

VARIABILITE DE LA TOLERANCE AU STRESS SALIN CHEZ DEUX GENOTYPES CONTRASTES D'UNE LEGUMINEUSE *Medicago truncatula* AU STADE GERMINATION

AMOURI Adel Amar, FYAD LAMECHE Fatima-Zohra et KARKACHI Nouredine
Département de Biologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie,
Université d'Oran Ahmed Ben Bella, Es-Sénia BP1524, Oran, Algérie
Email: amouri.adel@univ-oran.dz

Résumé. - L'étude sur l'évaluation de la variabilité de la tolérance au stress salin, a porté sur deux génotypes contrastés appartenant à l'espèce *M. truncatula* sous différentes concentrations de NaCl (0; 68; 102 et 137 mM), l'un tolérant (Tru 131) et l'autre sensible qui est (Jemalong). L'analyse de l'aptitude germinatif durant la croissance des jeunes plants, a montré un taux de germination et un indice de tolérance élevé chez (Tru 131) par rapport à Jemalong. L'analyse des protéines solubles, a présenté une synthèse élevée en protéines solubles durant l'application du stress salin chez le génotype tolérant (Tru 131) par rapport à Jemalong. L'introduction de ce génotype tolérant (Tru 131) dans les régions salines, arides et semi-arides en Algérie et le pourtour méditerranéen, peut améliorer significativement la productivité végétale pour assurer une bonne alimentation animale et contribuer à la fertilisation des terres agricoles.

Mots clés: *Medicago truncatula*, légumineuse, stress salin, germination, protéines solubles.

VARIABILITY OF THE TOLERANCE OF SALT STRESS IN TWO CONTRASTING GENOTYPES OF THE *Medicago truncatula* LEGUME AT THE GERMINATION STAGE

Abstract. - The study on the assessment of the variability of salt stress tolerance, focused on two contrasting genotypes of the plant *M. truncatula* under four levels of salt stress (distilled water as control 0; 68; 102 and 137 mM) of sodium chloride (NaCl) solution, one is tolerant (Tru 131) and the (Jemalong) the sensitive one. The data analysis of germination aptitude showed that the (Tru 131) genotype had the best germinatif ability, compared to (Jemalong). The soluble protein analysis, showed a high protein synthesis during salt stress application in the tolerant genotype compared to the sensitive one (Jemalong). The introduction of the most tolerant genotype (Tru 131) in arid and semi-arid areas in Algeria and Mediterranean regions, can improve significantly the vegetal productivity in order to ensure a good animal food and contribute to the fertilization of agricultural land.

Key words: *Medicago truncatula*, legume, salt stress, germination, soluble proteins.

Introduction

La salinité est l'un des stress abiotiques qui affecte de manière significative la croissance des plantes et la qualité des graines. Les légumineuses sont des plantes très importantes sur le plan écologique et agricole car ils sont capables d'interagir en symbiose avec des rhizobiums pour la fixation biologique de l'azote [1,2], ce qui évite l'utilisation d'engrais chimiques, qui affectent la rhizosphère et polluent l'atmosphère [1]. Parmi les espèces annuelles du genre *Medicago*, l'espèce *Medicago truncatula* est largement utilisée comme une plante légumineuse modèle pour comprendre la tolérance aux stress abiotiques [3]. Ce type de légumineuses a un grand intérêt pour l'agriculture durable. La croissance de ces plantules au stade précoce est très sensible aux stress environnementaux [4]. A ce stade, la germination devient un facteur déterminant pour le développement de la plante

sous l'action de la salinité. Ainsi, toutes les graines n'ont pas une capacité identique de tolérer la dessiccation. Les protéines qui s'accumulent chez les plantes en développement sous des conditions salines, jouent un rôle important dans l'ajustement osmotique [5]. Ces protéines sont synthétisées de novo en réponse à un stress salin qui sont présentes de manière constitutive à une faible concentration [6]. Il est donc intéressant de trouver une association entre la teneur en protéines et la tolérance au stress salin, car, la diminution de la synthèse des protéines et le polymorphisme dans les profils protéiques est un phénomène commun pour les différentes plantes sous stress salin [7]. L'objectif de la présente étude, est l'évaluation de variabilité génétique au niveau morphologique (aptitude de germination) et au niveau biochimique (synthèse des protéines solubles) pour la tolérance au stress salin entre deux géotypes contrastés, l'un tolérant (Tru 131) et l'autre sensible (Jemalong).

