

[*Medicago laciniata* (L.) Mill]

The role of some metabolites on the osmotic adjustment mechanism in annual cutleaf medic [*Medicago laciniata* (L.) Mill] under drought stress

مجید قربانی جاوید^۱، فواد مرادی^۲، غلامعباس اکبری^۳، ایرج الله دادی^۴

نقش برخی متابولیت‌ها در ساز و کار تنظیم اسمزی در یونجه یکساله برگ بریده

[*Medicago laciniata* (L.) Mill] در تنش خشکی*. مجله علوم زراعی ایران. جلد هشتم، شماره ۲، صفحه: ۹۰ تا ۱۰۵.

[*Medicago laciniata* (L.) Mill]

/ /

(/ =)

(RWC)

(ψ_s)

()

:

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۲/۱۰

* این مقاله بخشی از تحقیق پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول در گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران است.

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد زراعت، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران (مکاتبه کننده).

۲- استادیار پژوهش، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی .

۳ و ۴- استادیار، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران.

در گیاهان است (Bajji *et al.*, 2001) که به واسطه کاهش پتانسیل اسمزی از طریق تجمع املاح در سلول‌های گیاه حاصل شده و با حفظ فشار آماس سلول‌ها به توسعه سلولی و رشد گیاه در شرایط تنش کمک می‌کند (Rascio *et al.*, 1994). تنش خشکی منجر به کاهش محتوای نسبی آب (RWC)، پتانسیل آب کل (ψ_w) و کاهش رشد گیاهان می‌شود (Bajji *et al.*, 2001)، اما وجود سازوکار تنظیم اسمزی در گیاهان متحمل به خشکی باعث حفظ و بالا نگه داشتن RWC در گیاه می‌گردد (Teulat *et al.*, 1997). در آزمایشی اثرات تنش خشکی بر رشد و میزان محتوای نسبی آب یونجه بررسی و نتایج به دست آمده نشان داد که RWC و پتانسیل آب برگ‌ها به طور معنی‌داری پس از یک دوره ۵-۳ روزه خشکی کاهش یافتند (Schubert *et al.*, 1995). خان و همکاران (Khan *et al.*, 1998) اعلام کردند که یونجه در شرایط تنش خشکی به منظور حفظ وضعیت آبی خود با انباشت متابولیت‌ها و برخی از یون‌ها اقدام به تنظیم اسمزی می‌کند. تجمع پرولین، قندهای محلول و سایر متابولیت‌ها به منظور تنظیم اسمزی در گیاهان مختلف گزارش شده است (Bittman and Simpson, 1989; Martin *et al.*, 1997; Turner and Jones, 1980). مشخص شده است که کاهش تورژسانس عامل اولیه تجمع پرولین در تنش‌های شوری و خشکی است. کاهش تورژسانس باعث فعال شدن یک توالی پیچیده از فرآیندهای تطابقی مرتبط با سطح تحمل گیاه به تنش می‌شود (سی و سه مرده، ۱۳۷۷). پرولین علاوه بر شرکت در تنظیم اسمزی، نقش‌های مهمی مانند حفاظت از سیستم‌های غشایی سلول (Tsugane *et al.*, 1999)، سمیت زدایی (Puritch and Barker, 1967) و تنظیم اسیدیته سیتوزول را نیز برعهده دارد (Hare *et al.*, 1998). در دوره تنش، گیاه به منظور گریز از پلاسمولیز و ادامه تورژسانس در سلول‌های خود، مولکول‌های درشت نظیر نشاسته را به ساکارز و سپس مولکول‌های کوچکتری

یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده رشد، نمو و پراکنش گیاهان در بیوسفر تنش خشکی است (Sanchez *et al.*, 1998). با این حال در طبیعت گیاهانی وجود دارند که توانسته‌اند در شرایط خشکی نیز به حیات و رشد خود ادامه دهند. یونجه‌های یکساله از جمله گیاهانی هستند که از نظر نیاز رطوبتی بسیار کم توقع بوده و در بسیاری از نقاطی که دارای بارندگی سالیانه کمتر از ۲۵۰ میلی‌متر در سال هستند رشد می‌کنند (حیدری شریف آباد و همکاران، ۱۳۷۹). همچنین گزارش شده است که برخی از گونه‌های یونجه‌های یکساله در برابر تنش خشکی متحمل‌تر هستند (Moynihan *et al.*, 1996).

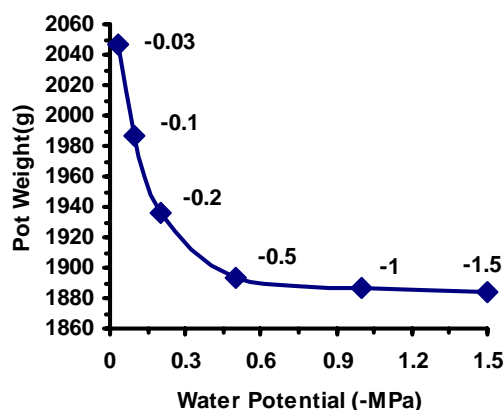
یونجه برگ بریده (Cutleaf medic) با نام علمی [*Medicago laciniata* (L.) Mill] یکی از گونه‌های یونجه یکساله است که منطقه پراکنش و زیستگاه آن در ایران در استان‌هایی مانند لرستان، خوزستان، بوشهر، هرمزگان، سیستان و بلوچستان است (سندگل و ملک‌پور، ۱۳۷۳) و به طور خودرو در کشتزارها و مراتع و مکان‌های لم یزرع و نقاط سنگلاخی رشد می‌کند و از این رو بررسی و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در این گونه اهمیت دارد (حیدری شریف آباد و همکاران، ۱۳۷۹). گونه *Medicago laciniata* مرتعی بوده و طول دوره رویش آن حدوداً ۱۰۰-۱۱۰ روز است و با اولین بارش‌های موثر پاییز و زمستان به کندی رشد کرده و در حدود ۶۰ تا ۷۰ روز بعد استقرار می‌یابد. این تاریخ همزمان با کاهش باران در ماه‌های آتی است. لذا به طور طبیعی ژنوتیپ متحمل با این شرایط سازگار شده است، در حالیکه ژنوتیپ حساس نیاز به باران بیشتر داشته و در مناطق پرباران و مرطوب‌تر پراکنش یافته است.

