

**ORIGINAL ARTICLE**

## Comparative Profiles of Primary Metabolites of *Suaeda salsa* under Different Salt Stress Conditions

Shima Jamalirad<sup>1</sup>, Mohammad Reza Azimi<sup>2\*</sup>, Nayer Azam KhoshKholgh Sima<sup>3</sup>, Mohammad Reza Ghaffari<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran.

<sup>2</sup>Department of Plant Breeding and Biotechnology (PBB), Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran.

<sup>3</sup>Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

<sup>4</sup>Department of System Biology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

**Correspondence**

Mohammad Reza Azimi  
Mohammad Reza Ghaffari  
Email: [azimi@znu.ac.ir](mailto:azimi@znu.ac.ir)  
[mrghaffari52@gmail.com](mailto:mrghaffari52@gmail.com)

**How to cite**

Jamalirad, Sh., Azimi, M.R., KhoshKholgh Sima, N.A., & Ghaffari, M. R. (2023). Comparative Profiles of Primary Metabolites of *Suaeda salsa* under Different Salt Stress Conditions. *Crop Biotechnology*, 12(42), 79-89.

**ABSTRACT**

*Suaeda salsa* is an annual halophyte with nutritional value and high salt tolerance, making it crucial as an oil, medicinal, and edible plant. Currently, there is limited research in the field investigating metabolic diversity in *S. salsa*. In this study, our aim was to understand the salinity tolerance mechanism by examining metabolic diversity, specifically the amino acids profile, in *S. salsa* exposed to 0 mM, 200 mM, and 800 mM NaCl. The results of the physiological study indicated that salinity significantly affected the sodium (Na<sup>+</sup>) content in the aerial parts of the plant, with a significant increase compared to the control. Principal component analysis (PCA) revealed that differences in metabolic diversity can explain 96% of the phenotypic variation in *S. salsa* under salinity stress. Comparison of amino acids profiles at different salinity levels showed the highest accumulation of proline, methionine, citrulline, and lysine under 800 mM salt stress. Given the crucial role of these amino acids in *S. Salsa*, further studies are necessary to uncover the mechanisms behind the adaptation response.

**KEYWORDS**

Amino acids profile, Salinity stress, *Suaeda salsa*.

نشریه علمی

## زیست فناوری گیاهان زراعی

«مقاله پژوهشی»

# مقایسه پروفایل متابولیت‌های اولیه گیاه *Suaeda salsa* تحت شرایط مختلف تنش شوری

شیرا جمالی‌راد<sup>۱</sup>، محمدرضا عظیمی<sup>۲\*</sup>، نیراعظم خوش‌خلق سیما<sup>۳</sup>، محمدرضا غفاری<sup>۴\*</sup>

### چکیده

*Suaeda salsa* یک شبه هالوفیت یکساله با ارزش غذایی و تحمل شوری بالا بوده که به عنوان یک گیاه روغنی، دارویی و خوراکی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در حال حاضر مطالعات محدودی در زمینه بررسی تنوع متابولیکی در گیاه *S. salsa* وجود دارد. در این مطالعه برای درک شاخص تحمل به شوری با استفاده از بررسی تنوع متابولیکی پروفایل اسیدهای آمینه در گیاه *S. salsa* در غلظت‌های ۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی مولار NaCl مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی فیزیولوژیک نشان داد، شوری به صورت معنی‌داری، محتوای سدیم ( $Na^+$ ) را در اندام‌های هوایی گیاه تحت تأثیر قرار می‌دهد، به طوری که میزان آن در اندام‌های هوایی گیاه *S. salsa* در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. علاوه بر این تجزیه به مولفه‌های اصلی نتایج نشان داد که تفاوت در تنوع متابولیکی قادر است ۹۶ درصد از تغییرات فنوتیپی در گیاه *S. salsa* را تحت شوری توجیه نماید. مقایسه پروفایل اسیدهای آمینه در سطوح مختلف شوری نشان داد پرولین، متیونین، سترولین و لیزین بیشترین تجمع را تحت تنش ۸۰۰ میلی مولار دارا می‌باشند. با توجه به نقش مهم این اسیدهای آمینه در کنترل تنش شوری مطالعات بیشتر برای کشف مکانیزم‌های سازگاری تحمل به شوری در گیاه *S. salsa* ضروری است.

### واژه‌های کلیدی

پروفایل اسیدهای آمینه، تنش شوری، *Suaeda salsa*.

<sup>۱</sup> گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.  
<sup>۲</sup> گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.  
<sup>۳</sup> بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.  
<sup>۴</sup> بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

نویسنده مسئول:

محمدرضا عظیمی و محمدرضا غفاری

رایانامه: [azimi@znu.ac.ir](mailto:azimi@znu.ac.ir)

[Mrghaffari52@gmail.com](mailto:Mrghaffari52@gmail.com)

استناد به این مقاله:

جمالی‌راد، شیرا، عظیمی، محمدرضا، خوش‌خلق سیما، نیراعظم و غفاری، محمدرضا (۱۴۰۲). مقایسه پروفایل متابولیت‌های اولیه گیاه *Suaeda salsa* تحت شرایط مختلف تنش شوری. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی، ۱۲(۴۲)، ۷۹-۸۹.

## مقدمه

(*al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019).

