

Effet d'un stress salin sur la germination et l'activité enzymatique chez deux génotypes de *Medicago sativa*

[Effect of salt stress on germination and enzyme activity in two genotypes of *Medicago sativa*]

Ilyess Lachhab, Said Louahlia, Meryem Laamarti, and Khalil Hammani

Laboratoire Environnement Patrimoine et Développement Durable,
Faculté polydisciplinaire de Taza, B.P. 1223, Taza Gare,
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Morocco

Copyright © 2013 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: The arid and semi-arid represent one third of the earth's surface. In these areas, soil salinity and irrigation water is one of the limiting factors for plant productivity and crop yields. These ecosystems are characterized by a high variability of rainfall combined with high evaporation favoring the accumulation of salts in the soil. This affects about 7% of the total area in the world. Germination of *Medicago sativa* is inhibited by 1.5% NaCl (260 mmol/l). Sodium chloride (NaCl) salinity is one of the major environmental factors that limit plant growth and productivity. In this study we tried to determine the effect of salt stress on germination of plants. For this, two alfalfa varieties were studied: Trifecta and Tafilalet that differ in their origins and their behavior to adapt to abiotic stress. Tafilalet ecotype from Morocco and Trifecta is a variety of Australian origin. To select the most tolerant alfalfa genotypes to salinity stress, an experiment was performed with three replications. The cultivar and salinity stress factors comprised two cultivars and three levels of salinity stress (control, 100 and 200 mM) with NaCl, respectively. The all the results obtained showed that two genotypes contrasting for their sensitivity to salt stress exhibit behaviors that may differ in terms of response to salt stress, and indicate that a significant decrease was observed for mean germination in stress conditions.

KEYWORDS: *Medicago sativa*, germination, stress salin, enzymatic activity, Zymography.

RESUME: Les terres arides et semi arides représentent un tiers de la surface du globe. Dans ces zones, la salinité des sols et des eaux d'irrigation est l'un des facteurs limitant de la productivité végétale et du rendement agricole. Ces écosystèmes sont caractérisés par une forte irrégularité des précipitations associées à une importante évaporation favorisant l'accumulation des sels dans le sol. Ce phénomène affecte près de 7% de la surface globale dans le monde. La germination de *Medicago sativa* est inhibée par 1.5% de NaCl (260 mmol/l), le Chlorure de sodium (NaCl) est l'un des principaux facteurs environnementaux qui limitent la croissance des plantes et la productivité. Durant cette étude nous avons essayé de déterminer l'effet du stress salin sur la germination des plantes. Pour cela deux variétés de luzerne ont été étudiées : Trifecta et Tafilalet qui diffèrent par leurs origines et leur comportement d'adaptation au stress abiotique. Tafilalet, écotype originaire du Maroc et Trifecta est une variété d'origine australienne. Pour sélectionner des génotypes de luzerne plus tolérantes à la salinité, une expérience a été réalisée avec trois répétitions. Le facteur de stress de salinité comprenait deux génotypes et trois niveaux de stress de salinité (contrôle, 100 et 200 mM NaCl), respectivement. L'ensemble des résultats obtenus montre que les deux génotypes étudiés pour leur sensibilité contrastée au stress salin présentent des comportements qui peuvent être différents en termes de réponse au stress salin. Ils indiquent aussi qu'une diminution significative a été observée pour la moyenne de germination dans des conditions de stress.

MOTS-CLEFS: *Medicago sativa*, germination, stress salin, activité enzymatique, Zymographie.

1 INTRODUCTION

La luzerne est une des légumineuses fourragères les plus cultivées avec environ 32 millions d'hectares dans le monde en 1990, dont environ 13 millions pour l'Amérique du nord [1]. Comme les autres grandes légumineuses fourragères, la luzerne est une plante essentiellement récoltée après fauche. Elle ne constitue qu'une composante des systèmes fourragers, en complément des prairies et du maïs ensilage en France.