تنش خشکی به نوعی کاهش پتانسیل آب خاک بوده و در چنین شرایطی گیاه به منظور حفظ و ادامه جذب آب می‌تواند به تنظیم اسمزی اقدام کند. تنظیم اسمزی یکی از مهم‌ترین مکانیزم‌های تحمل به خشکی

مانند گلوکز و فروکتوز تبدیل می کند که این موضوع موجب منفی تر شدن پتانسیل آب در سلول ها و تنظیم اسمزی می شود (Irigoyen et al., 1992). علاوه بر آن، کاهش مصرف قند نیز عامل دیگری برای افزایش غلظت قندهای محلول در سلول می تواند باشد (Irigoyen et al., 1992). افزایش غلظت یون ها نیز عموماً پدیده ای است که در شرایط تنش خشکی اتفاق می افتد (Iannucci et al., 2002). گزارش ها حاکی از آن است که پتاسیم نقش اساسی در تنظیم اسمزی گیاهان دارد (Kameli and Lösel, 1995; Khanna et al., 1995) و ممکن است تغییرات آن با تغییرات قندها و سایر اسیدهای آمینه نیز همراه باشد (Jones et al., 1980). بررسی های سال های اخیر نشان داده است که یون کلسیم نیز در کنترل بازده مصرف آب از طریق بستن روزنه ها در شرایط تنش خشکی نقش داشته است (Atkinson, 1991). نظر به اهمیت کم آبی در کشور و اهمیت شناخت یونجه های یکساله متحمل به خشکی، این تحقیق به منظور بررسی سازوکار تنظیم اسمزی و روابط آبی گیاه و میزان تجمع املاح آلی و معدنی در شرایط تنش خشکی در دو ژنوتیپ یونجه یکساله از گونه [*Medicago laciniata* (L.) Mill] بومی ایران انجام گرفت.

این تحقیق در سال ۸۳-۱۳۸۲ در پژوهشکده تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی-کرج در شرایط گلخانه ای انجام شد. ساز و کار تنظیم اسمزی، روابط آبی و میزان تجمع پرولین و قندهای محلول و برخی یون ها در دو ژنوتیپ حساس (نمونه استان لرستان- خرم آباد) و متحمل (نمونه استان بوشهر- برازجان) به خشکی یونجه یکساله از گونه [*Medicago laciniata* (L.) Mill] (انتخاب شده از آزمایش های مقدماتی، مرادی، ۱۳۸۲) در چهار سطح مختلف تنش خشکی خاک (پتانسیل آب خاک) شامل

۰/۳-، ۰/۱-، ۰/۲- و ۱- مگا پاسکال (به ترتیب سطح طبیعی، تنش کم، متوسط و شدید) در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار (هر تکرار شامل ۵ زیر نمونه، مجموعاً ۱۲۰ گلدان) مورد مقایسه قرار گرفتند. در این بررسی پس از خارج کردن بذرها از داخل غلاف، برای شکسته شدن خواب بذر از تیمار فیزیکی سمباده نرم استفاده گردید و سپس بذرها ضد عفونی شدند. ۴ بذر در هر گلدان پلی اتیلنی متوسط (به ارتفاع ۱۵ سانتی متر و قطر دهانه ۱۵ سانتی متر) حاوی ۱۷۰۰ گرم خاک خشک با بافت لوم شنی با وزن ظاهری ۱/۴۶ گرم بر سانتی متر مکعب کشت شد. در تمام دوره مطالعه دمای گلخانه به مقدار ۱۸/۲۵ (روز/شب) درجه سانتیگراد حفظ گردید. میزان رطوبت محیط گلخانه $10 \pm 60\%$ درصد بود. شدت روشنایی به میکرو اینشتین بر مترمربع بر ثانیه و دوره روشنایی به صورت ۱۰ ساعت روشنایی و ۱۴ ساعت تاریکی تنظیم شد. قبل از اعمال تیمار، آبیاری گلدان ها هر دو روز یکبار با استفاده از آب مقطر انجام شد. برای تأمین نیاز غذایی گیاهان هفته ای یکبار از محلول هوگلند استفاده شد (Hogland and Arnon, 1950). بر اساس نتایج مطالعات مقدماتی (مرادی، ۱۳۸۲)، در زمان استقرار کامل بوته ها و حداکثر رشد رویشی (۶۰ روز پس از زمان کاشت)، گلدان ها به صورت کاملاً تصادفی انتخاب، گروه بندی و سپس تیمارها بر روی آن ها اعمال گردید. برای تنظیم تیمارهای خشکی و ایجاد پتانسیل های رطوبتی در خاک گلدان ها از روش وزنی استفاده شد. بدین منظور منحنی درصد رطوبتی خاک مورد آزمایش با استفاده از دستگاه صفحه فشاری (Pressure Plate) به دست آمد (شکل ۱). تمامی گلدان ها از زمان قطع آبیاری، هر روز دوبار با استفاده از ترازوی دقیق (دقت ± 5 گرم) توزین شدند و به دلیل استفاده از منحنی درصد رطوبتی خاک (PF) برای تنظیم رطوبت خاک گلدان ها و کنترل عملی تر میزان رطوبت خاک (شکل ۱)، دو روز پس از اینکه پتانسیل آب خاک به هر یک از سطوح



شکل ۱- منحنی میزان رطوبتی خاک (PF) برای محاسبه پتانسیل آب خاک گلدان‌ها

Fig. 1. Curve of soil moisture (PF) for measurement of soil water potential in pots

اندازه‌گیری گردید. RWC از رابطه زیر به دست آمد (Ritchie *et al.*, 1990)

$$\%RWC = [(W_f - W_d) / (W_t - W_d)] \times 100$$

که در آن W_f وزن تازه برگ، W_t وزن آماس برگ و W_d وزن خشک برگ است.

