمع بیشتری داشتند و مقدار این تجمع در ژنوتیپ متحمل CSR28 بیشتر از ژنوتیپ حساس IR28 بود. قند فروکتوز در هر دو زمان نمونه‌برداری

جدول ۲- مقایسه میانگین قندها و قند-الکل‌ها دو ژنوتیپ متحمل و حساس برج، تیمارها و زمان‌های نمونه‌برداری مختلف با استفاده از آزمون دانکن ($P \leq 0.05$)

Table 2. Mean comparison of sugars and sugar alcohols of the two tolerant and sensitive rice genotypes, the treatments and the time points using Duncan's test

شوری				کنترل				قند، قند-	
۵ ساعت		۶ ساعت		۵ ساعت		۶ ساعت		الکل	الکل
IR28	CSR28	IR28	CSR28	IR28	CSR28	IR28	CSR28	گلوكز	گلوكز
۶۸۹/۳±۱۹ ^b c	۴۴۶/۵±۳۷/۴ ^f	۱۲۱۲/۴±۴۷/۹ ^c	۱۰۹۳/۱±۲۲/۳ ^d	۱۳۱۵/۸±۵۳/۱ ^b	۱۸۴۲/۵±۳۶/۸ ^a	۵۴۶/۱±۲۲/۷ ^f	۱۰۳۸/۵±۵/۲ ^d	گلوكز	گلوكز
۱۷۳۸/۴±۴۵/۴ ^d	۱۴۰۷/۳±۲۸/۴ ^e	۲۷۶۵/۵۲±۳۰ ^a	۲۲۵۷/۵±۷۱/۴ ^b	۲۳۴۴/۲±۹۶/۲ ^b	۲۴۸۷/۹±۱۰/۲ ^e	۲۳۰۴/۴±۱۲۵/۰ ^b	۲۰۰۰/۱±۵۳/۲ ^c	گلیسرول	گلیسرول
۱۹۱۶/۶±۲۷۷/۵ ^f	۱۰۱۶/۱±۷۶/۷ ^g	۳۱۹۵/۵±۶۵/۱ ^c	۴۶۲۷/۱±۱۶۱/۴ ^d	۱۳۰۷۵/۸±۶۵۴/۸ ^a	۱۱۰۸۶/۸±۷/۱ ^b	۵۳۸۹/۵±۱۶۸/۷ ^d	۶۱۹۵/۸±۲۰/۱ ^f c	فروکتوز	فروکتوز
۱۱۷۹/۱±۵۷/۴ ^d	۲۵۳۹/۵±۵۸/۳ ^a	۱۱۶۳/۹±۸/۴ ^d	۱۵۶۷±۱۰/۴ ^b	۹۵۹/۰.۸±۲۲/۸ ^e	۱۴۱۳/۷±۱۳۰/۵ ^c	۱۱۴۸/۶±۱۲/۴ ^d	۱۵۱۲/۳±۳۰/۱ ^b	میوانوزیتول	میوانوزیتول
۲۳۵/۷±۱۴/۴ ^b	۲۹۳/۴±۱۳/۴ ^c	۴۱۳/۰.۶±۱۱/۳ ^a	۳۳۲/۹±۱/۸ ^b	۸/۳±۰/۴ ^d	۶/۶±۰/۴ ^d	۱۵/۳±۰/۴ ^d	۱۸/۳±۰/۴ ^d	رافینوز	رافینوز

مقادیر بصورت میانگین (mg/g) ± خطای میان نشان داده عدم اختلاف معنی‌دار هستند.

مقایسه با IR28 (ژنوتیپ حساس)، در ژنوتیپ CSR28 (ژنوتیپ متحمل) تعدادی از اسیدهای آلی در چرخه کربس نظیر آلفا-کتوگلوتارات، سوکسینات، فومارات و ملات در شرایط تنفس کاهش بیشتری نسبت به گیاهان کنترل مربوطه نشان دادند. سیترات و ایزوپیترات در طول دوره تنفس در هر دو ژنوتیپ افزایش یافتند، گرچه این افزایش در ژنوتیپ حساس بیشتر از ژنوتیپ متحمل بود. به نظر می‌رسد ژنوتیپ متحمل تمايل دارد با بسته شدن روزنه‌ها و کاهش تبادل گازی و فتوستتر از هدر رفت بیشتر آب جلوگیری کند که مکانیسم سازگاری در شرایط تنفس‌های اسمزی محسوب می‌شود (۳۰، ۳۳).

