

**EFFECT OF SALT STRESS ON *MEDICAGO SATIVA* AND
MEDICAGO TRUNCATULA GENOTYPES**

**EFFECT OF SALT STRESS ON *MEDICAGO SATIVA* AND
MEDICAGO TRUNCATULA GENOTYPES**

ELENA PETCU¹, MARIA SCHITEA¹, MILONA PHOTINI²

Abstract

In this paper are presented the effect of salinity on three alfalfa genotypes provided by the Laboratory of Alfalfa Breeding, National Agricultural Research and Development Institute Fundulea, Romania and one population by *Medicago truncatula* provided by the Laboratory of Genetic Resources, National Agricultural Research Foundation from Thessaloniki, Greece.

The experiment was conducted in vegetation house conditions with control plants growth in plastic pots containing chernozem cambic soil. Additionally, the same genotypes were grown under same conditions until 2.5 month age, when different salt concentrations (75, 150 and 300 mM NaCl/l) were applied. After two weeks of salt treatment, the plants were harvested, and root length and proline content were analyzed. A significant increase of root length, biomass and proline content was registered in *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* under saline stress. The salinity caused a reduction on shoot fresh biomass at all NaCl concentrations. The proportion of fresh weight allocated by plants roots increased with increasing NaCl levels, as shown by the responses of root/shoot ratio.

Key words: *Medicago* varieties, saline stress, root length, biomass, proline content.

INTRODUCERE

Salinitatea solului este unul din principalii factori de stres care reduce productivitatea plantelor agricole în multe regiuni ale globului (Boyer, 1982). Astfel, sunt zonele aride sau de deșert (care reprezintă 25% din suprafața terestră a planetei) și unele terenuri irigate (se estimează că o treime din acestea sunt în prezent afectate de salinitate). În țara noastră se înregistrează o serie de factori naturali restrictivi, care, în ultima perioadă, ca urmare a schimbărilor climatice globale, se reflectă în mod normal: secetă excesivă frecventă care se manifestă pe 7.100.000 ha, exces periodic de umiditate, în condițiile anului 2005 pe 3.781.000 ha, soluri saline - 700.776.000 ha, rezervă mică și extrem de mică de

¹ I.N.C.D.A. Fundulea, județul Călărași, România, e-mail: petcue@ricic.ro)

² National Agricultural Research Foundation, Thessaloniki, Greece.

substanță organică, pe 4.800.000 ha, aciditate puternică, pe cca 2.000.000 ha, cu asigurare slabă cu elemente nutritive (H e r a, 2008).

Lucerna este o plantă sensibilă la salinitate, astfel că producerea de genotipuri tolerante la salinitate ar trebui să fie o provocare pentru orice ameliorator. Aceasta cu atât mai mult cu cât eforturile făcute în vederea îmbunătățirii performanțelor în condiții de stres salin nu au fost suficient valorificate. Unul din principalele motive este acela că mecanismele fundamentale ale toleranței la acest stres nu sunt complet elucidate. Evidențierea mecanismelor de rezistență/toleranță la salinitate prezintă importanță, atât în cazul plantelor ameliorate, cât și a celor sălbatice, care cel mai adesea oferă o amplitudine mai mare a toleranței la acest tip de stres.

În această lucrare se prezintă răspunsul plantelor de *Medicago truncatula* și *Medicago sativa* la stresul salin la nivel de plantă întreagă (efectul asupra procesului de creștere) și la nivel celular (evidențierea sintezei unor substanțe osmotice active).

MATERIALUL ȘI METODA DE CERCETARE

Au fost luate în studiu trei genotipuri românești de *Medicago sativa* (Granat, Magnat și linia L 72071) și o populație din Grecia de *Medicago truncatula* (A 17). Dintre cele trei genotipuri românești de lucernă studiate, linia L 72071, obținută prin embriogeneză somatică, a fost selectată pentru rezistență la salinitate.

Semănatul s-a realizat în ghivece PVC (8 cm diametru/7 cm înălțime) în amestec de sol : nisip (3 : 1), iar plantele au fost menținute în casa de vegetație în condiții optime de umiditate timp de 2,5 luni, după care s-au constituit următoarele variante experimentale:

➤ *martor*: plantele au fost menținute în condiții optime pe tot parcursul experienței;

➤ *tratamente*: plantele au fost tratate cu trei concentrații diferite de clorură de sodiu: 75 mM NaCl/l (T_1), 150 mM NaCl/l (T_2) și 300 mM NaCl/l (T_3), (trei repetiții pentru fiecare concentrație de sare și genotip).