(ψ_s) : برای اندازه‌گیری

پتانسیل اسمزی در همان زمان از دستگاه اسمومتر، (Wescor- 5520 USA) استفاده شد. برگ کامل دوم هر بوته از انتهای گیاه برای اندازه‌گیری این شاخص استفاده گردید. به منظور عصاره‌گیری از نمونه‌ها، از دستگاه پرس برگ مدل (LP-27 Markhart (USA) استفاده و عصاره به دست آمده بر روی دیسک‌های کاغذی استاندارد دستگاه اسمومتر قرار داده شد، تا دستگاه مقدار مول بر لیتر اسمولایت‌ها را مشخص کند. سپس با استفاده از فرمول وانت هوف (Martinez *et al.*, 2004)

$$\Psi_s = - M (\text{mmol kg}^{-1}) \times 2.58 \times 10^{-3}$$

مقدار پتانسیل اسمزی برگ محاسبه گردید. در این معادله M مولاریته محلول (قرائت شده از دستگاه) و Ψ_s پتانسیل اسمزی بر حسب مگاپاسکال است.

(Osmotic Adjustment): برای محاسبه مقدار تنظیم

اسمزی کل در گیاه از اختلاف پتانسیل اسمزی برگ‌های

-0.03 ، -0.1 ، -0.2 ، -0.5 ، -1 و -1.5 مگاپاسکال رسید، نمونه‌گیری از گیاهان انجام شد. به منظور خارج کردن اثر افزایشی وزن گیاه و کاهش خطا در تنظیم مقدار آب خاک به روش وزنی، از گلدان‌های فاقد گیاه که فقط حاوی خاک آزمایشی و هم وزن با گلدان‌های اصلی بودند، استفاده شد تا اختلاف وزنی گلدان‌های فاقد گیاه و حاوی گیاه، مقدار اثر وزن گیاه را از آزمایش خارج کند و مقدار تنظیم رطوبت خاک گلدان بر اساس روش وزنی باشد.

(Relative Water Content):

اندازه‌گیری RWC در ساعت هفت صبح در شرایطی که دمای گلخانه بین ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتیگراد بود، انجام شد. برای اندازه‌گیری این پارامتر از هر گلدان سه بوته انتخاب و از هر بوته برگ سوم (سه برگچه‌ای) انتهای گیاه استفاده شد. ابتدا وزن تر برگ‌ها فوراً اندازه‌گیری و به منظور تعیین وزن آماس به مدت ۴ ساعت برگ‌ها در شدت نور کم (۵-۲ میکرو مول فوتون بر مترمربع بر ثانیه، نور سفید) در داخل آب مقطر قرار داده شدند و پس از خشک کردن آب روی برگ‌ها، اندازه‌گیری وزن برگ‌ها در این شرایط، برگ‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آن ۷۰ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و پس از خشک شدن، وزن آن‌ها با استفاده از ترازوی دقیق ۰/۰۰۰۱ گرم (Kern 770, Germany)

گیاهان طبیعی و در تنش در شرایط آماس کامل استفاده شد. به این منظور برگ‌های دوم هر بوته، در شرایط تاریکی به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر با دمای ۴ درجه سانتیگراد، تا رسیدن به آماس کامل غوطه‌ور و سپس با استفاده از دستگاه اسمومتر مقدار پتانسیل اسمزی اندازه‌گیری شد. از اختلاف مقدار پتانسیل اسمزی برگ‌های واقع در تنش با برگ طبیعی مقدار تنظیم اسمزی کل طبق رابطه زیر به دست آمد (Zhang, 1999 ; Blum, 1989).

اطلاعات حاصل از این آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS(ver.6.12) و SPSS(ver.11) تجزیه شدند. از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید و سرانجام منحنی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel (Office-2003) رسم گردید.

$$OA_{tot} = \psi_{sc}^{100} - \psi_{ss}^{100}$$

در این معادله OA_{tot} مقدار تنظیم اسمزی کل، ψ_{sc}^{100} مقدار پتانسیل اسمزی گیاه طبیعی در ۱۰۰ درصد آماس، ψ_{ss}^{100} مقدار پتانسیل اسمزی گیاه واقع در تنش در ۱۰۰ درصد آماس است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با افزایش تنش خشکی، میزان نسبی آب برگ (RWC) در هر دو ژنوتیپ کاهش معنی‌داری یافت و میزان کاهش آن در ژنوتیپ حساس بسیار شدیدتر بود (جدول ۱)، به طوری که RWC در سطوح تنش ۰/۳، -۰/۱، -۰/۲ و -۱ مگاپاسکال در ژنوتیپ حساس به ترتیب حدود ۹۵، ۷۵، ۶۰ و ۴۰ درصد و در ژنوتیپ متحمل حدود ۹۵، ۸۵ و ۸۰ درصد ثبت شد (شکل ۲). گلن و همکاران (Gelnn *et al.*, 1997) با مطالعه گیاه گندم اعلام داشتند که هر چه گیاه بتواند در شرایط تنش، آب بیشتری در بافت‌های خود حفظ کند، قدرت پروتوپلاسم در تحمل صدمات ناشی از خشکی بیشتر خواهد شد. تحقیق حاضر نشان داد که در شرایط وجود تنش، میزان کاهش RWC ژنوتیپ متحمل به خشکی بسیار کمتر از ژنوتیپ حساس بوده است. این نتایج با یافته‌های یارنیا و همکاران (۱۳۸۰) در خصوص یونجه چند ساله در شرایط تنش شوری مطابقت دارد. کایزر (Kaiser, 1989) اعلام داشت، هنگامی که میزان نسبی آب گیاه توتون بیش از ۳۰ درصد کاهش یابد، کاهش غیر قابل برگشتی در ظرفیت فتوسنتزی به وجود می‌آید که ناشی از صدمه وارده به غشای کلروپلاست بوده و نهایتاً منجر به مرگ گیاه می‌گردد. همچنین آستانه RWC برای کاهش فتوسنتز گیاه جو بین ۷۰ تا ۷۵ درصد اعلام شده است

برای :

استخراج اسید آمینه پرولین از بافت‌های برگ از روش بیتز و همکاران (Bates *et al.*, 1973) با استفاده از معرف ناین هیدرین و برای استخراج قندهای محلول بافت‌های برگ از روش فنل-اسید سولفوریک (Stewart, 1989) استفاده شد. میزان جذب نوری پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر و قندهای محلول در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Cary-300. Varian- Australia) اندازه‌گیری گردید.

به منظور تعیین غلظت عناصر

در نمونه برگ گیاه از روش هضم مرطوب و ترکیب اسیدسولفوریک، اسید سالیسیلیک و آب اکسیژنه استفاده شد. پس از تهیه عصاره، عناصر کلسیم، منیزیم و روی با روش جذب اتمی شعله‌ای و با استفاده از دستگاه جذب اتمی (Atomic Absorption Spectrometer) مدل Perkin Elmer-3110 و برای اندازه‌گیری غلظت پتاسیم از دستگاه نشر شعله‌ای (Flame Photometer) مدل Corning-410 استفاده شد.