تحت تنش‌های غیرزیستی متابولیسم گیاه مختل شده و گیاهان برای حفظ متابولیسم پایه و رسیدن به هموستازی جدید، نیاز به تنظیم سطوح متابولیسمی خود دارند (Li and Song 2019). از آنجایی که تنوع متابولیسمی به طور مستقیم با فنوتیپ موجود زنده ارتباط دارد، تغییر در نوع و مقدار متابولیت‌ها می‌تواند نحوه سازگاری ارگانیزم را با تغییرات محیطی نشان دهد (Shulaev *et al.*, 2008; Fukusaki and Kobayashi., 2005). تغییر در میزان متابولیت‌های اولیه که شامل تجمع الکل‌ها، قندها و اسیدهای آمینه برای سازگاری با استرس اسمزی می‌باشد بعنوان بارزترین واکنش گیاهان به تنش است (Li and Song., 2019; Obata and Fenie., 2012). اسیدهای آمینه نقش‌های مختلفی را در گیاهان تحت تنش از جمله تاخیر در پرمردگی، مهار رادیکال‌های آزاد، محدودیت در جذب یون سدیم و افزایش نسبت  $K^+/Na^+$  و ممانعت از بازشدن روزه‌ها ایفا می‌کنند. همچنین اسیدهای آمینه می‌توانند به عنوان پیش‌ساز در مسیرهای متابولیسمی دیگر مانند سنتز آسکوربیت اسید و پلی آمین‌ها نیز مورد استفاده قرار گیرند (Cuin and Shabala., 2007; El-Samad *et al.*, 2011; Kusano *et al.*, 2008; Nasir *et al.*, 2010). بنابراین، میزان و اثرات متقابل اسیدهای آمینه می‌تواند منجر به حفظ تعادل گیاه در شرایط تنش شود (Nasir *et al.*, 2010, Parida *et al.*, 2016). هالوفیت‌ها، از نظر ترکیب اسیدهای آمینه تنوع گسترده‌ای را در بین گونه‌های مختلف تحت شرایط شوری دارا می‌باشند. برخی از هالوفیت‌ها سطح بالایی از آمینواسیدهای آزاد را در پاسخ به شوری نشان می‌دهند و برخی دیگر، قادر به جمع‌آوری ترکیبات آلی برای تنظیم اسمزی هستند (Di Martino *et al.*, 2003; Ramanjulu *et al.*, 2000). دیده شده که متابولیت‌های *S. salsa* با افزایش سطح شوری افزایش می‌یابد. اما برخلاف سایر متابولیت‌ها، اغلب اسیدهای آمینه (بدون در نظر گرفتن مشتقات آن‌ها)، در شرایط تنش کاهش یافتند (Li and Song., 2019). از آنجایی که اطلاعات محدودی در مورد اثرات تنش شوری بر روی محتوای آمینوسیدی *S. salsa* در مرحله گیاهچه‌ای وجود دارد، در این مطالعه، میزان اسیدهای آمینه در شوری‌های مختلف در گیاه *S. salsa* در مرحله گیاهچه‌ای اندازه‌گیری شد. سپس مقایسه پروفایل اسیدهای آمینه در شوری‌های مختلف در گیاه *S. salsa* در مرحله گیاهچه‌ای برای درک مکانیزم تحمل به شوری در گیاه *S. salsa* بررسی شد.

چهارصد میلیون هکتار از اراضی کشاورزی دنیا که ۷ درصد از کل اراضی را شامل می‌شود با مشکل شوری مواجه است. این میزان سالانه چیزی حدود ۱۲ میلیارد دلار خسارت را به محصولات کشاورزی وارد می‌آورد (Diray-Arca *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020). کشور ایران به علت متوسط بارندگی پایین، جزو مناطق خشک و نیمه‌خشک به حساب می‌آید که از جمله تنش‌های معمول غیرزیستی در این مناطق، تنش شوری است (Nerd and Pasternak, 1992). تنش شوری اثرات منفی بر رشد و نمو گیاهان دارد و به تدریج باعث کاهش بهره‌وری محصول می‌شود. شوری بیش از حد خاک می‌تواند باعث سمیت یونی و کمبود مواد مغذی شده و تغییرات متابولیسمی را ایجاد کند که بر رشد کلی گیاهان حساس به شوری تأثیر می‌گذارد. بنابراین، استفاده از استراتژی‌های هالوفیت‌های سازگار با محیط‌های خاص برای بهبود زمین‌های شور-قلیا، احیای مراتع و ایجاد گیاهان متحمل به شوری از اهمیت حیاتی برخوردار است (Lu *et al.*, 2022; panta *et al.*, 2014; Zao *et al.*, 2017). هالوفیت‌ها به علت تحمل بالای شوری، قادر به رشد در زمین‌هایی می‌باشند که میزان شوری خاک در آنها بیش از ۲۰۰ میلی‌مولار است. برخی از جنس‌های هالوفیت به علت داشتن مواد معدنی مفید، ویتامین‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به عنوان یک منبع غذایی در کشاورزی شورورزی محسوب می‌شوند (Flowers *et al.*, 2010; Song and Wong., 2015; Meng *et al.*, 2018). در بین هالوفیت‌ها، جنس *Suaeda* به علت داشتن گونه‌های مفید از نظر ارزش غذایی و دارویی بسیار حائز اهمیت است. گیاهان این جنس متعلق به خانواده *Amaranthaceae* بوده و جزو هالوفیت‌های اجباری (برای رشد خود نیاز به نمک دارند) محسوب می‌شوند (Cheng *et al.*, 2019; Xu *et al.*, 2017). *S. salsa* به علت تحمل بالای شوری در طول مراحل جوانه زنی، رشد رویشی و زایشی، گیاهی شاخص برای زمین‌های شور-قلیایی در نظر گرفته می‌شود و بهترین گیاه برای اصلاح این زمین‌ها است. مطالعات نشان داده‌اند که *S. salsa* دارای توانایی پایداری برای انتقال نمک در شرایط کاشت مصنوعی است و کاشت مداوم آن می‌تواند به طور موثر خاک شور را در مناطق خشک بهبود بخشد. همچنین استفاده از این گیاه بصورت دارویی، خوراکی و دانه روغنی موجب می‌شود که کشت آن در زمین‌های لم یزرع، صرفه اقتصادی را به همراه داشته باشد (lu *et al.*, 2022; Meng *et al.*, 2018; li and song 2019; Zhao *et*

ناین هیدرین در ۳۰ میلی لیتر اسید استیک خالص و ۲۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۶ مولار، بر روی همزن آماده شد (معرف حاصل باید در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شود). ۵۰۰ میلی‌گرم نمونه گیاهی در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالسیلیک ۳٪ (وزنی/حجمی) همگن و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. محلول رویی با حجم مساوی اسید استیک خالص و معرف ناین هیدرین (۱:۱:۱) مخلوط شده و نمونه‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم و در دمای ۹۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. واکنش با استفاده از حمام یخ متوقف و رنگ حاصل (حاوی تولوئن) با اضافه کردن دو میلی لیتر تولوئن و پس از یک دقیقه ورتکس ظاهر و از فاز آبی جدا شد. در انتها، خوانش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر BioMate (Thermospectronic USA) در طول موج ۵۲۰ نانومتر صورت گرفت.

#### آنالیز داده‌ها

تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار R، نسخه ۴.۳.۱ و پکیج agricolae صورت گرفت. برای تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز (PCA) از محیط نرم افزاری R و پکیج factoextra استفاده شد. همبستگی اسیدهای آمینه و معنی‌داری آن‌ها در غالب پکیج corplot (بر مبنای ضریب پیرسون) انجام شد. به منظور بررسی روابط اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی و میزان هر یک در سطوح مختلف شوری از نرم‌افزار VANTED نسخه ۲.۶.۵ استفاده شد.