Les cultures fourragères au Maroc occupent environ 455 000 hectares dont 40% en système irrigué. Elles comprennent des espèces annuelles telles que l'avoine, le maïs fourrager, le pois fourrager et l'orge fourrager. Parmi les légumineuses fourragères cultivées au Maroc la luzerne est la plus abondante. Elle occupe 22% de la surface fourragère totale.

Le problème de salinité commence à prendre de l'ampleur dans la majorité des périmètres irrigués au Maroc, en particulier dans les régions arides et présahariennes. Dans ces régions, l'eau d'irrigation est souvent chargée en sel. La production de la luzerne, principale culture fourragère dans ces zones (85 000 ha), est fortement entravée par la salinité. Ce stress induit des déséquilibres nutritionnels qui conduisent dans certains cas à une sélectivité vis-à-vis du potassium pour faire face aux effets néfastes du sodium [2]. Dans d'autres cas, on assiste à une excrétion active du sodium [3].

Par ailleurs, une relation d'antagonisme a été notée entre K^+ et Ca^{2+} et entre Mg^{2+} et Na^+ [4]. Les effets dépressifs de la salinité sur la luzerne affectent également la nodulation, la fixation symbiotique d'azote ainsi que le métabolisme azoté [5].

Un des avantages agronomiques principaux de la luzerne par rapport aux autres plantes fourragères repose essentiellement sur la régularité de sa production, notamment estivale, qui s'explique par l'existence d'un pivot très développé présentant une profondeur d'enracinement pouvant aller jusqu'à plus de 2 mètres.

Le taux élevé de sel dans les sols ou les eaux d'irrigation est une préoccupation environnementale majeure et un problème sérieux pour l'agriculture dans les régions arides et semi-arides, comme le bassin méditerranéen. En effet, l'excès de sel dans le sol affecte la germination, la croissance des plantules et leur vigueur, la phase végétative, la floraison et la fructification à des degrés variables conduisant à terme à des baisses de rendement et de qualité des productions [6], [7]. La tolérance au sel a été beaucoup étudiée chez les halophytes (végétaux adaptés aux milieux hypersalés ou par extension aux milieux à pression osmotique importante), pour comprendre les mécanismes développés pour leur adaptation [8]. La tolérance au sel est un caractère complexe qui fait intervenir un ensemble de mécanismes chez les plantes. Plusieurs auteurs ont suggéré que la tolérance au sel ne peut être obtenue que par une pyramidisation de différents caractères [9].

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Pour déterminer l'effet du stress salin sur la germination des plantes. Pour cela deux variétés de luzerne ont été étudiées : Trifecta et Tafilalet qui diffèrent par leurs origines et leur comportement d'adaptation au stress abiotique. Tafilalet, écotype originaire du Maroc et Trifecta est une variété d'origine australienne.

2.1 CULTURE ET TRAITEMENT DES GRAINES DE LUZERNE

Pour étudier l'effet de la salinité de degré variable sur la capacité de la germination, les semences de luzerne des 2 génotypes Trifecta et Tafilalet ont été mise à germer pendant 48h à 22°C, à l'obscurité. Ceci a été réalisé dans des boîtes de pétri (30graines) contenant trois couches de papier filtre imbibés par l'eau distillée pour les plantes « témoins ». Par contre le traitement « salinité » a consisté à apporter 50, 100 ou 200 mM de NaCl à l'eau distillée. On mesure la longueur des racelles de chaque boîte et 200 mg de chaque échantillon (racelle seulement) a été mis placé dans un réfrigérateur à -4°C.

2.2 EXTRACTION DE PROTÉINES

1 ml du tampon d'extraction de protéines, on ajoute 200mg de l'échantillon et on commence le broyage jusqu'à l'obtention d'un broyat qu'on récupère dans des tubes d'ependorf, et qu'on dépose dans la glace.

On centrifuge les tubes à 12000 tr/min pendant 15 min, puis le surnageant est centrifugé une deuxième fois pendant 10 min à 12000 tr/min. Ce dernier surnageant est récupéré dans d'autres tubes d'ependorf et stocké à -20°C.