برای سنجش میزان

غلظت پروتئین‌های محلول برگ از روش برادفورد

جدول ۱- خلاصه تجزیه واریانس اثرات سطوح مختلف پتانسیل آب خاک و ژنوتیپ بر محتوای نسبی آب برگ، پتانسیل اسمزی، تنظیم اسمزی، پرولین، قندهای محلول و پروتئین محلول

Table 1. Summary of Analysis of variance of soil water potential and genotypes effects on RWC, Osmotic potential, Osmotic adjustment, Proline, Soluble sugars and soluble proteins

S. O. V.	منبع تغییرات	درجه آزادی df.	MS میانگین مربعات					پروتئین محلول Soluble protein (mg/g Fwt)
			محتوای نسبی آب برگ RWC (%)	پتانسیل اسمزی Osmotic potential (MPa)	تنظیم اسمزی Osmotic adjustment (MPa)	پرولین Proline (mg/g Fwt)	قندهای محلول Soluble sugar (mg/g Dwt)	
Block	بلوک	2	23.45**	0.005 ^{ns}	0.002 ^{ns}	6.62 ^{ns}	153.2 ^{ns}	0.7528**
Genotype (G)	ژنوتیپ	1	1156.5**	0.26**	0.139**	1930.5**	13114.6**	32.5**
Water potential (WP)	پتانسیل آب	3	2108.7**	0.58**	0.377**	2862.9**	3815.5**	21.22**
G × WP	ژنوتیپ × پتانسیل	3	279.2**	0.098**	0.22**	111.5**	870.3**	10.04**
Error	خطا	14	2.85	0.005	0.001	5.6	118.8	0.177
C. V. %	ضریب تغییرات	—	2.27	4.10	13.05	6.30	8.10	7.50

** و * : به ترتیب نشان دهنده معنی دار بودن در سطوح احتمال ۱٪ و ۵٪ می باشد.

ns: غیر معنی دار

** and * : Significant, significant at 1% and 5% probability levels, respectively.
ns: non-significant

جدول ۲- مقایسه میانگین غلظت عناصر و پروتئین محلول برگ دو ژنوتیپ حساس و متحمل به خشکی یونجه برگ بریده در پتانسیل های مختلف آب خاک
 Table 2. Mean comparisons for elements concentration and soluble protein of leaf in drought sensitive and tolerant genotypes of cutleaf medic under different soil water potential

پتانسیل آب خاک Soil water potential (MPa)	پتاسیم K ⁺ (mg/g Dwt)		کلسیم Ca ²⁺ (mg/g Dwt)		منیزیم Mg ²⁺ (mg/g Dwt)		روی Zn ²⁺ (mg/g Dwt)		پروتئین محلول Soluble Protein (mg/g Fwt)	
	حساس	متحمل	حساس	متحمل	حساس	متحمل	حساس	متحمل	حساس	متحمل
	Sensitive	Tolerant	Sensitive	Tolerant	Sensitive	Tolerant	Sensitive	Tolerant	Sensitive	Tolerant
-0.03	28.40 c	29.20 d	12.7 d	12.7 d	2.81 b	2.94 b	0.091 a	0.093 a	8.5 a	8.1 a
-0.10	30.04 c	32.63 c	13.9 c	14.5 c	2.98 b	3.11 b	0.090 a	0.091 a	3.8 b	7.2 a
-0.20	32.81 b	42.34 b	14.7 b	16.3 b	2.83 a	3.37 a	0.062 b	0.071 b	2.7 c	7.3 a
-1.00	36.62 a	46.72 a	16.7 a	17.1 a	2.75 b	3.56 a	0.042 c	0.061 b	1.8 d	5.9 b

تفاوت میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چنددامنه ای دانکن معنی دار نیست.

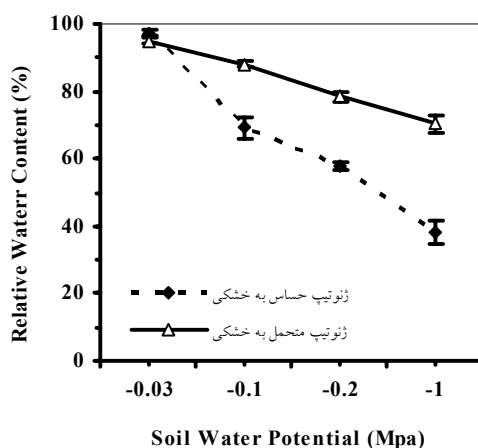
Means followed by the same letter, in each column, are not significantly different at 5% probability level- Using Duncan Multiple Range Test.

جدول ۳- خلاصه تجزیه واریانس اثرات مقادیر مختلف پتانسیل آب خاک و ژنوتیپ بر عناصر پتاسیم، کلسیم، منیزیم و روی
 Table 3. Summary of Analysis of variance of soil water potential and genotypes effects on K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ and Zn²⁺

S. O. V.	منبع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات (MS)			
			پتاسیم K ⁺ (mg/g Dwt)	کلسیم Ca ²⁺ (mg/g Dwt)	منیزیم Mg ²⁺ (mg/g Dwt)	روی Zn ²⁺ (mg/g Dwt)
Block	بلوک	2	0.407 ^{ns}	0.114 ^{ns}	0.004 ^{ns}	0.0001 ^{ns}
Genotype (G)	ژنوتیپ	1	288.48**	5.93**	1.055**	0.0002**
Water potential (WP)	پتانسیل آب	3	181.21**	17.9**	0.047*	0.002**
G × WP	ژنوتیپ × پتانسیل	3	29.13**	0.724**	0.172**	0.00007 ^{ns}
Error	خطا	14	2.75	0.129	0.015	0.00003
C.V. %	ضریب تغییرات	—	4.7	2.42	4.05	7.48