#### نتایج و بحث

بررسی میزان رشد *Suaeda salsa* در سطوح شوری مختلف نشان داد که با افزایش سطح شوری به میزان ۸۰۰ میلی مولار سرعت رشد به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. با اینحال با توجه به این که زیستگاه این گیاه مناطق شور بخصوص مناطق ساحلی است در سطوح شوری ۲۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد گیاه رشد بهتری را نشان داد. کاهش رشد در سطح شوری ۸۰۰ میلی مولار اگرچه کاملاً معنی‌دار بود ولی بازم گیاه توانایی رشد و جوانه‌زنی را در این میزان شوری نشان داد که حاکی از تحمل به شوری بالا می‌باشد.

علاوه‌براین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که شوری به صورت معنی‌داری، محتوای  $\text{Na}^+$  را در اندام‌های هوایی گیاه تحت

#### مواد و روش‌ها

بذرهای *S. salsa* در سطوح مختلف شوری ۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی‌مولار و در غالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار کشت شدند. پس از ۳۴ روز کشت و نگهداری در سطوح مختلف شوری و محلول هوگلند، نمونه‌برداری در مرحله گیاهچه‌ای از اندام هوایی انجام و نمونه‌ها در فریزر -۸۰ نگهداری شدند.

#### اندازه‌گیری محتوای $\text{Na}^+$ و $\text{K}^+$

برای اندازه‌گیری میزان سدیم و پتاسیم، ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های پودر شده به منظور تولید خاکستر، در داخل کوره الکتریکی با دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد (به مدت ۴ ساعت) قرار گرفت. سپس به هر یک از نمونه‌ها ۱۰ میلی لیتر اسیداستیک ۱۰ درصد اضافه و به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شدند. بعد از قرار دادن نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم (با دمای ۱۰۰ درجه) و فیلتر کردن هر یک از آن‌ها، به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر دیونیزه رقیق شدند. خوانش نمونه‌ها توسط دستگاه فیلم فتومتری (مدل Genway ساخت کشور انگلستان) صورت گرفت (Kord et al., 2019).

#### اندازه‌گیری اسیدهای آمینه

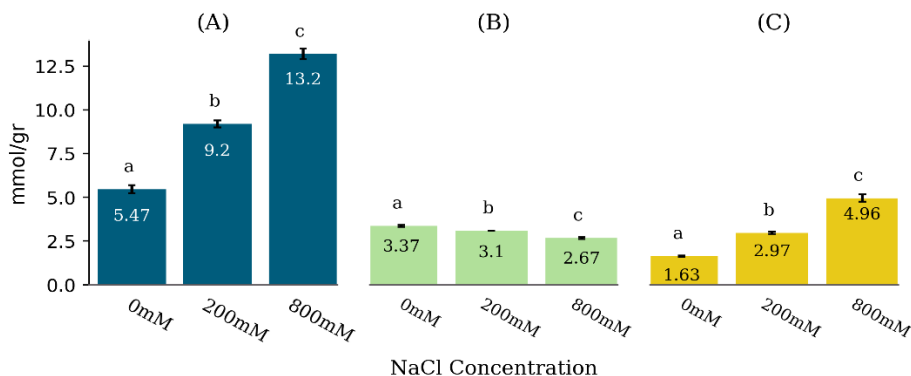
برای استخراج اسیدهای آمینه به ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های پودر شده ۱ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ اضافه شد. سپس نمونه‌ها برای مدت یک ساعت در دستگاه Thermomixer و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بعد از سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها در دور ۱۴۰۰۰ pm، محلول رویی به تیوپ‌های جداگانه منتقل و در دستگاه Concentrator خشک شدند. با اضافه کردن یک میلی لیتر آب دیونیزه به هر نمونه و فیلتر کردن هر یک از آن‌ها، مقادیر اسیدهای آمینه با استفاده از دستگاه HPLC (Knower)، فاز A: شامل استات سدیم و متانول به نسبت ۸ به ۲، فاز B: شامل استات سدیم و متانول به نسبت ۲ به ۸، فاز C: شامل استونیتریل و ردیاب UV (طول موج ورودی ۳۵۰ و خروجی ۴۵۰) اندازه‌گیری شد (Yazdanpanah et al., 2020).

#### اندازه‌گیری پرولین

محتوای پرولین با استفاده از روش مبتنی بر ناین هیدرین در A520 نانومتر (روش Bates و همکاران (۱۹۷۳)) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، ابتدا اسید ناین هیدرین با گرم کردن ۱.۲۵ گرم

و در نتیجه تحمل گیاه تحت تنش شوری افزایش یابد. افزایش میزان سدیم در سطح ۸۰۰ میلی مولار نسبت به حالت نرمال تقریباً سه برابر بود. نکته قابل توجه این بود که افزایش نسبت سدیم به پتاسیم در حالت ۸۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد نیز معادل همین میزان بوده که نشان دهنده کاهش ناچیز پتاسیم و تحمل گیاه در سطح ۸۰۰ میلی مولار است.

تأثیر قرار می‌دهد، به طوریکه میزان  $\text{Na}^+$  در اندام‌های هوایی گیاه *S. salsa* در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد. علاوه بر این میزان پتاسیم با افزایش شوری بسیار کم بود که این گویای متحمل بودن این گیاه به سطوح شوری بالا بود (Guo et al., 2019). همانطور که قبلاً گزارش شده‌است وجود پمپ‌های یونی با تمایل بالا نسبت به پتاسیم مانند HKT1 باعث می‌شود که این گیاه در غلظت‌های بالای نمک قادر به جذب پتاسیم بوده

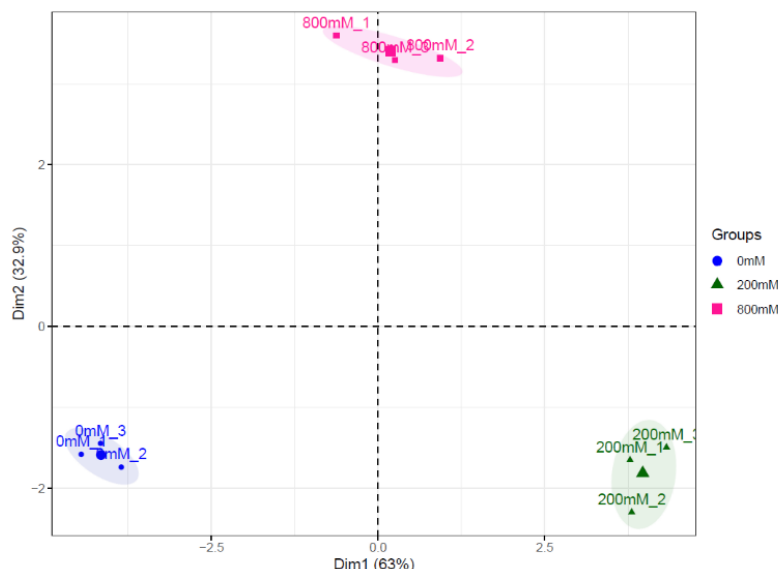


شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف شوری روی محتوای یون سدیم (A)، محتوای یون پتاسیم (B) و نسبت سدیم به پتاسیم (C) در گیاهچه‌های ۳۰ روزه *S. salsa*. حروف کوچک متفاوت روی هر نمودار نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

در سه گروه کاملاً مجزا دسته‌بندی شدند (شکل ۱). این نتایج نشان می‌دهد شوری اثر معنی‌داری در میزان اسیدهای آمینه مختلف تحت تنش مختلف شوری ایجاد نماید.