După două săptămâni de la aplicarea stresului salin s-a determinat lungimea rădăcinii principale și acumularea de biomasă prin măsurători biometrice concomitent cu analiza conținutului în prolină după metoda propusă de B a t e s și colaboratorii (1973). Datele au fost analizate statistic pe baza analizei varianței.

REZULTATE EXPERIMENTALE

Rezultatele obținute au evidențiat efectul pozitiv al stresului salin asupra creșterii rădăcinii principale, concomitent cu creșterea concentrației de sare. La *Medicago sativa*, L 72071, la tratamentul cu 300 mM NaCl/l, diferențele față de martor au fost foarte semnificative (259% față de martor), în timp ce la *Medicago truncatula* – A 17 diferența a fost nesemnificativă (113,3% din martor), atât la tratamentul cu 300 mM NaCl/l, cât și la cel cu 150 mM NaCl/l. Celelalte două genotipuri de lucernă luate în studiu au avut următorul comportament: genotipul Magnat a reacționat puternic chiar la concentrații mici de sare, în timp

ce genotipul Granat a fost relativ puțin afectat atât de concentrațiile reduse de sare, cât și de cele severe (tabelul 1).

Analiza varianței evidențiază efectul foarte semnificativ al tratamentului, genotipului și al interacțiunii acestora asupra lungimii rădăcinii (tabelul 2).

Acumularea de biomasă aeriană a fost influențată negativ de tratamentele cu doze mari de clorură de sodiu. Tratamentul cu doze reduse de clorură de sodiu (75 mmol NaCl/l) a avut un efect nesemnificativ asupra biomasei aeriene, comparativ cu concentrația de 300 mmol NaCl/l care a redus biomasa aeriană cu 50% (Granat) sau chiar cu 67% (Magnat). Biomasa radiculară a fost mai puțin afectată de tratamentele efectuate. Ca și în cazul determinărilor privind creșterea în lungime a rădăcinii principale, acumularea de biomasă radiculară nu a fost influențată negativ de stresul salin, excepție Linia L 72071 la tratamentul cu doză redusă de sare (figurile 1 și 2).

Tabelul 1

Efectul stresului salin asupra creșterii în lungime a rădăcinii la genotipurile de lucernă studiate
(The effect of saline stress on length of root of the studied alfalfa genotypes)

Genotip	Variante	Lungime rădăcină	
		(mm)	(% din martor)
Granat	Martor	175	100
	T ₁ (75 mM NaCl/l)	180	102,9
	T ₂ (150 mM NaCl/l)	218	124,5
	T ₃ (300 mM NaCl/l)	228	130,3
Magnat	Martor	133	100
	T ₁ (75 mM NaCl/l)	201	151
	T ₂ (150 mM NaCl/l)	327	245,8
	T ₃ (300 mM NaCl/l)	364**	273,7
L 72071	Martor	277	100
	T ₁ (75 mM NaCl/l)	285	102,9
	T ₂ (150 mM NaCl/l)	295	106,5
	T ₃ (300 mM NaCl/l)	720***	259,9
A 17	Martor	220	100
	T ₁ (75 mM NaCl/l)	220	100
	T ₂ (150 mM NaCl/l)	250	113,6
	T ₃ (300 mM NaCl/l)	250	113,6

Media generală = 270,8

DL 5% = 27,69

Tabelul 2

Analiza varianței pentru lungimea rădăcinii
(Analysis of variance for the root length)

Sursa varianței	GL	Suma pătratelor	Media pătratică	Valorile factorului F
Tratament (A)	3	258438,6	86146,2	73,415***
Eroare A	6	7040,42	1173,4	
Genotip (B)	3	263330,3	87776,75	80,942***
Interacțiune	9	280953,1	31217,01	28,786***
Eroare B	24	26026,38	1084,43	