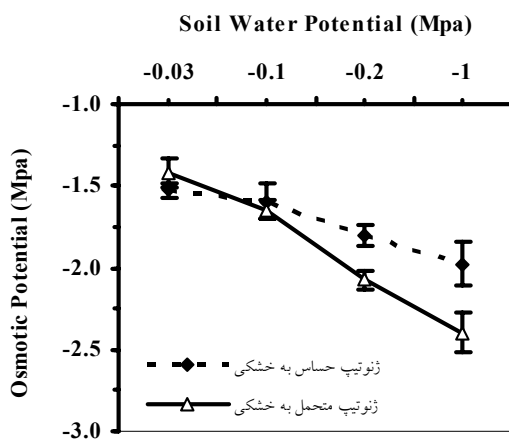
** و *: به ترتیب نشان دهنده معنی دار بودن در سطوح احتمال ۱٪ و ۵٪ می باشد. ns: غیر معنی دار

** and *: Significant at 1% and 5% probability levels, respectively.
 ns: non-significant



شکل ۲- روند تغییرات نسبی آب برگ (RWC) در دو ژنوتیپ حساس و متحمل یونجه یکساله برگ بریده در پتانسیل‌های مختلف آب خاک. میله‌های عمودی خطای نمونه را نشان می‌دهند

Fig. 2. Variation of RWC in two sensitive and tolerant genotypes of cutleaf medic under different soil water potential levels. Vertical bars indicate sampling errors.



شکل ۳- روند تغییرات پتانسیل اسمزی در دو ژنوتیپ حساس و متحمل یونجه یکساله در پتانسیل‌های مختلف آب خاک. میله‌های عمودی نشان دهنده خطای نمونه هستند

Fig. 3. Variation of osmotic potential in two sensitive and tolerant genotypes of cutleaf medic under different drought levels. Vertical bars indicate sampling errors

که در ژنوتیپ حساس با افزایش شدت تنش، غلظت پروتئین‌های محلول به شدت کاهش یافت (جدول ۱ و ۲) که می‌تواند ناشی از کاهش فراوانی پیش ماده‌های تولیدکننده پروتئین‌ها (مواد معدنی و آلی) (Antoline and Sanchez-Diaz, 1993) و کاهش تظاهر ژن‌ها یا مبدا تظاهر آن‌ها باشد (Schubert *et al.*, 1995) برای روشن شدن موضوع و علت آن تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

اندازه‌گیری میزان قندهای محلول در ژنوتیپ حساس نشان داد که غلظت قندهای محلول در تنش ملایم (۱/۰- مگا پاسکال) اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت (شکل ۶) و در سطوح بعدی تنش، روند افزایشی نیز نسبتاً کند بود. انباشت پرولین و خصوصاً قندهای محلول در ژنوتیپ متحمل به خشکی نسبت به ژنوتیپ حساس بسیار مشهودتر بوده است. با توجه به سایر اطلاعات این تحقیق می‌توان رابطه مثبت این متابولیت‌ها را با ساز و کار تنظیم اسمزی و میزان بالاتر آب و ارتباط منفی آن‌ها را با پتانسیل اسمزی در گیاه متحمل دید. می‌توان استدلال کرد که انباشت قندهای محلول در شرایط تنش علاوه بر نقش‌های فیزیولوژیکی مهمی که از نظر تأمین انرژی و جلوگیری از مرگ حتمی ایفا می‌کنند، می‌تواند باعث کاهش پتانسیل اسمزی سلول شده و از طریق تنظیم اسمزی موجب بالاتر نگه داشتن میزان آب نسبی در ژنوتیپ متحمل به خشکی شده و به این ترتیب در سازوکار تحمل به خشکی نقش مهمی داشته باشند. از این نظر نتایج به دست آمده با نتایج جیانگ و همکاران (Jiang *et al.*, 2001) مطابقت دارد.

کنترل RWC در شرایط تنش قسمتی از فرآیند تحمل به شمار می‌آید، چرا که میزان آب نسبی و املاح با کمک هم میزان فشار تورمی را مشخص می‌کنند (Gelnn *et al.*, 1997). تجمع پرولین و قندهای محلول و سایر متابولیت‌ها به منظور تنظیم اسمزی در گیاهان مختلف مانند گراس‌های مرتعی (Martin *et al.*, 1993)، گندم (Bittman and Simpson, 1989)، توتون و جو

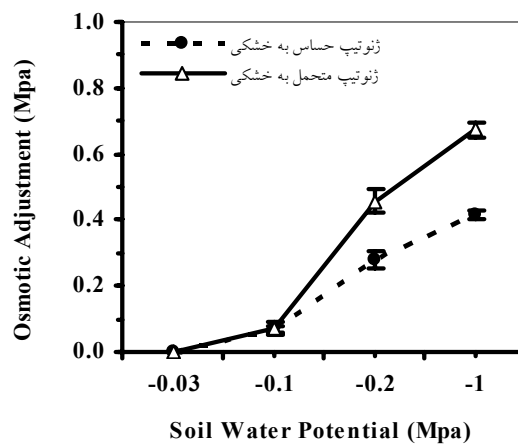
(Blum, 1989). دلیل بالابودن RWC برگ در ژنوتیپ متحمل به خشکی، ممکن است به علت وجود ساز و کارهای کاهش‌دهنده تلفات آب از طریق روزنه‌ها (بسته‌تر شدن روزنه‌ها) و یا به دلیل جذب بیشتر آب از طریق توسعه ریشه‌ها باشد که قبلاً توسط برخی از پژوهشگران گزارش شده است (Munns *et al.*, 1999; Jiang *et al.*, 2001). البته مشخص شدن دلیل این موضوع در گیاه یونجه یکساله نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

از سوی دیگر کاهش معنی‌دار پتانسیل اسمزی در هر دو ژنوتیپ (شکل ۳) می‌تواند به دلیل از دست دادن آب آزاد در سلول‌ها و یا به دلیل وجود ساز و کار فعال در جذب و یا تولید املاح کاهش‌دهنده پتانسیل اسمزی در محیط سلول و یا هر دو باشد. مشخص شده است که در گیاه یونجه در شرایط تنش متابولیت‌ها و برخی از یون‌ها در سلول‌ها انباشته شده و باعث تنظیم اسمزی می‌شوند (Khan *et al.*, 1998). تغییرات متناسب با مقدار انباشت متابولیت‌ها به منظور تنظیم اسمزی با تغییرات RWC و پتانسیل آب برگ در یونجه گزارش شده است (Martin *et al.*, 1997). در این تحقیق تنظیم اسمزی به عنوان ساز و کاری موثر در ایجاد مقاومت به خشکی در این دو ژنوتیپ نقش داشته است، به طوری که میزان آن در ژنوتیپ متحمل در شدیدترین میزان تنش (۱- مگا پاسکال) تقریباً دو برابر رقم حساس (معادل ۰/۷۵ در مقابل ۰/۴ مگا پاسکال) بوده است (شکل ۴).