1.- Matériel et méthodes

1.1.- Matériel végétal

Des graines appartenant aux deux géotypes contrastés de *M. truncatula* ont été étudiés, le tolérant (Tru 131) fournis par l'IDGC Belabes et Jemalong qui est sensible [8], sont utilisés à quatre niveaux de traitement par NaCl (0, 68, 102 et 137 mM) [9].

1.2.- Méthodes

1.2.1.- Condition de germination et paramètres calculés

Par semis, pour chaque géotype, quarante graines scarifiées après désinfection sont réparties en quatre lots, le lot témoin et les trois lots traités à différentes concentrations. Les graines sont mises à germer à l'obscurité en boîtes de Petri fermées et tapissées avec du papier filtre imbibé contenant le milieu correspondant, dans une étuve à une température de $25\pm 2^\circ\text{C}$. Chez *Medicago truncatula*, la condition optimale est l'obscurité et la lumière diminue la vitesse de germination [10]. Les graines germées sont dénombrées quotidiennement afin d'analyser la cinétique de germination, l'émergence de la radicule étant l'indicateur de la germination. Les boîtes de Pétri sont arrosées tous les deux jours (3ml par boîte de solution des différentes concentrations de NaCl) pour maintenir les graines toujours imbibées. Neuf jours après le semis et à une température de $25\pm 2^\circ\text{C}$, le taux de germination (TG) est calculé afin d'analyser la capacité germinative, car après cette durée, un taux élevé de graines germées est observé aux différentes doses de salinité. Ces taux représentent le pourcentage de graines germées par rapport au total de graines semées et qui varie d'un géotype à un autre. Pour déterminer la tolérance d'un géotype, un indice (IT) égal au rapport de la valeur notée sous stress sur celle du témoin, est calculé. Il a été considéré que les plantes tolérantes ont un indice de tolérance plus élevé que les plantes sensibles. Afin de normaliser les deux variables (TG et I.T), les valeurs sont analysées après transformation par $\text{Arcsin}\sqrt{x}$.

Le dispositif expérimental utilisé est un dispositif bloc, échelonné dans le temps, complètement aléatoire, avec trois répétitions ($n=3$). Pour les répétitions, chaque géotype est représenté par dix individus.

1.2.2.- Détermination des de la teneur en protéines des jeunes plants sous stress salin

La teneur en protéines de réserves est déterminée par la méthode décrite par BRADFORD (1976) en utilisant le sérum albumine bovine comme témoin. Deux

échantillons de plantules individuelles pour chaque génotype déjà pesées, sont homogénéisés avec un tampon d'extraction 50 mM Tris -HCl (pH: 6,8), 2% de SDS, 2,5% de bêta -mercaptoéthanol, 10% glycérol. Les échantillons sont centrifugés à 14000 rpm pendant 15 minutes et le surnageant est isolé et utilisé pour le dosage des protéines. L'intensité de la couleur bleue développée est enregistrée à 595 nm et la concentration en protéine est mesurée en utilisant du sérum albumine bovine comme témoin. La teneur des jeunes plants en protéines de réserves (mg g^{-1}) est calculée en fonction du poids frais des jeunes plants (mg) pour chaque génotype.