*** semnificativ pentru probabilitatea de 0,001.

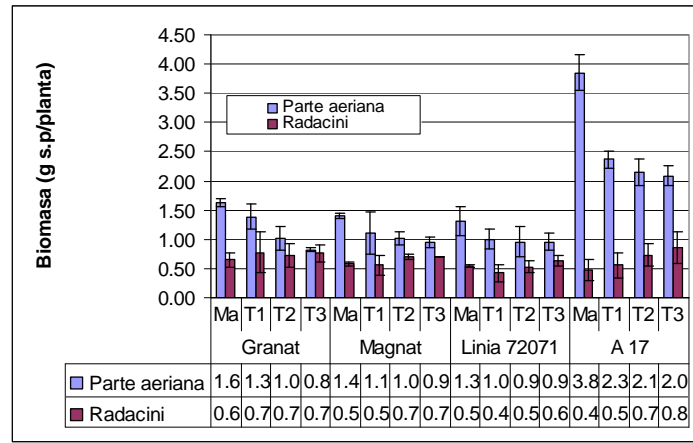


Fig. 1 – Efectul diferitelor concentrații de sare asupra acumulării de biomasă la genotipurile studiate
(The effect of different salt concentrations on biomass of studied genotypes)

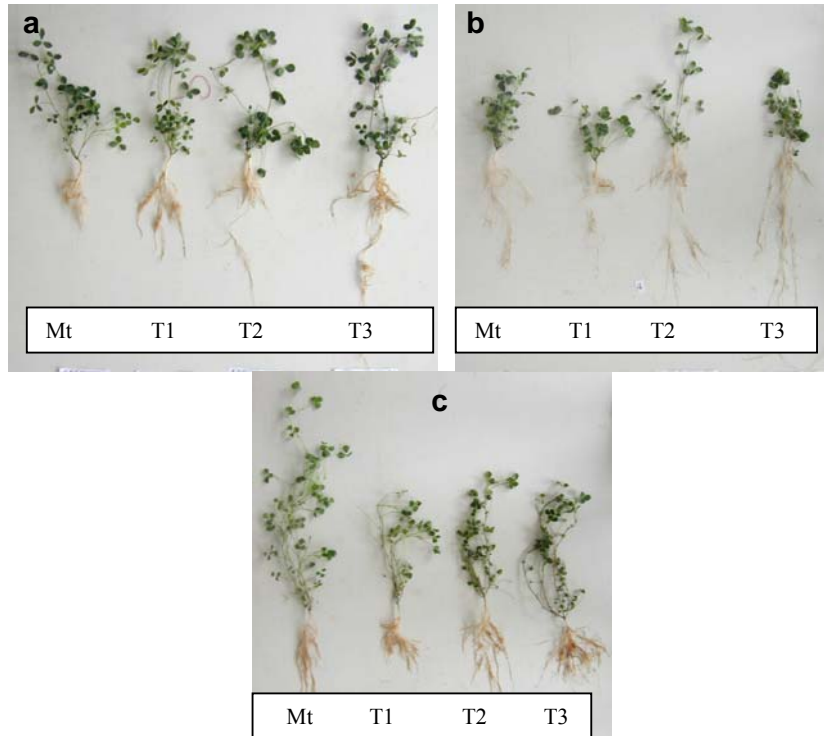


Fig. 2 – Efectul diferitelor concentrații de sare asupra genotipului de lucernă Magnat (a), linia 72071 (b) și *Medicago truncatula* A 17 (c)
(The effect of different salt treatment on Magnat (*Medicago sativa*) (a), L 72071 (b) and A 17 (*Medicago truncatula*) (c))

Studii efectuate la bumbac (Meloni și colab., 2001), sorg (Bernstein și colab., 1995), dar și la lucernă (Kant și colab., 1994) au arătat, de asemenea, efectul mai sever al clorurii de sodiu (NaCl) asupra creșterii tulpinii comparativ cu efectul asupra creșterii rădăcinii.

Proporția de substanță proaspătă alocată creșterii rădăcinilor a fost în relație directă cu mărirea dozei de NaCl, după cum se evidențiază din raportul rădăcină/tulpină (tabelul 3). La concentrațiile mici de sare (T_1), efectul este nesemnificativ, dar odată cu creșterea concentrației de sare acesta devine foarte semnificativ sau semnificativ, în funcție de toleranța genotipului studiat. La linia de lucernă L 72071, linie cu toleranță la salinitate, creșterea acestui raport odată cu creșterea salinității a fost mai redusă comparativ cu celelalte genotipuri de *Medicago sativa*.