2.3 DOSAGE DES PROTEINES PAR LA METHODE DE LOWRY

Pour déterminer la concentration en protéines de chaque échantillon. On fait appel à une courbe d'étalonnage on utilisant des concentrations connues de protéines étalon à doser préalablement établies avec des standards contenant respectivement 0, 5, 10, 25, 40, 50, 75 et 100 µl de BSA (2µg/µl) toujours en ajustant à 100 µl avec de l'eau distillée.

Après, on prépare des tubes à hémolyse contenant 5 µl de chaque échantillon, complété à 90 µl avec le tampon de broyage, on ajoute ensuite 100 µl du réactif alcaline de cuivre. les mélanges sont agités et incubés à température ambiante (témoins + échantillon) pendant 10 min, on ajoute 100 µl du réactif Folin-Ciocalteu, et on agite quelques secondes. Après une deuxième incubation pendant 45 min à température ambiante, on fait une lecture de la DO à 750 nm [10].

2.4 SDS-PAGE EN PRESENCE DE LA GELATINE

La présence des protéases est mesurée par la méthode de zymographie. Le gel est alors incubé 18 heures à +37°C, permettant la dégradation du substrat protéique par les protéinases. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie. Seuls les endroits où le substrat protéique n'a pas été dégradé sont colorés en bleu. Il apparaît donc des bandes blanches indiquant la présence de protéinases. L'intensité de dégradation pour une bande est proportionnelle à la quantité de protéinase présente.

3 RÉSULTAT ET DISCUSSION

Le Tableau 1 représente l'effet de l'application du stress salin sur la germination de la luzerne il représente le nombre de grains germé pour chaque variété en absence de NaCl dans le milieu la germination se déclenche quelque heures après le semis .après 60h la totalité des grains germe chez Tafilalet tandis chez Trifecta le nombre de grain germé augmente à 19 et reste constant même après 90 heures. Une augmentation de la concentration de NaCl à 200 mM inhibe la germination.

Tableau 1 : représente le nombre de grains germé à toutes les concentrations chez les deux variétés et leurs pourcentages germinatifs

	TAFI LALET			TRIFECTA		
	0mM	100 mM	200 Mm	0 mM	100 mM	200 mM
24h	25	2	0	6	0	0
60h	30	25	1	19	11	0
90h	30	26	1	19	11	0
% Germination	100	86,66	3,33	63,33	36,66	0

On peut-on conclure que l'application d'un stress salin retard la germination à des faibles concentrations 100 mM et l'inhibe complètement à des concentrations plus fortes 200 mM.

Le pourcentage germinatif diminue aussi avec l'augmentation du degré de stress et aussi selon la variété, le pourcentage germinatif est plus faible chez Trifecta que chez Tafilalet, cette dernière qui présente une certaine résistance vis-à-vis le stress.

La figure 1 représente les différences de croissance des plantules entre les deux variétés sous différentes concentrations en NaCl. L'analyse de l'effet du stress salin sur la germination des graines par la mesure de la longueur des radicules des plantules de luzerne montre un degré d'inhibition important chez Trifecta.