یکی از دلایل کاهش پتانسیل اسمزی، افزایش غلظت متابولیت‌ها و املاح در سلول‌های گیاه است. نتایج این آزمایش نشان داد که افزایش شدت تنش خشکی و کاهش پتانسیل آب خاک، باعث انباشت پرولین و قندهای محلول در هر دو ژنوتیپ شده است (شکل‌های ۵ و ۶). غلظت پروتئین‌های محلول در سطوح مختلف تنش خشکی در ژنوتیپ متحمل تقریباً ثابت بوده است که به نظر می‌رسد در حفظ ساختار گیاه و انجام فعالیت‌های گیاهی مطلوب بوده است، در حالی

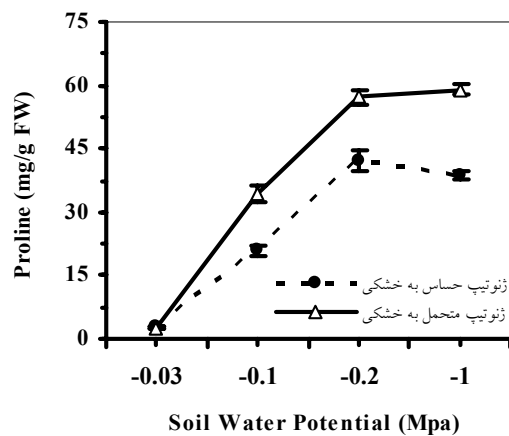
طوری که بیشترین غلظت این یون در سطح تنش شدید (۱- مگاپاسکال) در ژنوتیپ متحمل حدود ۴۶ میلی گرم و در ژنوتیپ حساس به حدود ۳۴ میلی گرم بر گرم ماده خشک رسید. در حالیکه غلظت این یون در سطح ۰/۰۳- مگاپاسکال در هر دو ژنوتیپ حدود ۲۸ میلی گرم بود. به نظر می رسد که افزایش معنی دار یون پتاسیم در شرایط تنش، نشان دهنده نقش این یون در کاهش پتانسیل اسمزی و انجام سازوکار تنظیم اسمزی در ژنوتیپ متحمل باشد که با نتایج حاصل از

(Turner and Jones, 1980)، یونجه و شبدر (Handa et al., 1983) گزارش شده است. در این آزمایش با افزایش شدت تنش خشکی تغییراتی در غلظت یون ها ایجاد گردید، که در این میان تغییرات غلظت پتاسیم از سایر یون ها بیشتر بود (جداول ۲ و ۳). نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت پتاسیم نشان داد که با افزایش شدت تنش، میزان انباشت این یون در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت، که این انباشت در ژنوتیپ متحمل به خشکی بسیار بیشتر بوده است (شکل ۷)، به



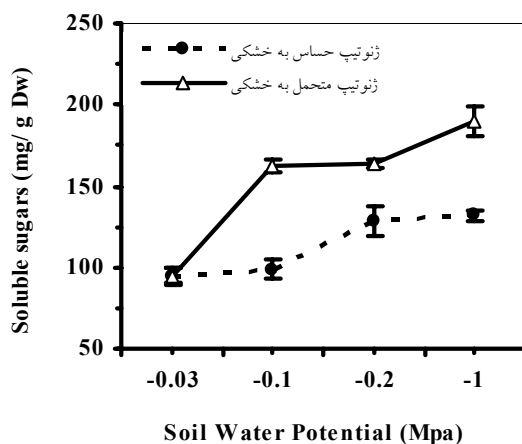
شکل ۴- تنظیم اسمزی دو ژنوتیپ حساس و متحمل یونجه یکساله در پتانسیل های مختلف آب خاک. میله های عمودی خطای نمونه را نشان می دهند

Fig. 4. Variation of osmotic adjustment in two sensitive and tolerant genotypes in different drought levels. Vertical bars indicate sampling errors



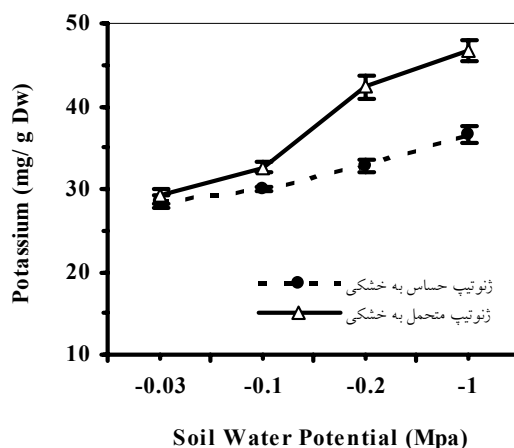
شکل ۵- غلظت پرولین دو ژنوتیپ حساس و متحمل یونجه برگ بریده در پتانسیل های مختلف آب خاک. میله های عمودی نشان دهنده خطای نمونه هستند

Fig. 5. Variation of proline concentration of two sensitive and tolerant genotypes cutleaf medic in different soil water potential. Vertical bars shows sampling errors



شکل ۶- غلظت قندهای محلول دو ژنوتیپ حساس و متحمل یونجه برگ بریده در پتانسیل‌های مختلف آب خاک. میله‌های عمودی نشان دهنده خطای نمونه هستند

Fig. 6. Soluble sugar concentration of two sensitive and tolerant genotypes in different drought levels. Vertical bars indicate sampling errors



شکل ۷- غلظت پتاسیم برگ دو ژنوتیپ حساس و متحمل یونجه برگ بریده در پتانسیل‌های مختلف آب خاک. میله‌های عمودی نشان دهنده خطای نمونه برداری هستند

Fig. 7. Leaf Potassium concentration of two sensitive and tolerant genotypes of cutleaf medic under different soil water potential. Vertical bars indicate sampling errors