2.- Résultats et discussion

2.1.- Etude de la variabilité de la tolérance à la salinité au niveau morphologique et biochimique durant la germination

Le stress salin, quelle que soit la concentration en NaCl, diminue le taux de germination des graines. Le test de l'analyse de variance à deux facteurs, s'est révélé hautement significatif pour l'effet traitement sur le taux de germination (tab. I). Les taux de germination en absence de stress sont compris entre 90 et 100 %.

Tableau I.- Analyse de variance à deux facteurs de l'effet traitement, génotypes et leur interaction pour les paramètres (taux de germination et indice de tolérance), poids frais et teneur en protéines des jeunes plants [(F: valeur statistique de Fisher, P: niveau de signification). (*P < 0.05, ** P < 0.001; ns: non significatif)]

Paramètres	Effet génotype (G)		Effet traitement (T)		Interaction (GxT)	
	F	P	F	P	F	P
Taux de germination TG (%)	0,04	0,853	24,27	0,000**	1,61	0,227
Indice de tolérance (IT)	6,32	0,029*	24,66	0,000**	0,09	0,911
Poids frais (mg)	0,424	0,533	8,107	0,008*	1,147	0,388
Teneur en protéines (mg/g)	4,737	0,061	1,020	0,434	0,311	0,817

Les données obtenues après une durée de traitement de neuf jours, indiquent que les taux de germination des graines diminuent considérablement avec l'augmentation de la salinité (fig. 1). Ainsi, toutes les graines n'ont pas une capacité identique à tolérer la salinité [10]. Selon PRADO *et al.* (2000), la diminution du taux de germination des graines soumises à un stress salin serait due à un processus de dormance osmotique développé sous ces conditions de stress [12]. Le génotype Tru 131 présente l'indice de tolérance le plus élevé pour le taux de germination quel que soit le traitement par rapport à Jemalong. Les indices de tolérance du taux de germination enregistrés sur l'ensemble des trois répétitions de l'expérience montre que le génotype Tru 131 est le plus vigoureux et qui tolère le mieux au stress salin, tandis que le génotype Jemalong, le moins vigoureux, tolère le moins l'effet de ce stress. A la lecture du Tableau I sur l'analyse de variance à deux facteurs, ceci montre un effet génotype et traitement significatifs pour l'indice de tolérance (IT), et un effet traitement hautement significatif pour le poids frais des jeunes plants.