استفاده از میوانوزیتول خارجی در *Malus hupehensis* در شرایط شوری، موجب ممانعت از آسیبهای حاصل از تجمع نمک از طریق حمایت از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی گیاه، هوموئوستازی یون‌های سدیم و پتانسیم و بالانس اسمزی شد (۱۵).

اسیدهای آلی: در پژوهش حاضر ۱۳ اسید آلی در ریشه گیاه برنج تحت شرایط تنفس شوری شناسایی شدند (جدول ۳). اسیدهای آلی از اجزای مهم در تنظیم مسیرهای متابولیکی محسوب می‌شوند و در بسیاری از فرایندهای حیاتی از جمله فتوستتر درگیر هستند (۱۷). نسبت به شرایط کنترل، تجمع بیشتر اسیدهای آلی شناسایی شده در این تحقیق در پاسخ به شوری در هر دو زمان نمونه‌برداری کاهش نشان دادند. در

جدول ۳- مقایسه میانگین اسیدهای آلی دو ژنوتیپ متتحمل و حساس برنج، تیمارها و زمان‌های نمونهبرداری مختلف با استفاده از آزمون
دانکن ($P \leq 0.05$)

Table 3. Mean comparison of organic acids of the two tolerant and sensitive rice genotypes, the treatments and the time points using Duncan's test