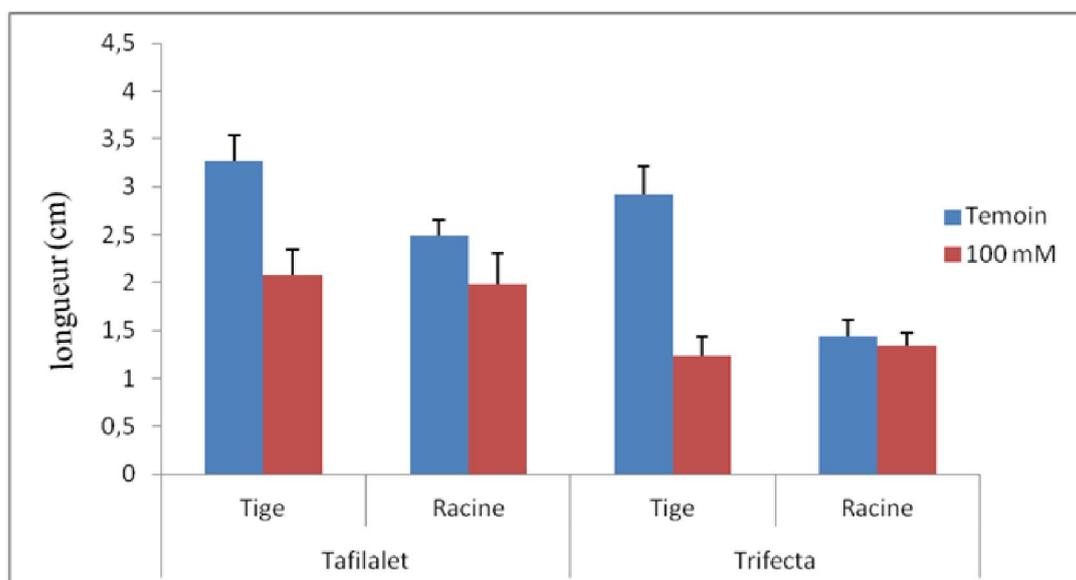


Fig. 1. La croissance de la tige et de la racine à différentes concentrations de NaCl chez Tafilalet et Trifecta

En absence de sel la germination de la variété Tafilalet est plus élevée, L'application de sel a provoqué une chute de germination des deux variétés. L'effet d'un apport de NaCl dans le milieu est plus important chez la variété Trifecta que chez Tafilalet. Par ailleurs et chez les deux variétés, aucune germination des semences n'a été enregistrée quand la concentration en NaCl dans le milieu atteint 200 mM.

D'après les résultats obtenus : après 96h nous pouvons remarquer que les plantules de la variété de Tafilalet représentent une taille de tiges et de racines plus grande que celle de Trifecta.

Ainsi, à 0 mM de NaCl : les deux variétés germent mais la variété Tafilalet présente un pourcentage germinatif et une croissance (de tige et de racine) plus élevée, indiquant des particularités propres pour chaque variété.

D'autres parts, à 100 mM de NaCl : le pourcentage germinatif et la croissance (de tige et de racine) ont diminué chez les deux variétés mais en restant toujours élevé chez la variété Tafilalet par rapport à Trifecta. Ainsi, la variété de Tafilalet semble avoir certaines propriétés lui permettant une meilleure résistance au stress salin.

3.1 SUIVI DE LA GERMINATION EN RECHERCHANT L'ACTIVITE ENZYMATIQUE (PAR ZYMOGRAPHIE) ET LES PROFILS PROTEIQUES (SDS-PAGE)

Pour mieux élucider ce phénomène, une zymographie en présence d'un substrat protéique, la gélatine, sur des extraits des plantules des deux variétés a été réalisée. Les résultats obtenus indiquent l'apparition d'une activité enzymatique intense à 0 mM de NaCl pour les deux variétés, qui diminue à 100 mM et disparaît à 200mM en traitement en NaCl.

Ce résultat montre que la salinité a un effet inhibiteur sur la présence de l'activité des protéases qui seraient impliqué dans le processus de germination de la luzerne (Figure 2).