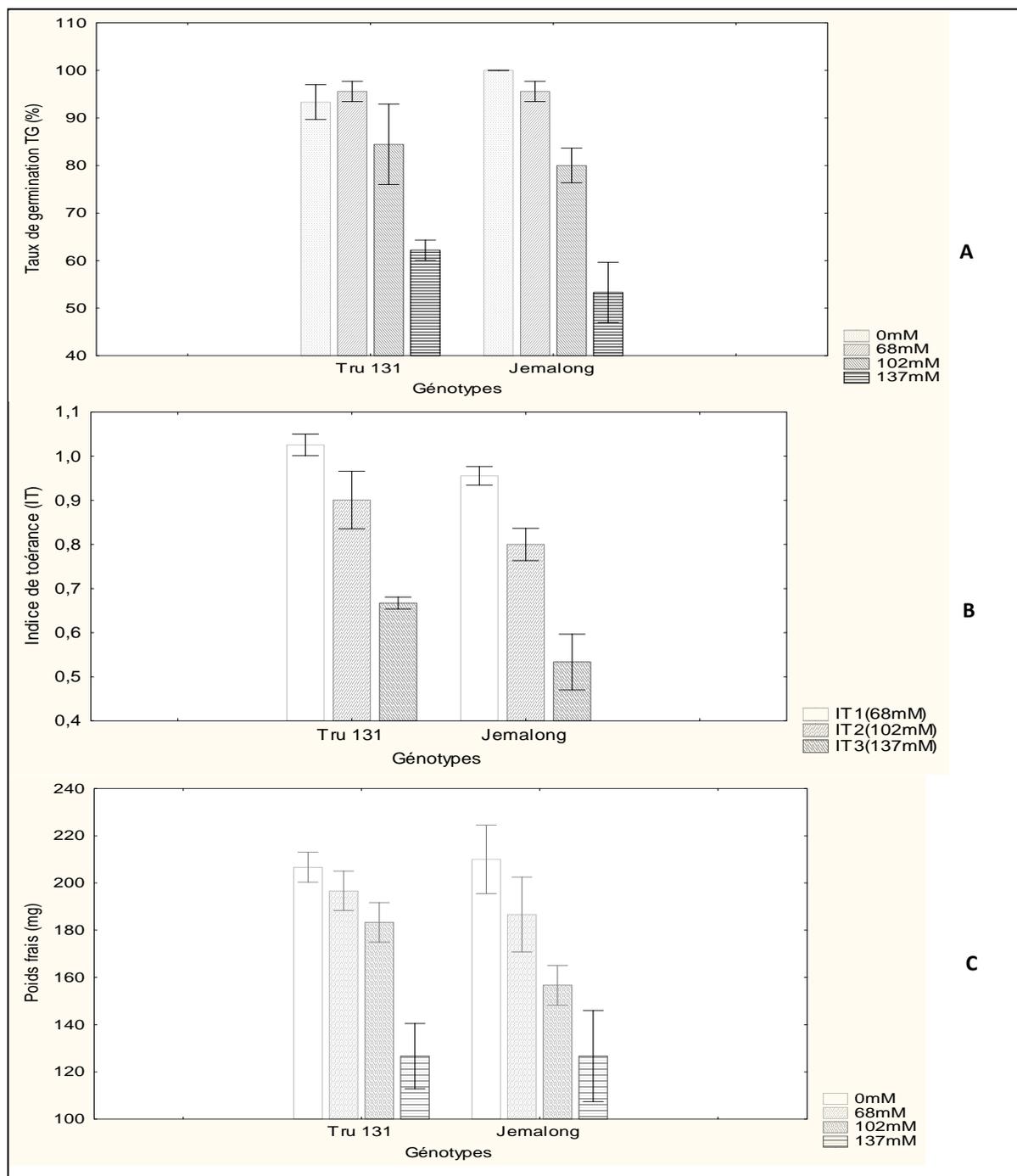


Figure 1.- Résultats obtenus sur les différents paramètres morphologiques étudiés chez deux géotypes contrastés de *M. truncatula* (Tru 131, tolérant et Jemalong, sensible) sous différentes concentration d'NaCl. (A: taux de germination, B: indice de tolérance, C: poids frais des jeunes plants)

Sous stress salin, le géotype Tru 131, montre un poids frais élevé des jeunes plants (fig. 1) et une teneur en protéines augmenté par rapport à Jemalong (fig. 2). Il a été mis en évidence chez l'orge, une différence de comportement entre la variété sensible et la variété tolérante vis-à-vis du stress salin et l'induction de la synthèse de nouvelles protéines [13]. Une teneur élevée en protéines solubles a été observée chez des cultivars d'orge, tournesol, millet et de riz tolérants au stress salin [14]. AGASTIAN *et al* (2000) ont rapporté que les protéines solubles augmentent à faible dose de salinité et diminuent à forte concentration

chez des cultivars de mûriers. Il a été reporté aussi que le stress salin déclenche l'expression de plusieurs protéines osmo-sensible dans les tissus de riz et une corrélation a été trouvée entre l'accumulation de ces protéines de stress chez les génotypes tolérants, par rapport aux génotypes de riz sensibles la salinité [16,17]. Chez les végétaux supérieurs, le stress osmotique induit la synthèse de plusieurs protéines dans les tissus végétatifs, qui sont reliés aux protéines LEA (late-embryogenesis-abundant proteins). La corrélation entre l'accumulation de ce type de protéines et la tolérance au stress, indique le rôle protecteur de ces protéines sous déficit hydrique [18]. Ainsi, le protéome qui contient des niveaux élevés en protéines LEA et en chaperons, ont un rôle important dans la tolérance au stress en relation avec la dormance des graines [19]. Une diminution dans la synthèse des protéines solubles à forte dose de NaCl chez les deux génotypes étudiés, a été observée.