تحقیقات سایر محققان مانند کاملی و لوسل (Kameli and Lösel, 1995) همکاران (Khanna *et al.*, 1995) بر روی یونجه و خانا و منطق است. همچنین یون پتاسیم در باز و بسته شدن روزنه‌ها و حفظ تعادل یونی نقش دارد. گزارش شده است که افزایش غلظت پتاسیم می‌تواند نقش مهمی در افزایش هدایت روزنه‌ای داشته باشد (Patakas *et al.*, 2002)، البته میزان تأثیر آن در این گونه گیاهی نیاز به تحقیق بیشتر دارد. همچنین بررسی سایر عناصر مانند کلسیم، منیزیم و روی نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی میزان غلظت این عناصر در هر دو ژنوتیپ افزایش یافت و اثرات ژنوتیپ، خشکی و اثرات متقابل آن‌ها در عناصر کلسیم، منیزیم و روی معنی‌دار بوده است (جدول ۳). نتایج

تحقیقات سایر محققان مانند کاملی و لوسل (Kameli and Lösel, 1995) همکاران (Khanna *et al.*, 1995) بر روی یونجه و خانا و منطق است. همچنین یون پتاسیم در باز و بسته شدن روزنه‌ها و حفظ تعادل یونی نقش دارد. گزارش شده است که افزایش غلظت پتاسیم می‌تواند نقش مهمی در افزایش هدایت روزنه‌ای داشته باشد

پتاسیم به طور همزمان نقش اساسی در تحمل به تنش خشکی ایفا می کنند. به هر حال نتایج این تحقیق وجود صفات مناسب افزایش تحمل به خشکی را در این گونه یونجه به خوبی نشان داد. بنظر می رسد که با بررسی صفات مهمی مانند میزان آب نسبی و پتانسیل اسمزی و ارزیابی سازوکار تنظیم اسمزی در این گونه به راحتی بتوان به شناسایی ژنوتیپ های متحمل به خشکی پس از استقرار گیاه اقدام کرد. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که اندازه گیری RWC در گام اول و پتانسیل اسمزی در گام های بعدی می توانند به عنوان معیارهای مناسبی برای شناسایی ژنوتیپ های متحمل به خشکی در یونجه یکساله برگ بریده مورد استفاده قرار گیرند.

این بررسی نشان داد که مطالعه وضعیت آبی گیاهان در شرایط تنش خشکی تنها زمانی می تواند به خوبی تفسیر شود که به پتانسیل آبی خاک نیز توجه کامل شده باشد (Taiz & Zeiger, 2002).

نتیجه گیری کلی که از این تحقیق می توان کرد، آن است که ژنوتیپ متحمل به خشکی یونجه برگ بریده [*Medicago laciniata* (L.) Mill] سازوکارهای مناسبی برای بالاتر نگه داشتن میزان نسبی آب و کاهش بیشتر پتانسیل اسمزی در شرایط تنش دارد. نتایج نشان داد که در این ژنوتیپ، پتانسیل اسمزی منفی تر و انجام بهتر تنظیم اسمزی از طریق تجمع پرولین، قندهای محلول و

References

- . روش های تجزیه گیاه. نشریه فنی شماره ۱۸۲. چاپ اول. مؤسسه تحقیقات خاک و آب.
- . یونجه های یکساله. انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع، ۱۶۸ ص.
- . اصول زراعت و انتخاب گونه و ارقام مناسب یونجه های یکساله در مراتع و مناطق دیم در ایران. تهران، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع. ۶۹ ص.
- . عوامل روزنه ای و غیرروزنه ای کنترل کننده فتوسنتز و ارتباط آن با مقاومت به خشکی در ارقام گندم. مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۵ (۱): ۱۰۶-۹۳.
- . گزارش نهایی طرح غربال گرامینه و لگوهای جمع آوری شده از مناطق خشک کشور در مرحله جوانه زنی و گیاهچه ای. پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی. ۷۵ صفحه.
- . تأثیر متابولیت های سازگاری بر روابط آبی ارقام یونجه در سطوح مختلف شوری. مجله علوم زراعی ایران، ۳ (۴): ۴۸-۴۰.

Antoline, M. C., and M. Sanchez-Diaz. 1993. Photosynthetic nutrient use efficiency, nodule activity and solute accumulation in drought stressed alfalfa plant. *Photosynthetica*. 27 :595-604.

Atkinson, C. J. 1991. The flux and distribution of xylem sap calcium to adaxial and abaxial epidermal tissue in relation to stomatal behaviour, *J. Exp. Bot.* 42: 987-993.

Bajji, M., S. Lutts and J. M. Kinet. 2001. Water deficit effects on solute contribution to osmotic adjustment as a function of leaf ageing in three durum wheat cultivars performing differently in arid conditions. *Plant Sci.* 160: 669-681.

Bates, L. S., R. P. Waldern and I. D. Tear. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil.* 39: 205-207.