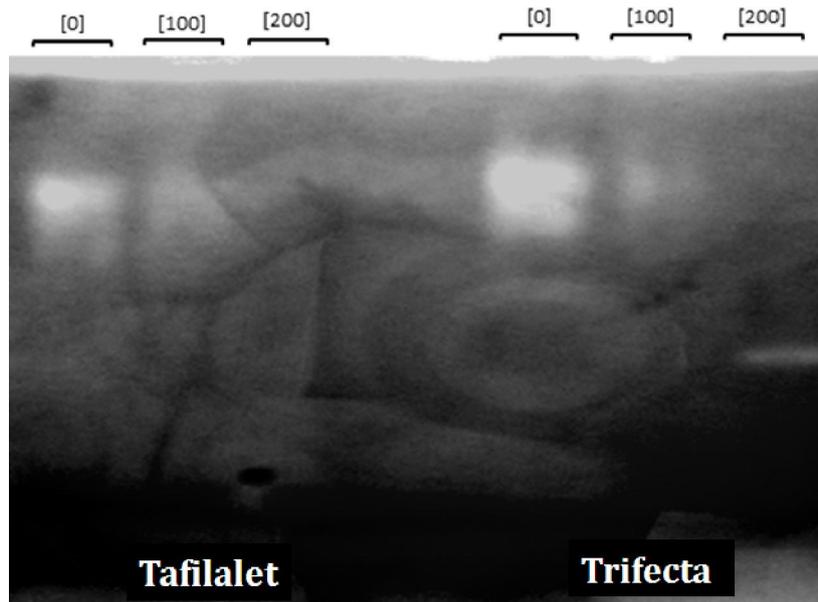


Fig. 2. Analyse zymographique sur gélatine des profils protéasiques des deux variétés de la luzerne (Tafilalt et Trifecta)

Grâce à une électrophorèse des protéines totales, on constate la présence de 5 bandes majoritaires (A, B, C, D et E) qui sont présents chez les deux variétés, ces bandes sont assez faible dans des faibles concentrations de NaCl (0,100) par contre à des concentrations de 200 mM en NaCl, les bandes sont beaucoup plus claires.

Quand nous analysons ces profils protéiques obtenus par électrophorèse sur SDS-PAGE (Figure 3), on constate qu'il y a différentes protéines qui sont exprimées dans la germination des deux variétés. On observe une absence des protéines dans les profils protéiques qui correspondent aux concentrations 0 et 100 mM de NaCl, ce qui indique la présence d'une activité enzymatique « protéases » qui dégrade ces protéines. Ce qui n'est pas le cas pour le profil qui correspond à la concentration de 200 mM. Autrement dit, avec la concentration en sel de 200 mM où il n'y a pas de germination, les protéines restent intactes et ne se dégradent pas ce qui est en corrélation avec les résultats obtenus par zymographie où il n'y a pas d'expression de protéases à cette concentration en sel (figure 3). Par contre avec la germination, on remarque une diminution de bandes protéiques (A à E) en relation l'expression des protéases.