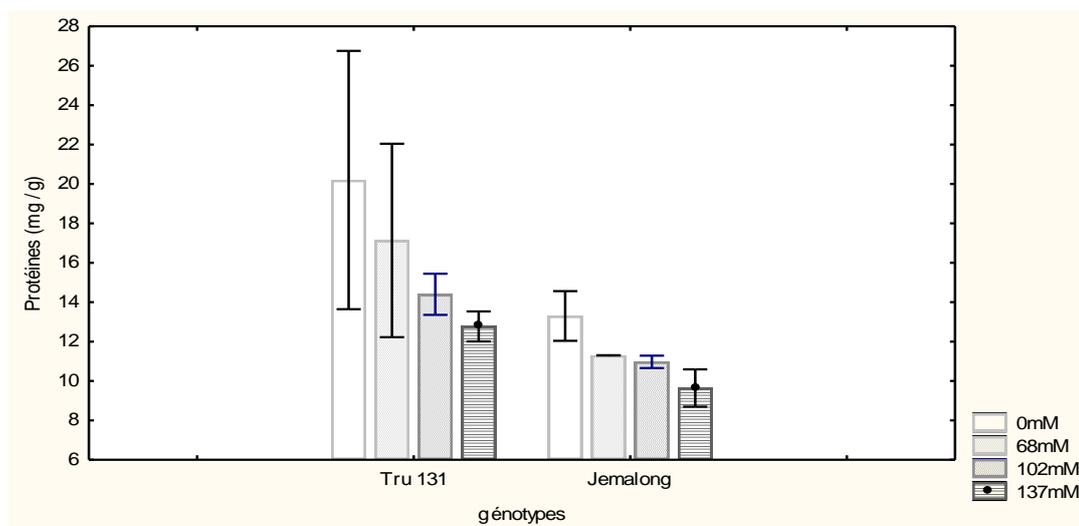


Figure 2.- Teneur en protéines solubles des jeunes plants chez les deux génotypes contrastés de *M. trunacatula* (Tru 131, tolérant et Jemalong, sensible) sous différentes concentration en NaCl

2.2.- Cinétique de germination

Les résultats sur la cinétique de germination présentés par la (fig. 3) montrent que les courbes relatives aux taux de germination des graines sous stress salin, sont situées au-dessous de celles du témoin et diminuent au fur et à mesure que la concentration de NaCl augmente. Cette figure révèle aussi un ralentissement du processus de germination en fonction du stress salin. La cinétique de germination est régulée par la température, l'optimum varie d'un génotype à un autre et d'une espèce à l'autre selon le milieu auquel elle est adaptée [10]. En conditions témoins, les deux génotypes Tru 131 et Jemalong, présentent une capacité de germination élevée surtout pour Jemalong, pour ce dernier, la capacité germinative se stabilise à partir du deuxième jour (J2), alors que chez Tru 131, la vitesse se stabilise à partir du huitième jour (J8), notant une certaine précocité de germination chez Jemalong. D'après BEN MILED *et al* (1986), ceci est due à une différence dans le temps nécessaire à la graine pour mettre en place des mécanismes lui permettant d'ajuster sa pression osmotique interne. Sous stress salin, les résultats de l'essai montrent que les concentrations 68, 102 et 137 mM de NaCl réduisent la vitesse et la capacité germinative des graines. Toutefois, le génotype Tru 131, s'avère le plus tolérant, avec une capacité de germination la plus élevée par rapport à Jemalong (fig. 4). On remarque qu'il y a une différence dans la vitesse de germination entre les deux génotypes, ceci est en fonction de la température et la réponse au déficit hydrique [21]. Les plantes ont

développé des mécanismes complexes pour affronter les changements environnementaux.