شکل ۲ همبستگی بین اسیدهای آمینه مختلف در سه سطح شوری را نشان می‌دهد. در شکل دو رنگ قرمز همبستگی مثبت بالا، رنگ آبی همبستگی منفی و رنگ سفید عدم همبستگی را نشان می‌دهد. پرولین، متیونین، سیترولین و لیزین کمترین همبستگی را با سایر اسیدهای آمینه دارا بودند. تریپتوفان، فنیل آلانین، والین، گلوتامات، تیروزین، سرین و هیستیدین همبستگی-های مثبت و معنی‌داری را نشان دادند. یک همبستگی مثبت و معنی‌دار بین گلیسین، ایزولوسین، گلوتامین، آلانین و لوسین نیز مشاهده شد. پرولین، متیونین، سیترولین و لیزین هم دارای همبستگی مثبت و معنی‌داری بودند. آسپاراتات، آسپارژین، ترئونین و آرژنین نیز به صورت مثبتی همبسته شد. همبستگی مثبت و معنی بین بیشتر اسیدهای آمینه را نشان می‌دهد که یک هم تنظیمی (co-regulation) برای مقابله با شوری در گیاه *S. salsa* همانطور که قبلاً در *Phragmites australis* نیز دیده شده وجود دارد (Xie et al., 2020).

متابولیت‌های گیاهان، تحت تنش‌های غیرزیستی دچار اختلال شده و گیاهان برای حفظ متابولیت‌های پایه و رسیدن به هموستازی جدید نیاز به تنظیم سطح متابولیت‌های خود دارند (Arbona et al., 2013; Arbelet-Bonnin et al., 2020). این رو، متابولومیکس مستقیم‌ترین ابزار برای مطالعه تنش‌های غیرزیستی از جمله شوری می‌باشد (Hong et al., 2016). از آنجایی که، تغییر در تنوع متابولیت‌های اولیه از جمله اسیدهای آمینه، بارزترین واکنش گیاهان به تنش شوری برای مقابله با استرس اسمزی است، بررسی میزان هر یک از اسیدهای آمینه و تعیین ارتباط آن‌ها با تنش شوری می‌تواند به شناسایی اسید آمینه‌های شاخص و مرتبط با تنش شوری و آستانه تحمل گیاه منجر شود (Fukusaki and Kobayashi., 2005; Li and song., 2019). بر این اساس، در مطالعه حاضر، ۱۹ اسید آمینه به همراه سیترولین در اندام‌های هوایی *S. salsa* در پاسخ به سه سطح شوری ۰، ۲۰۰ و ۸۰۰ میلی مولار اندازه‌گیری و به منظور تعیین روابط بین اسیدآمینه‌ها و سطوح شوری به مولفه‌های اصلی تجزیه شد. نتایج نشان داد که دو مولفه اول قادر بودند حدود ۹۶ درصد تغییرات را توجیه و سطوح شوری را به خوبی تفکیک نمایند. به طوری که در نمایش دوی بعدی سطوح شوری، شوری‌های مختلف



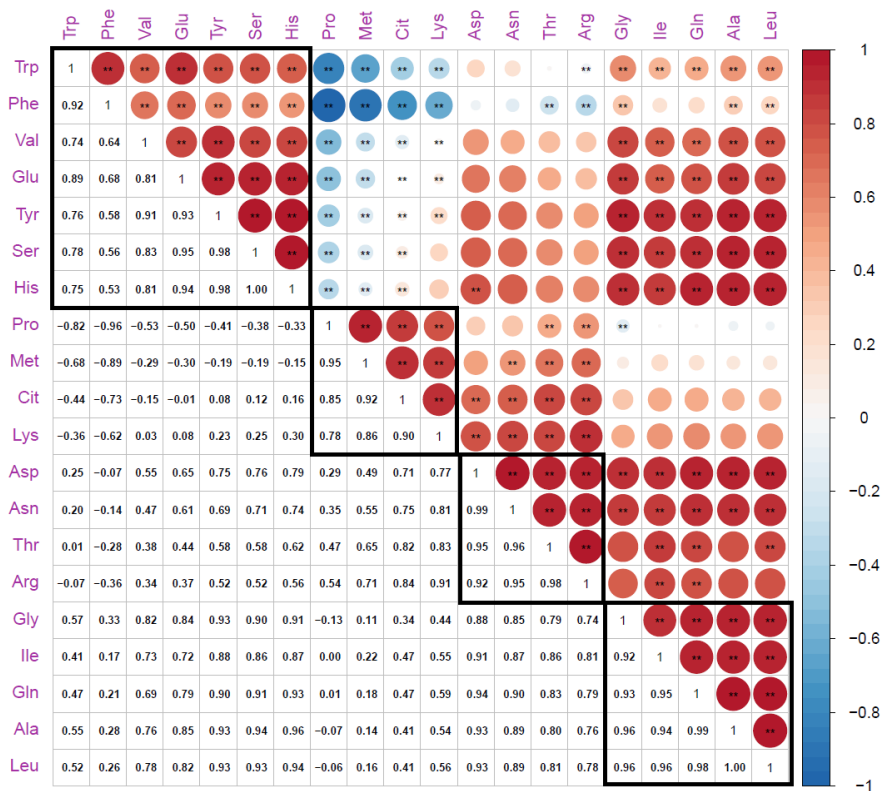
شکل ۲. گروه‌بندی سطوح شوری براساس تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA). در گروه‌بندی حاصل سطوح شوری بکار رفته به خوبی از یکدیگر تفکیک شدند و در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند.