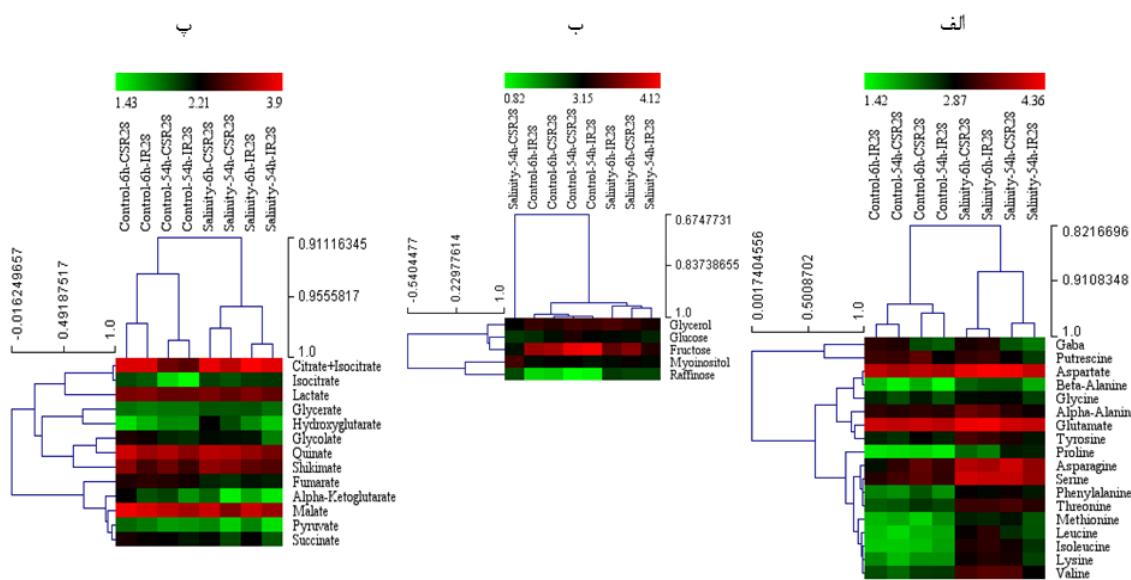
کنترل								اسیدهای آلی
۶ ساعت				۵ ساعت				
شوری	شوری	۶ ساعت	۶ ساعت	۵ ساعت	۵ ساعت	۶ ساعت	۶ ساعت	
IR28	CSR28	IR28	CSR28	IR28	CSR28	IR28	CSR28	
۲۱/۶±۱/۷ ^a	۲۹/۹±۲/۱ ^b	۴۹/۹±۱/۵ ^c	۷۹/۷±۱/۵ ^a	۵۷/۵±۲/۰ ^c	۱۰/۱۴±۰/۷ ^b	۹۱/۱۲±۴/ ^c	۱۷۱/۷±۴/۳ ^a	الفاکتوکاترات
۵۳۷۴/۱±۲۳/۷ ^c	۳۰۲۱/۷±۱۵۱/۳ ^c	۷۹۰/۸±۶±۲۳۳/۹ ^a	۵۸۸۰/۷±۱۴۷/۲ ^b	۶۳۹/۲±۲۲/۷ ^f	۸۷۰±۳/۶ ^f	۴۸۸۵/۲±۱۰/۴ ^d	۴۶۱۰/۱±۱۳۰/۴ ^d	سبتات+ابرو
۱۳۰/۵±۸/۶ ^a	۱۱۴/۳±۶/۸ ^a	۱۴۰/۷±۸/۰ ^a	۱۲۶/۲±۸/۷ ^d	۲۲۸±۴/۸ ^c	۲۸۱/۹±۲/۰ ^b	۳۲۶/۹±۴/۴ ^a	۲۵۷/۹±۱۰/۹ ^b	سپیرات
۷۴/۲±۳/۰ ^b	۸۷/۵±۲/۸ ^a	۹۱/۱±۲/۷ ^a	۸۹/۲±۲/۵ ^a	۷۲/۱۸±۲/۸ ^b	۷۱/۶±۱/۳ ^b	۶۶/۷±۶/۸ ^b	۷۳/۵±۴/۶ ^b	فومارات
۶۶/۷±۴/۰ ^a	۱۴۴/۷±۱۱/۶ ^c	۱۴۱/۹±۱۲/۵ ^c	۱۵۰/۳±۴/۵ ^c	۱۱۷/۳±۴/۳ ^c	۱۲۶/۱±۴/۹ ^c	۲۰۶/۵±۵/۸ ^b	۲۶۳/۳±۲۷/۷ ^a	گلیکولات
۴۰/۱±۱/۴ ^a	۶۶/۶±۱/۸ ^b	۶۱/۶±۲/۱ ^c	۱۶۲/۶±۱۳/۵ ^b	۶۰/۶±۱/۸ ^c	۶۱/۹±۷/۴ ^c	۴۶/۱±۱/۲ ^{cd}	۳۳/۸±۴/۶ ^a	هیدروکسی گلوتارات
۱۱۱/۹±۷/۶ ^a	۹۰/۹±۵/۳ ^c	۱۰/۷/۲±۴/۳ ^{bd}	۱۰/۳/۶±۰/۵ ^{ad}	۷۷/۱۷/۱/۸ ^d	۳۵/۵±۱/۸ ^d	۸۵/۸±۱/۸ ^{bc}	۹۶/۸±۱/۸ ^{bc}	ابروسترات
۷۳۴/۵±۱۵/۱ ^b	۷۴۴/۹±۳۹/۶ ^b	۱۱۵/۰±۵/۱۸/۰ ^a	۱۰/۸۰/۲±۱۳/۲ ^a	۷۹۶/۴±۱۵/۴ ^b	۷۸۲/۵±۲۴/۷ ^b	۱۱۹/۰/۸±۴۹/۳ ^a	۱۰/۵۲/۹±۲۳/۴ ^a	لاکات
۱۷۶۸/۴±۷۶/۸ ^a	۱۱۵/۸/۱±۶/۴ ^c	۳۵۲۶/۵±۱۰/۱ ^c	۳۵۱۱/۲±۶۶/۵ ^c	۲۱۲۰/۷±۵۰/۳ ^c	۳۱۹/۴±۰/۸ ^d	۴۶۶۶/۴/۱۱/۴ ^b	۶۹۹۴/۸±۳۷/۰ ^a	مالات
۳۳/۳±۴/۰ ^c	۳۸/۲±۱/۷ ^c	۶۳/۹±۲/۱ ^{bc}	۶۲/۶/۶±۱/ ^{bc}	۵۶/۸±۲/۰ ^{cd}	۵۴/۰/۶±۱/۱ ^d	۶۸/۷±۵/۶ ^b	۷۸/۱±۲/۰ ^a	پیرووات
۹۸۲±۲۹/۵ ^a	۲۴۲۲/۱±۱۰/۳ ^c	۱۶۲۰/۳±۸/۷ ^{de}	۲۶۹۶/۴±۱۶/۰ ^b	۱۳۵۸/۷±۵۲/۶ ^c	۲۳۳۹/۷±۱۸/۱ ^c	۱۸۳۳/۶±۵۴/۰ ^d	۳۷۴۰/۱±۱۳۷/۶ ^a	کوئیتان
۵۷۵/۵±۳۷/۳ ^c	۱۱۶۷/۴±۴۳/۷ ^c	۶۹۹/۱±۱۵/۳ ^c	۱۴۸۲/۸±۳۳/۷ ^a	۴۰/۷/۴±۱۲/۸ ^g	۸۶۸/۷±۳۵/۷ ^d	۴۵۷/۲±۳۳/۱ ^g	۱۳۲۱/۵±۲۵/۹ ^b	شیکمیات
۸۷/۲±۲/۶ ^f	۹۸/۳±۱/۷ ^f	۱۵۹/۹±۴/۸ ^{cd}	۱۵۳/۱±۵/۷ ^d	۱۳۶/۶±۲/۶ ^c	۱۶۹/۹±۵/۴ ^c	۱۸۵/۸±۲/۲ ^b	۲۳۷/۸±۴/۷ ^a	سوکسینات

مقادیر بصورت میانگین (mg/g) ± خطای میار نشان داده شده است. حروف مشترک در هر ردیف نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار هستند.