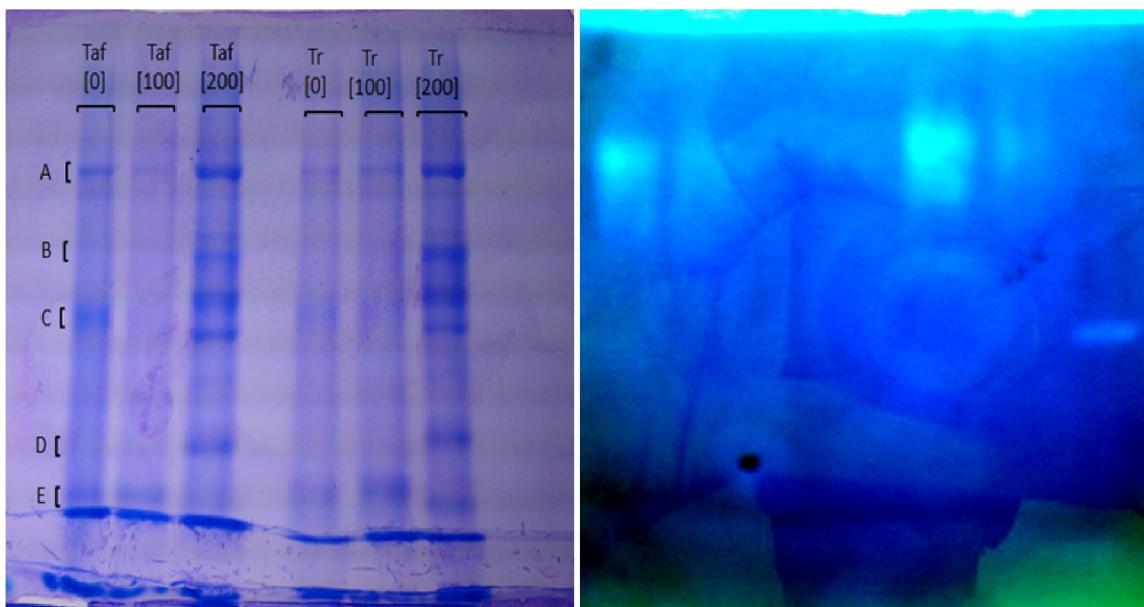


Fig. 3. A gauche, résultat de l'analyse des profils protéiques par électrophorèse sur SDS-PAGE des protéines totales des deux variétés de luzerne comparé aux profils protéasiques obtenus par zymographie (gel de droite)

Par ailleurs, quand on compare les profils protéiques (A à E), principalement pour la condition de non germination (NaCl 200 mM), on remarque quelques différences au niveau des bandes protéiques pour les deux variétés Tafilalt et Trifecta. C'est le cas par exemple des bandes protéiques D et E où l'on remarque le changement dans leurs positions (cas des bandes D) ou une faible expression (cas de la bande E moins exprimée dans la variété Tafilalt que Trifecta). Ces différences peuvent correspondre aux caractéristiques de chaque variété.

4 CONCLUSION

L'ensemble des données obtenues montre que les deux génotypes étudiés pour leur sensibilité contrastée au stress salin présentent des comportements qui peuvent être différents en termes de réponse au stress salin et les semences de Tafilalt et Trifecta ont des degrés de sensibilités différents à la salinité dans le milieu.

L'effet de la salinité sur la croissance de la tige et de la racine varie en fonction de la variété, la concentration de NaCl dans le milieu, et la durée du traitement. Donc la salinité provoque une inhibition de l'activité et de l'expression des protéases qui semblent être nécessaires pour la germination. Et la variété de Tafilalet présente plus de résistance envers le stress que celle de Trifecta.

REFERENCES

- [1] Mauriès, M., "Design Module de production et gestion du système fourrager," *Cahier luzerne*, C.E.E, 1998.
- [2] El mekkaoui M., "Etude des caractères physiologiques d'adaptation à la salinité chez trois céréales : le blé dur (*Triticum durum* Desf.), l'orge (*Hordeum vulgare* L.) et le triticales (*T.durum* x *Secale cereale*)," *Thèse Doct. I.A.V. Hassan II, Rabat, Maroc*, 1992.
- [3] Dione E., "Contribution à l'étude des effets de NaCl sur la germination, la croissance et le développement des hibiscus textiles: Kenaf (*H.canabinus*L.), Roselle (*H.sabdarifa* L.var.*altissima*) et du cotonnier (*Gossypium hivistum*)," *Diplôme d'agronomie approfondie, ENSAM, 68P*, 1988.
- [4] Soltani A., Hajji M., Grignon C., "Recherche de facteurs limitant la nutrition minérale de l'orge en milieu salé," *Agronomie*, vol. 10, pp. 857-866, 1990.
- [5] Jebara M., Drevon J.J., Aouani M.E., "Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and natives rhizobia from Tunisian soils," *Agronomie*, 21: pp. 601-605, 2001.
- [6] Delgado M.J., Ligerio F. Lluch C., "Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants," *International Soil Biol. Biochem*, vol. 26, pp. 371-376, 1994.
- [7] Cordovilla M.P., Ocana A., Ligerio F. Luch C., "Salinity effects on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes-Rhizobium symbiosis," vol. 18, pp. 1595-1609, 1995.
- [8] Munns, R., "Comparative physiology of salt and water stress," *Plant Cell Environ.*, vol. 25, pp. 239-250, 2002.
- [9] Mainassara. Z, Bouaziz S., Boulbaba L., Mohamed H., "Paramètres agronomiques liés à la tolérance au sel chez le haricot (*Phaseolus vulgaris* L.)," *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, pp. 113-119, 2009.
- [10] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J., "Protein measurement with the Folin phenol reagent," *J biol chem*, 193(1), pp. 265-275, 1951.