معنی‌داری افزایش یافته و در غلظت ۸۰۰ میلی‌مولار ترتیب به ۴.۵، ۲، ۱.۵ و ۱.۵ برابر شاهد را نشان داد. این تغییرات برای دیگر اسیدهای آمینه معنی‌دار نبودند.

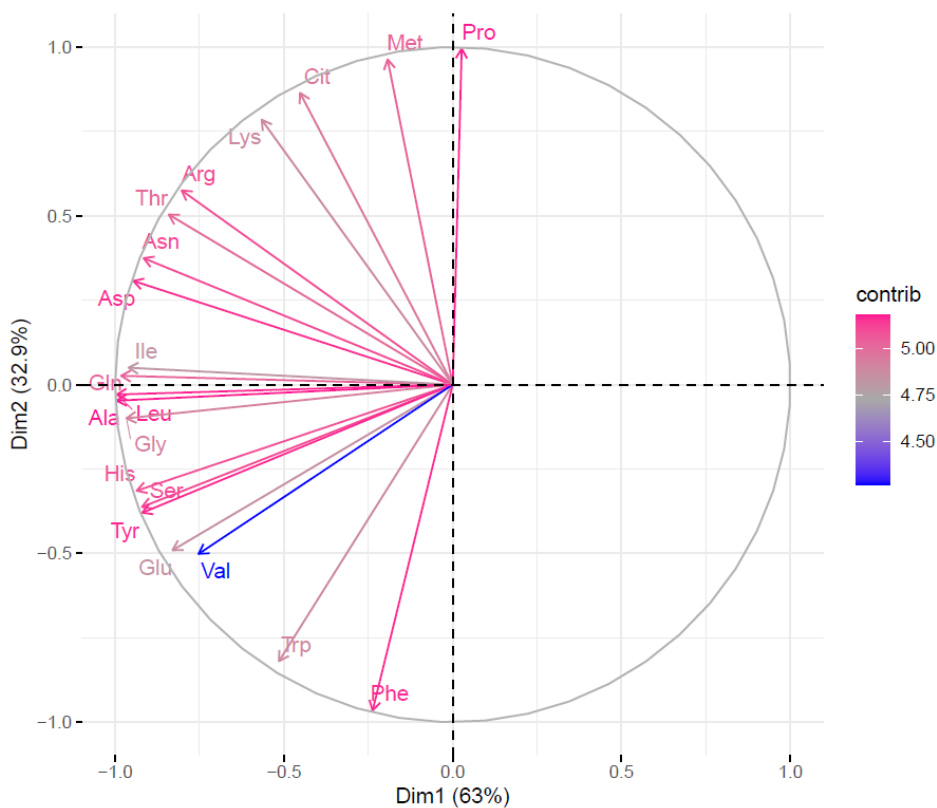
مطالعات انجام شده در دیگر هالوفیت نشان می‌دهد یک همبستگی مثبت بین تجمع پرولین و میزان تحمل به شوری وجود دارد (Hartzendorf and Rolletschek., 2001; Thomas *et al.*, 1992). پرولین در مقادیر بالاتری نسبت به سایر اسیدهای آمینه در پاسخ به شوری تجمع می‌یابد (Abraham *et al.*, 2003)، در گیاهان هالوفیت نیز تجمع پرولین در پاسخ به استرس‌های شوری بسیار گسترده بوده و می‌تواند شاخص مفیدی برای استرس شوری در این گیاهان نیز به حساب آید (Xie *et al.*, 2020). این عمل بیشتر در سیتوزول برای تنظیمات اسمزی که پرولین در آن نقش دارد اتفاق می‌افتد و از اثرات تخریبی NaCl بر روی غشاء سلول جلوگیری می‌کند (Ahmad and Satyawati., 2008; Mansour 1998). در این مطالعه افزایش معنی‌دار ۴.۵ برابر پرولین در غلظت ۸۰۰ میلی‌مولار NaCl نسبت به شاهد مشاهده شد.

به منظور درک بهتر همبستگی بین اسیدهای آمینه نیز، از نمودار تجزیه به مولفه‌های اصلی متغیرها (اسیدآمینه) استفاده شد. این نمودار، رابطه بین اسیدهای آمینه را در بین سطوح شوری مختلف نشان می‌دهد. به طوری که زوایای تند و منفرجه به ترتیب همبستگی مثبت و منفی را نشان می‌دهند. بر این اساس، پرولین با اسید آمینه‌هایی مانند، متیونین، سیتروئین، لیزین، آرژنین، ترئونین همبستگی مثبت و با اسیدآمینه‌هایی مانند فنیل آلانین و تریپتوفان همبستگی منفی داشت. بزرگی هر فلش بزرگی اثر هر یک از اسیدهای آمینه را در تفکیک سطوح شوری نیز نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، بجز اسیدآمینه والین تمامی اسیدهای آمینه در محدوده طیف صورتی که نشان دهنده بزرگی اثر فاکتور مربوطه برای جداسازی سطوح شوری می‌باشد، قرار گرفتند.

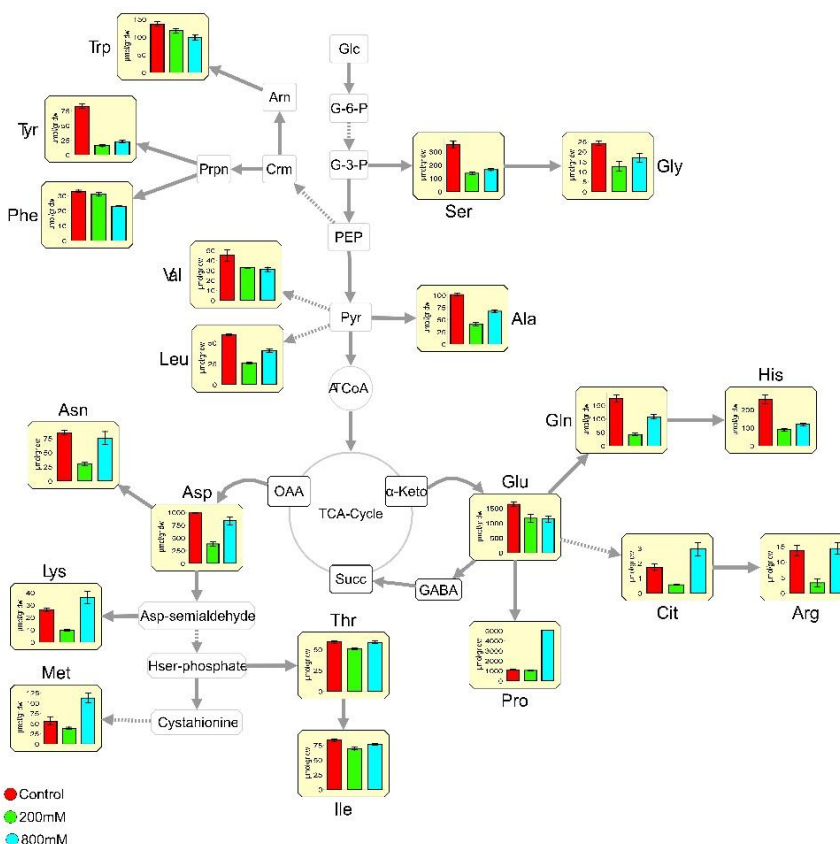
شکل ۵ نقشه‌یابی اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی مختلف را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد میزان اسیدهای آمینه در تنش 200 mM به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. سپس با افزایش میزان شوری تا ۸۰۰ میلی‌مولار یک افزایش معنی‌داری در میزان اسیدهای آمینه مشاهده شد (شکل ۴). با افزایش شوری میزان غلظت پرولین، متیونین، سیتروئین و لیزین به صورت