با اعمال تنش شوری اختلاف قندها در هر دو زمان به طور محسوسی در ژنوتیپ حساس بیشتر از متتحمل بود. اسیدهای آلی به دو خوشه اصلی که شامل شرایط کنترل و شوری بودند، گروه‌بندی شدند. خوشه‌ی کنترل به دو زیر خوشه زمان‌های ۶ و ۵ ساعت تفکیک شدند و در نهایت در هر یک از زمان‌ها ژنوتیپ‌های متتحمل و حساس در یک گروه قرار گرفتند. خوشه شوری بر اینکه زمان‌های ۶ و ۵ ساعت در زیر خوشه‌های مجزا قرار نگرفتند ژنوتیپ‌های متتحمل و حساس نیز در گروه‌های مجزا تفکیک شدند. زمان‌های نمونه‌برداری ۶ و ۵ ساعت بیشترین شیاهت را در شرایط کنترل داشتند و این شیاهت در زمان ۵ ساعت به مرتب بیشتر از زمان نمونه‌برداری ۶ ساعت بود، اما با اعمال تیمار شوری اختلاف اسیدهای آلی در دو زمان به طور محسوسی کاهش یافت.

گروه‌بندی نمونه‌ها بر اساس مقادیر متاپولیت‌ها

با استفاده از نقشه دمایی، نمونه‌های مختلف به طور جداگانه برای اسیدهای آمینه، قندها و اسیدهای آلی گروه‌بندی شدند (شکل ۱). داده‌های اسیدآمینه حاصل از آنالیز GC-MS در دو خوشه اصلی که شامل شرایط کنترل و شوری بودند، گروه‌بندی شدند. خوشه شوری به نوبه خود بر اساس زمان‌های ۶ و ۵ ساعت به دو زیر خوشه تفکیک شدند و در نهایت در هر یک از زمان‌ها، دو ژنوتیپ متتحمل و حساس در یک گروه قرار گرفتند. در خوشه کنترل زمان‌های ۶ و ۵ ساعت در کلاس‌های جداگانه‌ای قرار نگرفتند ولی در نهایت دو ژنوتیپ متتحمل و حساس در یک گروه قرار گرفتند. بیشترین شیاهت ژنوتیپ‌ها در زمان نمونه‌برداری ۶ ساعت در شرایط شوری بود. برای داده‌های قندهای شرایط کنترل و شوری در گروه‌های مجزا قرار نگرفتند. در شرایط کنترل ژنوتیپ‌ها در هر دو زمان نمونه‌برداری بیشترین شیاهت را به هم داشتند اما



شکل ۱- نقشه دمایی همراه با تجزیه و تحلیل خوشای سلسله مراتبی (HCA). a) اسیدهای آمینه، b) اسیدهای آبی، c) داده‌ها به صورت لگاریتم ۱۰ میانگین‌ها به دست آمده از پنج تکرار بیولوژیکی هستند. رنگ‌های قرمز و سبز به ترتیب مقادیر بالا و پایین را نشان می‌دهند.

Figure 1. Heatmap combined with hierarchical cluster analysis (HCA). a) Amino acids, b) Sugar and C) Organic acids, the data are \log_{10} of the means obtained of the five biological replications. The Red and green colors indicate the higher and the lower values, respectively

مدت پس از وقوع تیمار شوری، نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اسیدانی آنها بود.

تشکر و قدردانی

از موسسه بین‌المللی تحقیقات برنج در فیلیپین (IRRI) بهجهت در اختیار قرار دادن بذور، از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و همچنین گروه بیوشیمی گیاهی واقع در دانشگاه Heinrich-Heine، دوسلدورف، آلمان، برای فراهم کردن امکانات لازم جهت تحقیقات متابولومیکس، تشکر و قدردانی می‌گردد.