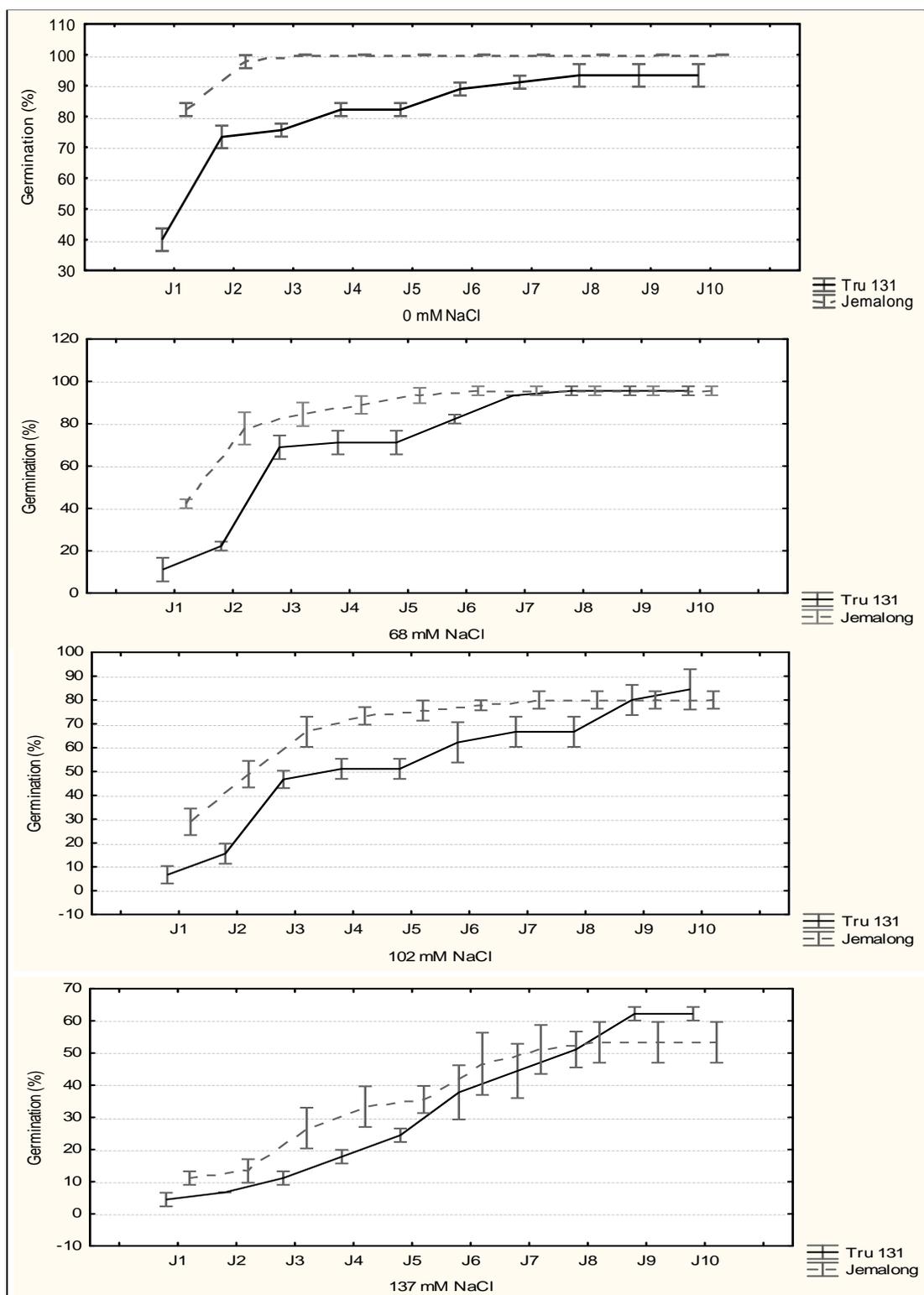


Figure 3.- Cinétique de germination des graines des deux géotypes contrastés de *Medicago truncatula* (Tru 131, tolérant et Jemalong, sensible) en fonction de la concentration en NaCl