شکل ۳. همبستگی اسیدهای آمینه در سطوح شوری مختلف. رنگ قرمز همبستگی مثبت بالا، رنگ آبی همبستگی منفی و رنگ سفید عدم همبستگی را نشان می‌دهد. اکثر اسیدهای آمینه همبستگی مثبت و معنی‌داری را نشان دادند به جز پرولین که روند کاملاً متفاوتی را با اکثر اسیدهای آمینه دارا بود. تنها ۴ اسید آمینه (سیتروکلین، آرژنین، متیونین و آسپارژین) روند نسبتاً مشابهی را با پرولین نشان دادند.



شکل ۴. تجزیه به مولفه‌های اصلی برای اسید آمینه‌ها



شکل ۵. نقشه‌یابی اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی در سطوح مختلف شوری.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که در برخی از هالوفیت‌ها، پرولین با محافظت از پروتئین‌ها باعث کاهش اثرات نامطلوب یون‌های غیرآلی شده که این عمل را از طریق محافظت از پروتئین‌های ساختاری در برابر آسیب‌های ناشی از استرس و تنظیم مجدد آن‌ها انجام می‌دهد و در نهایت باعث تحمل هر چه بیشتر گیاه به غلظت‌های بالاتر شوری می‌شود (Khedr *et al.*, 2003). در مقادیر بهینه، پرولین فعالیت آنزیم‌ها را سرکوب نمی‌کند و به عنوان یک مولکول سیگنالینگ/تنظیم کننده نیز عمل کرده و چندین پاسخ که جز فرآیندهای سازگاری هستند را فعال می‌نماید (Maggio *et al.*, 2002). علاوه بر این، پرولین از طریق واسطه‌گری تنظیمات اسمزی و محافظت از ساختارهای سلولی در گیاهان تحت تنش، نقش مهمی را در سازگاری با تنش شوری ایفا می‌نماید (Ashraf and Harris., 2004). بنابراین با تعیین مقادیر این اسیدآمینه در سطوح مختلف شوری و افزایش معنی‌دار غلظت آن می‌توان آستانه خطر را برای گیاه نیز تخمین زد. در مطالعه‌ای که روی گیاه هالوفیت *Plantago crassifolia* صورت گرفته بود، افزایش سطح پرولین در غلظت ۵۰۰ میلی مولار نمک ۲۰ برابر شاهد گزارش شد (Vicente *et al.*,

2004). نتایج نشان داد که احتمالاً پرولین یک اسیدآمینه غالب و یک اسمولیت کننده قوی در این گیاه محسوب می‌شود. Yang و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که پرولین در *Phragmites australis* به طور قابل توجهی تحت تنش شوری افزایش یافته و یک همبستگی مثبت قوی با افزایش غلظت NaCl نشان می‌دهد. متیونین یک اسیدآمینه ضروری حاوی گوگرد است و در مسیرهای متابولیکی مختلفی نقش دارد. متیونین به عنوان یک اهداکننده سولفید برای تولید کوفاکتورهای آنتی‌اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها و پلی‌آمین‌ها نیز کمک می‌نماید. مطالعات اخیر نشان دادند، متیونین نقش کلیدی را در سنتز سیتوکینین‌ها و اکسین دارد، بنابراین کاربرد آن باعث بهبود رشد و عملکرد در گیاهان تحت تنش شوری می‌شود (Shahid *et al.*, 2023). پلی‌آمین‌ها، عملکردهای زیادی مانند حفظ تعادل یونی، محافظت از کروماتین و کاهش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) دارند که در غیر این صورت منجر به آسیب سلولی و در نهایت مرگ سلولی در هنگام تنش می‌شود. Bohnert and Jensen نشان دادند که چرخه متیل تحت تنش‌های آبی برای تولید پلی‌آمین‌ها مهم می‌باشد



کردند که در گونه‌هایی مانند *S. salsa* افزایش سطح شوری با افزایش نسبی تعداد محدودی اسیدآمین و افزایش معنی‌دار ترکیبات پلی آمینی همراه است. این در حالی است که در تعدادی از گونه‌های دیگر از جمله *Salicornia europaea* حفظ فشار اسمزی تنها با افزایش اسیدآمین‌های آزاد امکان پذیر می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

هالوفیت‌ها با افزایش و یا کاهش غلظت اسیدهای آمینه، الگوی قابل‌تغییری را در ترکیب اسید آمینه آزاد خود ایجاد می‌کنند. در این مطالعه، نشان داده شد که تنش شوری به طور قابل‌توجهی گیاه *S. salsa* را تحت تأثیر قرار داده و اثرات شوری بر روی اسیدهای آمینه نقش مهمی در سازگاری گیاه با تنش نمکی دارد. تجزیه به مولفه‌های اصلی مشخص نشان داد اسیدهای آمینه همبستگی مثبت و معنی‌داری را با افزایش سطح شوری داشته و می‌تواند شاخص مفیدی برای تنش شوری به حساب آیند. بررسی اسیدهای آمینه در مسیرهای متابولیکی نشان داد که بیشتر اسیدهای آمینه تحت شوری کاهش معنی‌داری نشان دادند. پرولین با دارا بودن روندی همگام با افزایش شوری، بیشترین همبستگی را با میزان شوری دارا بود. در شوری ۸۰۰ میلی مولار که حد‌آستانه گیاه به تنش شوری است، پرولین بصورت معنی-داری تجمع را نشان داد که این تغییرات می‌تواند موجب حفاظت از پروتئین‌ها در شرایط شوری شود. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی برای تحمل به شوری مورد استفاده قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، بخش زیست‌شناسی سامانه‌ها و بخش فیزیولوژی مولکولی جهت فراهم آوردن امکانات لازم این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

### References

- Abrahám, E. Rigó, G. Székely, G. Nagy, R. Koncz, C. *et al.* (2003). Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 51 (3), 363-372.
- Ahmad, P. Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants - A review. *Plant, Soil and Environment*, 54(3), 89-99.
- Arbelet-Bonin, D. Blasselle, C. Rose Palm, E.