در این تحقیق پروفایلینگ متابولیت‌ها بر اساس آنالیز GC-MS به خوبی توانست واکنش ریشه گیاه‌های برنج به تنش شوری بالا را نشان دهد. از بین متابولیت‌های اندازه‌گیری شده، اسیدهای آمینه بیشترین تجمع را در پاسخ به شوری داشتند و با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض شوری، اختلاف ژنتیکی‌های متتحمل و حساس بیشتر شد. نتایج این تحقیق بیانگر نقش سازوکارهای تنظیم اسمزی از طریق تجمع اسیدهای آمینه در القای تحمل به شوری ژنتیک متتحمل CSR28 بود. افزایش تجمع قندهای رافینیز و میواینوزیتول در ژنتیک متتحمل مخصوصاً در شرایط طولانی

منابع

- Ashraf, M. and M.R. Foolad. 2007. Role of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59: 206-216.
- Batista-Silva, W., B. Heinemann, N. Rugen, A. Nunes-Nesi, W.L. Araújo, H.P. Braun and T.M. Hildebrandt. 2019. The role of amino acid metabolism during abiotic stress release. Plant, Cell and Environment, 42(5): 1630-1644.
- Chaves, M., J. Flexas and C. Pinheiro. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. Annals of Botany, 103(4): 551-560.
- Fiehn, O., J. Kopka, P. Dörmann, T. Altmann, R.N. Trethewey and L. Willmitzer. 2000. Metabolite profiling for plant functional genomics. Nature Biotechnology, 18(11): 1157.
- 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. 2018. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Accessed 01 Apr 2020).
- Fougere, F., D.L. Rudulier and J.G. Streeter. 1991. Effects of salt stress on amino acids, organic acids, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Plant Physiology, 96: 1228-1236.
- Funck, D., B. Stadelhofer and W. Koch. 2008. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. BMC Plant Biology, 40: 1-14.

9. Gerona, M.E.B., M.P. Deocampo, J.A. Egdane, A.M. Ismail and M.L. Dionisio-Sese. 2019. Physiological Responses of Contrasting Rice Genotypes to Salt Stress at Rice Reproductive Stage. *Science*, 26(4): 207-219.
10. Good, A.G. and S.T. Zaplachinski. 1994. The effects of drought stress on free amino acid accumulation and protein-synthesis in *Brassica napus*. *Physiology Plant*, 90: 9-14.
11. Gu, J., K. Weber, E. Klemp, G. Winters, S.U. Franssen, I. Wienpahl and E. Bornberg Bauer. 2012. Identifying core features of adaptive metabolic mechanisms for chronic heat stress attenuation contributing to systems robustness. *Integrative Biology*, 4(5): 480-493.
12. Hashemi, A., GH. Nematzadeh, GH. Hosseini Salekdeh, S.A. Hosseini and M.R. Hajirezaei. 2012. Physiological and metabolic responses in rice under salt stress. *Crop Biotechnology*, 2: 1-14 (In Persian).
13. Heenan, D., L. Lewin and D. McCaffery. 1988. Salinity tolerance in rice varieties at different growth stages. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 28(3): 343-349.
14. Hu, C.A., A.J. Delauney and D.P. Verma. 1992. A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19): 9354-9358.
15. Hu, L., K. Zhou, Y. Li, X. Chen, B. Liu, C. Li. and F. Ma. 2018. Exogenous myo-inositol alleviates salinity-induced stress in *Malus hupehensis* Rehd. *Plant Physiology and Biochemistry*, 133: 116-126.
16. Jia, Q., D. Kong, Q. Li, S. Sun, J. Song, Y. Zhu and J. Huang. 2019. The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16): 3999.
17. Jiménez-Bremont, J.F., A. Becerra-Flora, E. Hernández-Lucero, M. Rodríguez-Kessler, J.A. Acosta-Gallegos and J.G. Ramírez-Pimentel. 2006. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biología Plantarum*, 50(4): 763-766.
18. Joshi, V., J.G. Joung, Z.J. Fei and G. Jander. 2010. Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids*, 39: 933-947.
19. Kim, J.K., T. Bamba, K. Harada, E. Fukusaki and A. Kobayashi. 2007. Time-course metabolic profiling in *Arabidopsis thaliana* cell cultures after salt stress treatment. *Journal of Experimental Botany*, 58: 415-424.
20. Lehmann, M., M. Laxa, L. Sweetlove, A. Fernie and T. Obata. 2012. Metabolic recovery of *Arabidopsis thaliana* roots following cessation of oxidative stress. *Metabolomics*, 8: 143-153.
21. Liang, J., Y. Qu, C. Yang, X. Ma, G. Cao and Z. Zhao. 2010. Identification of QTLs associated with salt or alkaline tolerance at the seedling stage in rice under salt or alkaline stress. *Euphytica*, 01: 201.
22. Lisec, J., N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer and A. Fernie. 2006. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1: 387-396.
23. Nemati, I., F. Moradi, M.A. Esmaeili and S. Gholizadeh. 2011. The effect of salinity stress on ions and soluble sugars distribution in leaves, leaf sheaths and roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Soil Environ*, 1: 26-33.
24. Nishizawa, A., Y. Yabuta and S. Shigeoka. 2008. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, 147(3): 1251-1263.
25. Omrani, B. and S. Moharramnejad. 2017. Study of salinity tolerance in four maize (*Zea Mays* L.) Hybrids at Seedling Stage. *Journal of Crop Breeding*, 9(24): 79-86 (In Persian).
26. Pandit, A., V. Rai, T.R. Sharma and N. K. Singh. 2011. Differentially expressed genes in sensitive and tolerant rice varieties in response to salt-stress. *Plant Biochemistry and Biotechnology*, 20: 149–154.
27. Valliyodan, B. and H.T. Nguyen. 2006. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 9: 1-7.
28. Verbruggen, N. and C. Hermans. 2008. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35: 753-759.
29. Wang, J., J. Zhu, Y. Zhang, F. Fan, W. Li, F. Wang and J. Yang. 2018. Comparative transcriptome analysis reveals molecular response to salinity stress of salt-tolerant and sensitive genotypes of indica rice at seedling stage. *Scientific reports*, 8(1): 1-13.
30. Wang, W.S., X.Q. Zhao, M. Li, L.Y. Huang, J.L. Xu, F. Zhang and Z.K. Li. 2016. Complex molecular mechanisms underlying seedling salt tolerance in rice revealed by comparative transcriptome and metabolomic profiling. *Journal of Experimental Botany*, 67(1): 405-419.
31. Widodo, P., J.H.E. Newbiggin, M. Tester, A. Bacic and U. Roessner. 2009. Metabolic responses to salt stress of barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars, Sahara and Clipper, which differ in salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 60: 4089-4103.
32. Yancey, P.H. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, 208(15): 2819-2830.
33. Yoshida, S., D.A. Forno and J.H. Cock. 1976. Laboratory manual for physiological studies of rice. 3th edn. Los Banos, Laguna, Philippines, 83 pp.
34. Zhu, J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53(1): 247-273.