Tabelul 3

Efectul stresului salin asupra raportului rădăcină/tulpină la genotipurile studiate
(The effect of saline stress on root/shoot ratio for studied genotypes)

Genotip	Martor	Tratament		
		75 mmol. NaCl/l	150 mmol. NaCl/l	300 mmol. NaCl/l
Granat	0,40	0,55	0,70***	0,92***
Magnat	0,41	0,50	0,68**	0,73***
L 72071/7	0,41	0,42	0,55	0,65**
A 17	0,12	0,23	0,33	0,41

Media generală = 0,5

DL 5% = 0,04

** , *** = semnificativ pentru probabilitatea de 0,01, respectiv 0,001

Creșterea raportului rădăcină/tulpină este o adaptare la salinitate, deoarece determină o absorbție a apei și nutrienților mai eficientă în condiții de stres salin (Gorham și colab., 1985). De altfel, trebuie subliniat că salinitatea are un efect dublu asupra creșterii plantelor prin efectul stresului hidric (datorită concentrației mari de săruri din soluția solului, salinitatea inhibă accesul plantelor la apa din sol prin creșterea presiunii osmotice a solului) și prin toxicitatea ionilor specifici (creșterea concentrației ionilor de Na^+ și Cl^- , dăunători pentru plante).

Soluția solurilor saline poate avea un potențial de -24 bar și chiar mai mare. Plantele, în aceste condiții dezvoltă o paletă largă de gradient de potențial de la rădăcină la frunză și nu mai pot face față necesarului fiziologic de transpirație, afectează sinteza proteinelor, fenomen evidențiat de inhibarea încorporării aminoacizilor în proteine (Blum, 1988), ceea ce duce în final la ofilirea plantei.

Această inhibiție este marcată de o creștere a concentrației aminoacizilor liberi, în special prolină, fenomen evidențiat și prin rezultatele obținute de noi. Astfel, în condiții optime conținutul în prolină a fost relativ redus la toate genotipurile studiate (1,7-5,4 μM prolină/g s.p.), dar foarte ridicat la tratamentele cu concentrația maximă de sare (156-441 μM prolină/g s.p.) (tabelul 4).

Tabelul 4

**Efectul stresului salin asupra conținutului de prolină (μM prolină/g s.p.)
la genotipurile studiate**
(The effect of saline stress on proline content of studied genotypes)

Genotip	Martor	Tratament		
		75 mmol. NaCl/l	150 mmol. NaCl/l	300 mmol. NaCl/l
Granat	3,26	155,69	220,68	268,32
Magnat	3,27	152,32	231,2	441,76
L 72071	5,40	182,56	197,12	201,6
A 17	1,7	67,2	131,04	156,36

Substanțele osmotice active (prolina și glicinbetaina, de exemplu), se consideră că stabilizează proteinele și structurile celulare și pot crește presiunea osmotică a celulei (Ye o, 1998). Acest răspuns este homeostatic pentru apa din celule și integritatea proteinelor, care sunt perturbate în cazul în care soluția solului conține cantități mari de NaCl, ceea ce duce la pierderea apei din celule prin procesul de plasmoliză.

Sunt rezultate care arată corelația dintre nivelul de rezistență la sare și nivelul aminoacizilor. Astfel, Ahmad și colaboratorii (1981) au evaluat câteva ecotipuri de *Agrostis stolonifera* (iarba-câmpului), în funcție de răspunsul acestora la salinitate. Astfel, la ecotipurile rezistente, absorbția și cantitatea de apă la nivelul părții aeriene au fost superioare. Plantele rezistente au acumulat mai puțin Na^+ și Cl^- și mai multă prolină și alți aminoacizi, concluzionând că rezistența la salinitate este condiționată de acumularea în celule de substanțe care să permită menținerea unui potențial ridicat al apei. Rezultatele obținute de noi evidențiază o corelație semnificativ negativă ($r = -0,56^*$) între biomasa aeriană și conținutul în prolină (figura 3).