(Bohnert and Jensen., 1996). بنابراین، این احتمال وجود دارد که افزایش فعالیت متیونین سنتاز در هنگام القای شوری می‌تواند نقش مهمی را به عنوان عضوی از این چرخه برای تحمل نمک در گیاهان ایفا نماید (Narita *et al.*, 2004). در مطالعه حاضر، افزایش معنی‌دار متیونین در شوری ۸۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد نشان داد که در گیاه *S. salsa* متیونین نقش مهمی را در افزایش تحمل به شوری ایفا می‌کند و همچنین می‌تواند شاخص نسبتاً خوبی برای تخمین شوری و آستانه تحمل گیاه باشد.

با افزایش غلظت سیترولین و لیزین در شوری ۸۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد و همبستگی نسبتاً خوب آن‌ها با پرولین این انتظار می‌رود که آن‌ها نیز بتوانند به عنوان شاخصی برای سطوح شوری بکار روند. اما با توجه به افزایش ۱.۵ برابری سیترولین و لیزین در غلظت ۸۰۰ میلی مولار نسبت به شاهد، این امکان وجود دارد که این دو متابولیت توانایی بالایی در تفکیک سطوح شوری و توجیه آستانه خطر گیاه را نداشته باشند، بنابراین، گزینه مناسبی برای شاخص شوری و سلامتی گیاه بشمار نمی‌روند.

در برخی از هالوفیت‌ها، تجمع ترکیبات آلی موجب حفظ تعادل اسمزی در شرایط تنش می‌شود (Di Martino *et al.*, 2003). بنابراین، این احتمال وجود دارد که علاوه بر اسید آمینه‌های آزاد، اسمولیت‌کننده‌های دیگری از جمله ترکیبات پلی آمینی نیز در حفظ فشار اسمزی گیاه موثر باشند (Bueno and Cordovilla., 2019, Koyro *et al.*, 2013). در مطالعه حاضر، کاهش گلوتامین در سطوح بالاتر شوری، این احتمال را می‌رساند که در شوری‌های بالا این اسید آمینه به عنوان یک دهنده نیتروژن باعث بیوستتر ترکیبات آلی از جمله پلی آمین‌ها شود. پلی آمین‌ها با تنظیم هموستازی یونی، پایداری غشاء بیولوژیکی، محافظت از بافت‌های فتوسنتزی و شرکت در فرآیندهای سیگنالینگ نقش مهمی را در سازگاری با تنش شوری در گیاهان هالوفیت ایفا می‌نمایند (Bueno and Cordovilla., 2019). Koyro و همکاران (۲۰۱۳) با مطالعه روی الگوی پروتئینی چند گیاه مختلف گزارش

- Redwan, M., Ponnaia H. M., *et al.* (2020). Metabolism regulation during salt exposure in the halophyte *Cakile maritima*. *Environmental and Experimental Botany*, 177, 104075.
- Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C. D., & Gómez-Cadenas, A. (2013). Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 4885-4911.

- Ashraf, M., & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, 166, 3-16.
- Bates, L. S., Waldren, R. Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39: 205-207.
- Bohnert, H. J., & Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol*, 14, 89-97.
- Bueno, M., & Cordovilla, M. P. (2019). Polyamines in Halophytes. *Front. Plant Sci*, 9(10), 439.
- Cheng, Y., Yang, P., Zhao, L., Priyadarshani, S., Zhou, Q., *et al.* (2019). Studies on genome size estimation, chromosome number, gametophyte development and plant morphology of salt-tolerant halophyte *Suaeda salsa*. *BMC Plant Biol*, 19(1), 473.
- Cuin, T. A., & Shabala, S. (2007). Amino acids regulate salinity-induced potassium efflux in barley root epidermis. *Planta*, 225(3), 753-761.
- Di Martino, C., Delfine, S., Pizzuto, R., Loreto, F., & Fuggi, A. (2003). Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. *New Phytologist*, 158(3), 455-463.
- Diray-Arce, J., Clement, M., Gul, B., Khan, M. A., & Nielsen, B. L. (2015). Transcriptome assembly, profiling and differential gene expression analysis of the halophyte *Suaeda fruticosa* provides insights into salt tolerance. *BMC Genomics*, 16(1), 353.
- El Moukhtari, A., Cabassa-Hourton, C., Farissi, M., & Savoré, A. (2020). How Does Proline Treatment Promote Salt Stress Tolerance During Crop Plant Development. *Frontiers in Plant Science*, 23(11), 1127.
- El-Samad, H. M. A., Shadad, M. A. K., & Barak, N. (2011). Improvement of plants salt tolerance by exogenous application of amino acids. *Journal of Medicinal Plants*, 5, 5692-5699.
- Flowers, T. J., Galal, H. K., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, 37, 604-612.
- Fukusaki, E., & Kobayashi, A. (2005). Plant metabolomics: potential for practical operation. *J. Biosci Bioeng*, 100(4), 347-354.
- Guo, S. M., Tan, Y., Chu, H. J., Sun, M. X., & Xing J. C. (2019). Transcriptome sequencing revealed molecular mechanisms underlying tolerance of *Suaeda salsa* to saline stress. *PLOS ONE*, 14(7), e219979.
- Hartzendorf, T., & Rolletschek, H. (2001). Effects of NaCl-salinity on amino acid and carbohydrate contents of *Phragmites australis*. *Aquatic Botany*, 69, 195-208.
- Hong, J., Yang, L., Zhang, D., & Shi, J. (2016). Plant Metabolomics: An Indispensable System Biology Tool for Plant Science. *Int J Mol Sci*, 17(6), 767.
- Huang, Z., Zhao, L., Chen, D., Liang, M., Liu, Z., *et al.* (2013). Salt stress encourages proline accumulation by regulating proline biosynthesis and degradation in Jerusalem artichoke plantlets. *PLoS One*, 8(4), e62085.
- Khedr, A. H. A., Abbas, M. A., Wahid, A. A. A., Quick, W. P., & Abogadallah, G. M. (2003). Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany*, 54(392), 2553-2562.
- Kord, H., Fakheri, B., Ghabooli, M., Solouki, M., Emamjomeh, A., Khatabi, B., Sepehri, M., Salekdeh, G. H., & Ghaffari, M. R. (2019). Salinity-associated microRNAs and their potential roles in mediating salt tolerance in rice colonized by the endophytic root fungus *Piriformospora indica*. *Funct Integr Genomics*, 19(4), 659-672.
- Koyro, H. W., Zörb, C., Debez, A., & Huchzermeyer, B. (2013). The effect of hyper-osmotic salinity on protein pattern and enzyme activities of halophytes. *Functional Plant Biology*, 40(9), 787-804.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, 228(3), 367-381.
- Li, Q., & Song, J. (2019). Analysis of widely targeted metabolites of the euhalophyte *Suaeda salsa* under saline conditions provides new insights into salt tolerance and nutritional value in halophytic species. *BMC plant biology*, 19, 388-388.
- Lu, X., Liu, J., Liu, Y., Zhang, Z., & Tang, Z. (2022). *Suaeda glauca* and *Suaeda salsa* Employ Different Adaptive Strategies to Cope with Saline-Alkali Environments. *Agronomy*, 12(10), 2496.
- Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J. I., *et al.* (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction. *Plant J*, 31(6), 699-712.
- Mansour, M. M. F. (1998). Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36, 767-772.