- Bittman, S. and G. M. Simpson. 1989.** Drought effects on water relations of three cultivated grasses. *Crop Sci.* 29: 992–999.
- Blum, A. 1989.** Osmotic adjustment and growth of barley genotypes under drought stress. *Crop Sci.* 20: 230-233.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analy. Biochem.* 72: 248-254.
- Glenn, E. P., J. Brown and M. Jamal-Khan. 1997.** Mechanisms of salt tolerance in higher plants. The University of Arizona. pp: 83-110.
- Handa, S., R. A. Bressan, A. K. Handa, N.C Carpita and P. M. Hasegawa. 1983.** Solutes contributing to osmotic adjustment in cultured plant cells adapted to water stress. *Plant Physiol.* 73: 834–843.
- Hare, P. D., W. A. Cress and J. Van Standen. 1998.** Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ.* 21: 535–553.
- Heber, U., L. Tyankova and K. A. Santarius. 1971.** Stabilization and inactivation of biological membranes during freezing in the presence of amino acids. *Biochem. Biophys. Acta.* 241: 578-592.
- Hoagland, D. R. and D. I. Arnon. 1950.** The water-culture method for growing plants without soil. *Circ.* 347. Univ. of Calif. Agric. Exp. Station, Berkley.
- Iannucci, A., M. Russo, L. Arena, N. D. Fonzo and P. Martiniello. 2002.** Water deficit effects on osmotic adjustment and solute accumulation in leaves of annual clovers. *Euro. J. Agron.* 16: 111–122
- Irigoyen, J. J., D. W. Emerrich and M. Sanchez-Diaz. 1992.** Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa plant. *Physiol. Plant.* 84: 55-60.
- Jones, M. M., C. B. Osmond and N. C. Turner. 1980.** Accumulation of solutes in leaves of sorghum and sunflower in response to water deficits. *Aust. J. Plant Physiol.* 7: 193–205.
- Jiang, Y. and B. Huang. 2001.** Osmotic adjustment and root growth associated with drought pre-conditioning-enhanced heat tolerance in Kentucky bluegrass. *Crop Sci.* 41: 1168-1173
- Kaiser, W. M. 1989.** Effect of water deficit on photosynthesis capacity. *Plant Physiol.* 71: 142- 149.
- Kameli, A. and D. M. Lösel. 1995.** Contribution of carbohydrates and other solutes to osmotic adjustment in wheat leaves under water stress. *J. Plant Physiol.* 145: 363–366.
- Khanna, C. R., S. M. Vasudev, M. Maheswari, A. Srivastava and D. Bahukhandi. 1995.** K⁺ osmoregulation and drought tolerance: an overview. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* B61: 51–56.
- Khan, M. G., M. Silberbush and S. H. Lips. 1998.** Response of alfalfa to potassium, calcium and nitrogen under stress induced by sodium chloride. *Biol. Plant.* 40: 2, 251-259.
- Ludlow, M. M. and R. C. Muchow. 1990.** A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Adv. Agron.* 43: 107–153.
- Martin, M., J. A. Morgan, G. Zerbi and D. R. Lecain. 1997.** Water stress imposition rate affects osmotic adjustment and cell wall properties in winter wheat. *Ital. J. Agron.* 1: 11–20.
- Moynihan, J. M., S. R. Simmons and C. C. Sheaffer. 1996.** Intercropping annual medic with conventional height and semidwarf barley grown for grain. *Agron. J.* 88: 823-828
- Martínez J. M., S. Luttsa, A. Schanckb, M. Bajjia and J. M. Kineta. 2004.** Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub (*Atriplex halimus* L.) *J. Plant Physiol.* 161: 1041–1051.

- Munns, R., G. R. Cramer and M. C. Ball. 1999.** Interactions between rising CO₂, soil salinity and plant growth In: Luo, Y. and Mooney, H. A. (Eds.) Carbon dioxide and environmental stress. Academic Press, New York, pp: 139-167
- Patakas, A., N. Nikolaou, E. Zioziou, K. Radoglou and B. Noitsakis. 2002.** The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. *Plant Sci.* 163: 361-367.
- Puritch, G. S. and A. V. Barker. 1967.** Structure and function of tomato leaf chloroplasts during ammonium toxicity. *Plant Physiol.* 42: 1229-1238.
- Rascio, A., C. Platani, G. Scalfati, A. Tonti and N. D. Fonzo. 1994.** The accumulation of solutes and water binding strength in durum wheat. *Physiol. Plant.* 90: 715-721.
- Ritchie, S. W., H. T. Nguyen and A. S. Haloday. 1990.** Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Sci.* 30: 105-111
- Sanchez, F. J., M. Manzanares, E. F. de Andres, J. L. Tenorio and L. Ayerbe. 1998.** Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Research.* 59: 225- 235.
- Schubert, S., R. Serray, E. P. Balzer and K. Mengel. 1995.** Effect of drought stress on growth, sugar concentrations and amino acid accumulation in N₂ fixing alfalfa (*Medicago sativa*). *J. Plant. Physiol.* 146: 541-546.
- Stewart, E. A. 1989.** Analysis of Vegetation and Other Organic Material. Academic Press, New York. pp: 46-60.
- Teulat, B., P. Monneveux, J. Wery, C. Borries, I. Souyris, A. Charrier and D. This. 1997.** Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *New Phytol.* 137: 99-107.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 2002.** *Plant Physiology.* 3rd Edition. Sunderland Massachusetts. pp. 34-46.
- Turner, N. C. and M. M. Jones. 1980.** Turgor maintenance by osmotic adjustment: a review and evaluation. In: Turner, N.C. and Kramer, P.J. (Eds.), *Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress.* Wiley-Inter-science, New York, NY, pp. 87-103
- Tsugane, K., K. Kobayashi, Y. Niwa, Y. Ohba, K. Wada and H. Kobayashi. 1999.** A recessive Arabidopsis mutant that grows photo-autotrophically under salt stress shows enhanced active oxygen detoxification. *Plant Cell.* 11: 1195-1206.
- Zhang, J., H. T. Nguyen and A. Blum. 1999.** Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J. Exp. Bot.* 50: 291-302

The role of some metabolites on the osmotic adjustment mechanism in annual cutleaf medic [*Medicago laciniata* (L.) Mill] under drought stress

Ghorbani Javid, M.¹, F. Moradi², Gh. A. Akbari³, I. Allahdadi⁴

ABSTRACT

In order to study the role of some metabolites as proline, soluble sugar, soluble proteins and inorganic solutes on osmotic adjustment mechanism and variation of water relationship in cutleaf medic [*Medicago laciniata* (L.) Mill] under drought stress, a greenhouse experiment was conducted in 2004, at the Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj, Iran- using a factorial arrangement in RCBD with three replications. Two genotypes of cutleaf medic, sensitive and tolerant to drought stress was treated in four levels of water stress including: -0.1, -0.2, and -1 MPa as low, medium and high stress levels, respectively and normal condition (FC = -0.03 MPa). Results indicated that high stress decreased RWC of sensitive genotype. Increases in organic metabolites accumulation as Proline, soluble sugar and inorganic solutes as potassium were associated with a decrease in osmotic potential in tolerant genotype as compared to sensitive genotypes. This study revealed that osmotic adjustment, through increasing soluble sugar and potassium ion was considered as an important mechanism for drought tolerance in annual cutleaf medic, as in tolerant genotype, it was almost twice in comparison with sensitive genotype.

Keywords: Annual cutleaf medic, Drought stress, Osmotic adjustment, Proline, Soluble sugar, Soluble proteins, Water relation.

Received: March, 2006

1- Former MSc. Student, Abouriham Campus, The University of Tehran, Pakdasht, Iran.

2- Assistant Prof., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. Karaj, Iran (Corresponding author).

3 and 4- Assistants Prof. Aboureihan Campus, The University of Tehran, Pakdasht, Iran.