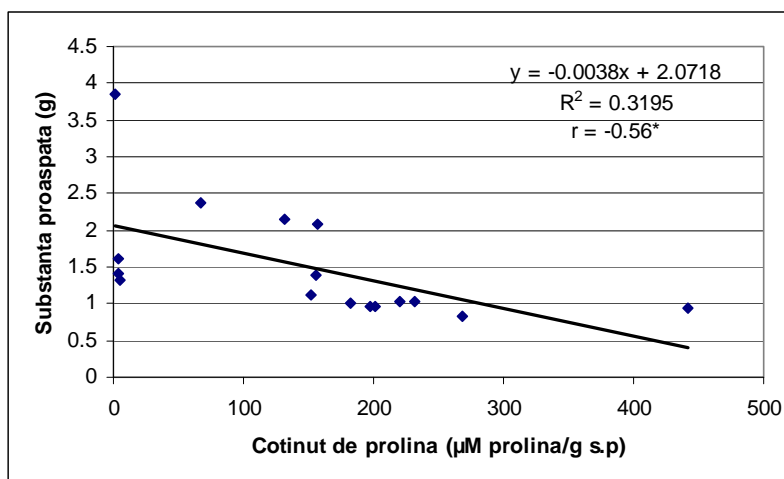


Fig. 3 – Relația dintre biomasa și conținutul în prolină al genotipurilor de *Medicago* studiate
(Relationship between biomass and proline content of studied *Medicago* genotypes)

Există studii recente (Rontein și colab., 2002), care arată că există o limitare metabolică privind nivelurile de osmoprotectori care se pot realiza și că gradul în care plantele sunt capabile să tolereze stresul salin nu este neapărat corelat cu cantitatea de osmoprotectori atinsă.

CONCLUZII

□ La nivel de plantă întregă răspunsul speciilor de *Medicago sativa* și *Medicago truncatula* la stresul salin a constat în reducerea acumulării de biomasă aeriană concomitent cu dezvoltarea mai puternică a rădăcinii, respectiv creșterea raportului rădăcină/tulpină.

□ La nivel celular, a fost evidentă acumularea de prolină ca răspuns la acțiunea stresului salin. Rezultatele obținute relevă că nivelul prolinei nu este în concordanță cu gradul de toleranță la salinitate, deoarece din genotipurile studiate nu cel mai tolerant a avut conținutul maxim de prolină. Aceasta sugerează că sinteza prolinei este necesară, dar nu suficientă pentru toleranța la salinitate.

Lucrarea a fost realizată în cadrul proiectului bilateral de colaborare cu Grecia (NAGREF – Salonic) „Modalități de îmbunătățire a agriculturii durabile prin creșterea rezistenței leguminoaselor la salinitate”, care a avut ca scop studierea mecanismelor de reglare moleculară în timpul creșterii, dezvoltării și fixării azotului atmosferic în condiții normale și de salinitate, la specia model *Medicago truncatula* și genotipuri românești de *Medicago sativa* tolerante la sare.

REFERINȚE BIBLIOGRAFICE

- AHMAD, I., WAINWRIGHT, S.J., STEWART, G.R., 1981 – *The solute and water relations of Agrostis stolonifera ecotypes differing in their salt tolerance*. New Phytol., 87: 615.
- BATES, L. S., WALDREN, R.P., TEARE, I.D., 1973 – *Rapid determination of free proline for water-stress studies*. Plant Soil, 39: 205-207.
- BERNSTEIN, N., SILK, W.K., LÄUCHLI, A., 1995 – *Growth and development of sorghum leaves under conditions of NaCl stress: possible role of some mineral elements in growth inhibition*. Planta, 196: 699-705.
- BLUM, A., 1988 – *Plant breeding for stress environment*. CRC Press Inc., 8.
- BOYER, J.S., 1982 – *Plant productivity and environment*. Science, 218: 443-448
- GORHAM, J., WYN JONES, R.G., MCDONELL, E., 1985 – *Some mechanisms of salt tolerance in crop plants*. Plant Soil, 89: 15-40.
- HERA, C., 2008 - *Solul – garanție a dezvoltării durabile și siguranței alimentare*. Sursa internet: www.acad.ro
- KANT, M.G., SILVERBUSCH, M., LIPS, S.H., 1994 – *Physiological studies on salinity and nitrogen interaction in alfalfa. I. Biomass production and root development*. J. Plant Nutr., 17: 657-668.
- MELONI, D.A., OLIVA, M.A., RUIZ, H.A., MARTINEZ, C.A., 2001 – *Contribution of proline and inorganic solutes to osmotic adjustment in cotton under salt stress*. J. Plant Nutr., 24: 599-612.
- MUNNS, R., 2002 – *Comparative physiology of salt and water stress*. Plant Cell Environ., 25: 239-250.
- RONTEIN, D., BASSET, G., HANSON, A.D., 2002 – *Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants*. Metabolic Eng., 4: 49-56.
- YEO, A., 1998 – *Molecular biology of salt tolerance in the context of whole - plant physiology*. J. Exp. Bot., 49: 915-929.

Prezentată Comitetului de redacție la 19 decembrie 2008