Au niveau moléculaire, ceci est illustré par de nombreux changements dans le transcriptome, observés chez les plantules, les feuilles, les racines, et ceci comme un

processus cellulaire reprogrammant les plantes à s'adapter aux différentes températures, basses ou élevées [22]. De ce fait, il est possible de rechercher les bases génétiques qui expliquent le polymorphisme de réponse au stress salin au cours de la germination et durant l'ontogénèse afin de déterminer les gènes candidats responsables de la tolérance à la salinité.

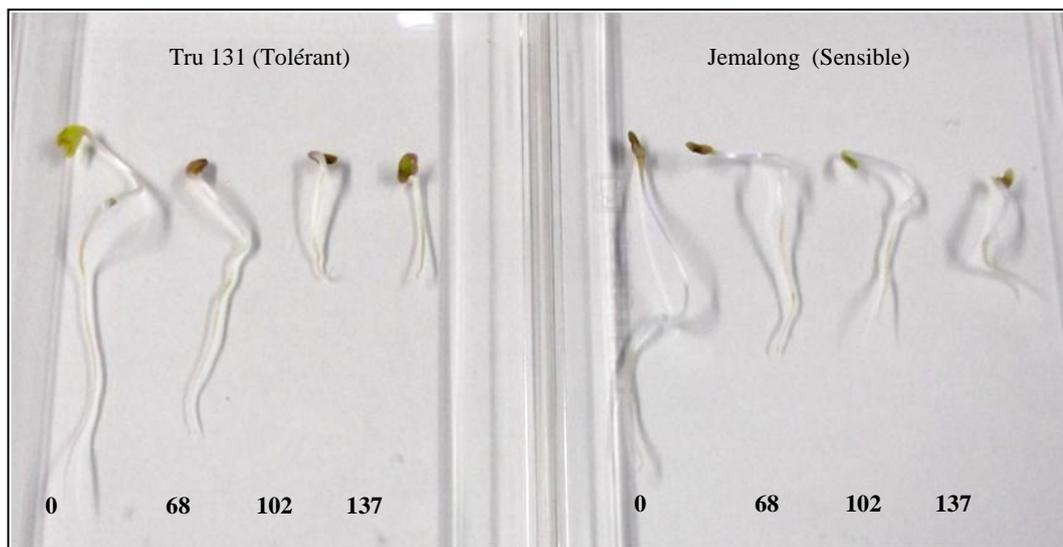


Figure 4.- Croissance des plantules de deux géotypes contrastés de *M. truncatula* (Tru 131(T) et Jemalong (S)) sous différentes concentration en NaCl

Conclusion

La variation des capacités germinatives des graines permettent de bien discriminer les géotypes quant à leur tolérance ou sensibilité au sel au cours de la germination. Le géotype Tru 131, présente la meilleure aptitude à la germination en conditions salines avec une teneur élevée en protéines, et est donc considéré comme le plus tolérant par rapport à Jemalong. La Culture de cette plante tolérante et son introduction dans les zones arides et semi-arides, semble présenter un grand intérêt agronomique (production fourragères) et écologique (fixation de l'azote atmosphérique). Ceci, permet aussi de lutter contre la désertification qui touche beaucoup de régions de notre pays.