Response of some of Primary Metabolites in Rice (*Oryza sativa L.*) Root to Salinity Stress

**Mojdeh Akbarzadeh Lelekami¹, Mohammad Hadi Pahlevani², Khalil Zaynali Nezhad³,
Keyvan Mahdavi Mashaki⁴, Andreas P.M. Weber⁵ and Dominik Brilhaus⁶**

1- PhD Student, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
(Corresponding author: m.akbarzade67@yahoo.com)

2 and 3- Associate Professor and Assistant Professor, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural
Resources

4- Assistant Professor, Rice Research Institute of Iran, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and
Extension Organization (AREEO), Amol, Iran

5 and 6- Professor and Assistant Professor Heinrich Heine University (HHU), Düsseldorf, Germany

Received: April 10, 2020 Accepted: June 10, 2020

Abstract

In order to investigate the metabolic responses of rice root under salinity stress at seedling stage, an experiment was conducted at greenhouse with five replications as factorial in a completely randomized design including two salinity levels (0 and 150 mM), two sampling times (6h and 54h) and two genotypes CSR28 (tolerant) and IR28 (susceptible). In total, GC-MS analysis identified 36 primary metabolites (including 18 amino acids, five sugars and sugar alcohols and 13 organic acids). The amino acids showed the highest accumulation in facing to high salinity. Moreover, the genotypes showed more differences after the long-term of salinity treatment and the tolerant genotype CSR28 had the highest accumulation of amino acids suggesting the role of osmotic adjustment mechanisms on inducing of salt-tolerance. Among the sugars, raffinose and myoinositol had more accumulation specifically in the tolerant genotype at 54h time point, indicating their antioxidant activity. Generally, these findings emphasized the importance of identification and dissection of metabolic pathways for understanding of the salt-tolerance molecular mechanisms and consequently improving the development of salt-tolerant varieties in rice.

Keywords: Seedling stage, Amino acid, Sugar, Osmotic adjustment, GC-MS analysis