- Meng, X., Zhou, J., & Sui, N. (2018). Mechanisms of salt tolerance in halophytes: Current understanding and recent advances. *Open Life Sciences*, 13, 149-154.
- Nasir, F. A., Batarseh, M., Abdel-Ghani, A. H., & Jiries, A. (2010). Free Amino Acids Content in Some Halophytes under Salinity Stress in Arid Environment, Jordan. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 38, 592-600.
- Nerd, A., & Pasternak, D. (1992). Growth, ion accumulation, and nitrogen fractioning in *Atriplex barclayana* grown at various salinities. *Society for Range Management*, pp. 164-166.
- Obata, T., & Fernie, A. R. (2012). The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses. *Cell Mol Life Sci*, 69(19), 3225-3243.
- Panta, S., Flowers, T., Lane, P., Doyle, R., Haros, G., & Shabala, S. (2014). Halophyte agriculture: success stories. *Exp. Bot*, 107, 71-83.
- Parida, A. K., Veerabathini, S. K., Kumari, A., & Agarwal, P. K. (2016). Physiological, Anatomical and Metabolic Implications of Salt Tolerance in the Halophyte *Salvadora persica* under Hydroponic Culture Condition. *Front. Plant Sci*, 22(7), 351.
- Ramanjulu, S., & Sudhakar, C. (2000). Proline metabolism during dehydration in two mulberry genotypes with contrasting drought tolerance. *Plant Physiology*, 157, 81-85.
- Ray, S., Dansana, P. K., Giri, J., Deveshwar, P., Arora, R., et al. (2011). Modulation of transcription factor and metabolic pathway genes in response to water-deficit stress in rice. *Funct Integr Genomics*, 11(1), 157-178.
- Shahid, S., Kausar, A., Zahra, N., et al. (2023). Methionine-Induced Regulation of Secondary Metabolites and Antioxidants in Maize (*Zea mays* L.) Subjected to Salinity Stress. *Gesunde Pflanzen*, 75, 1143-1155.
- Shulaev, V., Cortes, D., Miller, G., & Mittler, R. (2008). Metabolomics for plant stress response. *Physiol Plant*, 132(2), 199-208.
- Song, J., & Wang, B. (2015). Using euhalophytes to understand salt tolerance and to develop saline agriculture: *Suaeda salsa* as a promising model. *Ann Bot*, 115(3), 541-553.
- Thomas, J. C., De Armond, R. L., & Bohnert, H. J. (1992). Influence of NaCl on Growth, Proline, and Phosphoenolpyruvate Carboxylase Levels in *Mesembryanthemum crystallinum* Suspension Cultures. *Plant Physiology*, 98(2), 626-631.
- Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M. Á., Estrelles, E., Bellés, J. M. A., et al. (2004). Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of Arid Environments*, 58, 463-481.
- Xie, E., Wei, X., Ding, A., Zheng, L., Wu, X., et al. (2020). Short-Term Effects of Salt Stress on the Amino Acids of *Phragmites australis* Root Exudates in Constructed Wetlands. *Water*, 12, 569.
- Xu, Y., Zhao, Y., Duan, H., Sui, N., Yuan, F., et al. (2017). Transcriptomic profiling of genes in matured dimorphic seeds of euhalophyte *Suaeda salsa*. *BMC Genomics*, 18, 727.
- Yang, Z., Xie, T., & Liu Q. (2014). Physiological responses of *Phragmites australis* to the combined effects of water and salinity stress. *Ecophysiology*, 7, 420-426.
- Yazdanpanah, P., Jonoubi, P., Zeinalabedini, M., Rajaei, H., Ghaffari, M. R., Vazifeshenas, M. R., & Abdirad, S. (2021). Seasonal Metabolic Investigation in Pomegranate (*Punica granatum* L.) Highlights the Role of Amino Acids in Genotype- and Organ-Specific Adaptive Responses to Freezing Stress. *Front Plant Sci*, 12(12), 699139.
- Narita, Y., Taguchi, H., Nakamura, T., Ueda, A., Shi, W., & Takabe, T. (2004). Characterization of the salt-inducible methionine synthase from barley leaves. *Plant Science*, 167, 1009-1016.
- Zhang, X., Yao, Y., Li, X., Zhang, L., & Fan, S. (2020). Transcriptomic analysis identifies novel genes and pathways for salt stress responses in *Suaeda salsa* leaves. *Sci Rep*, 10(1), 4236.
- Zhao, L., Yang, Z., Guo, Q., Mao, S., Li, S., et al. (2017). Transcriptomic Profiling and Physiological Responses of Halophyte *Kochia sieversiana* Provide Insights into Salt Tolerance. *Front. Plant Sci*, 24(8), 1985.
- Zhao, Y., Ma, Y., Li, Q., Yang, Y., Guo, J., et al. (2018). Utilisation of stored lipids during germination in dimorphic seeds of euhalophyte *Suaeda salsa*. *Functional Plant Biology*, 45(10), 1009-1016.
- Zhao, Y. Q., Ma, Y. C., Duan, H. M., Liu, R. R., & Song, J. (2019). Traits of fatty acid accumulation in dimorphic seeds of the euhalophyte *Suaeda salsa* in saline conditions. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 153, 514-520.