Références bibliographiques

- [1].- Spaink H. P., 2000.- Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *The Annual Review of Microbiology*, 54: 257-288.
- [2].- Perret X. Staehelin C., Broughton W. J., 2000.- Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 180-201.
- [3].- Young N. D. et Udvardi M. K., 2009 .- Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2):193-201.
- [4].- Penmetsa R. V. et Cook D., 1997.- A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science*, 275:527-530.
- [5].- Singh P., Singh U., Eggum B. O., Kumar K. A., Andrews D. J., 1987.- Nutritional evaluation of high protein genotypes of pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.)

- Leeke). Journal of the Science of Food and Agriculture, 38:41-48.
- [6].- Pareek A., Singla S. L., Grover A., 1997.- Short-term salinity and high temperature stress-associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oryza sativa* L. Annals of Botany, 80: 629-639.
- [7].- Merrill C. R., 1990.- Silver staining of proteins and DNA. Nature, 343: 779-780.
- [8].- Amouri A. A., Fyad Lameche F. Z., Yahia N., 2014.- Early seedling development of *Medicago truncatula* genotypes under salt stress in relationship with seed dry weight and storage protein content. African Journal of Biotechnology, Academic Journals, 13 (2):322-331.
- [9].- Amouri A. A. et Fyad-Lamèche F. Z., 2012.- Comparative analysis of salinity tolerance of the male gametophyte and the sporophyte in *Medicago* at the germination stage. Acta botanica Malacitana, 37:93-102.
- [10].- Gimeno Gilles C., 2009.- Étude cellulaire et moléculaire de la germination chez *Medicago truncatula*. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale. Université d'Angers, 174 p.
- [11].- Bradford M. M., 1976.- A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72:248-54.
- [12].- Prado F. E., Boero C., Gallardo M., Gonzalez J. A., 2000.- Effect of NaCl on germination, growth and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* Willd. Seeds. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 41: 27-34.
- [13].- Zid E. et Grignon C., 1991.- Les tests de sélection précoce pour la résistance des plantes au stress. Cas des stress salin et hydrique. L'Amélioration des Plantes pour l'Adaptation aux Milieux Arides. Ed. AUPELF-UREF, John Libbey Eurotext, Paris: 91-108.
- [14].- Ashraf M. et Harris P. J. C., 2004.- Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. Plant Science, 166: 3-16.
- [15].- Agastian P., Kingsley, S. J., Vivekanandan M., 2000.- Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. Photosynthetica, 38: 287-290.
- [16].- Chourey K., Ramani S., Apte S. K., 2003.- Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cv Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. Journal of Plant Physiology, 160: 1165-1174.
- [17].- Kumar V., Shriram V., Nikam T. D., Jawali N., Shitole M. G., 2009.- Antioxidant enzyme activities and protein profiling under salt stress in *indica* rice genotypes differing in salt tolerance. Archives of Agronomy and Soil Science, 55(4): 379-394.
- [18].- Ingram J. et Bartels D., 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annual Review Plant Molecular Biology, 47: 377-403.

- [19].- Grobei M.A., Qeli E., Brunner E., Rehrauer H., Zhang R., Roschitzki B., Basler K., Ahrens C. H. et Grossniklaus U., 2009.- Deterministic protein inference for shotgun proteomics data provides new insights into Arabidopsis pollen development and function. *Genome Research*, 19:1786-1800.
- [20].- Ben Miled D., Boussaid M., Abdelkefi A., Cherif A., 1986.- Tolérance au sel d'espèces annuelles du genre *Medicago* au cours de la germination. Séminaire international sur les végétaux en milieu aride, 8 au 10 septembre, Jerba., Tunisie, 586- 593.
- [21].- Brunel Muguet S., 2008.- Caractérisation écophysiological de différents génotypes de *Medicago truncatula* au cours des phases de germination et de croissance hétérotrophe. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques. Université d'Angers, 105 p.
- [22].- Kreps J. A., Wu Y. J., Chang H. S., Zhu T., Wang X., Harper J. F., 2002.- Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology*, 130: 2129-2141.