

Analyse moléculaire de deux génotypes de *Medicago truncatula* Gaertn. par le marqueur de séquence exprimée EST-SSR (MTIC 124) en réponse à la salinité

[Molecular analysis of two genotypes of *Medicago truncatula* Gaertn. by the expressed sequence tag EST-SSR (MTIC 124) in response to salinity]

Adel Amar AMOURI and Seghir HADJADJ AOUL

Laboratoire d'écologie végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la nature et de la vie,
BP1524, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algeria

Copyright © 2016 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: In this study, we used the expressed sequence EST-SSR marker (MTIC124) to show genetic variation and determine a potential link between this marker and salt stress tolerance on two contrasting *Medicago truncatula* Gaertn. genotypes (Tru 131 tolerant genotype, and Jemalong, sensitive one). The amplification of the DNA isolated from 10 individual seedlings for each genotype with the EST- SSR primers (MTIC 124) produced a total of 20 amplified products. The sizes of the alleles detected ranged from 100 to 280 bp. The analysis of polymorphism locus showed that the tolerant genotype (Tru 131) population had two alleles, genetic diversity index of 0.32 and PIC value of 0.267. The results obtained from UniGene and Uniprot databases of highly similarity proteins sequences with the EST- SSR locus MTIC 124, showed that this locus encode cysteine proteinase inhibitor and was expressed principally in root of *M.truncatula*. This data suggest that this locus is involved in salinity tolerance and it is appropriate for studying and understanding salt stress tolerance mechanisms in *Medicago truncatula* Gaertn.

KEYWORDS: *Medicago truncatula* Gaertn., salt stress, molecular marker, molecular databases.

RESUME: Dans cette étude, nous avons utilisé le marqueur de séquence exprimée EST-SSR (MTIC 124) pour évaluer la variabilité génétique et déterminer la relation potentielle entre ce marqueur et la tolérance au stress salin, de deux génotypes contrastés de *Medicago truncatula* Gaertn. (Tru 131, tolérant & Jemalong, sensible). L'amplification de l'ADN isolé à partir de 10 individus de jeunes plants de chaque génotype avec les amorces d'EST-SSR (MTIC124) a produit un total de 20 amplicons. La taille des allèles détectée, varie de 100 à 280 pb. L'analyse du polymorphisme de ce locus a montré que les population du génotype Tru 131 a deux allèles, une diversité génétique de 0.32 et un PIC de 0.267. Les résultats obtenus à partir des bases de données Unigene et Uniprot sur les séquence protéiques hautement similaires avec le locus EST-SSR (MTIC 124), ont montré que ce locus code pour l'inhibiteur de la cystéine protéinase, qui est exprimée principalement au niveau des racines. Cette information suggère que ce locus est impliqué dans l'adaptation à la salinité, et il est adéquat pour l'étude et la compréhension des mécanismes de tolérance au stress salin chez *Medicago truncatula* Gaertn.

MOTS-CLEFS: *Medicago truncatula* Gaertn., stress salin, marqueur moléculaire, bases de données moléculaires

1 INTRODUCTION

Medicago truncatula Gaertn est largement utilisé comme une légumineuse modèle pour la compréhension des stress abiotiques [1]. Cette légumineuse est très intéressante pour l'agriculture durable et l'écologie. Le stress salin est un stress

abiotique important qui affecte significativement la croissance des légumineuses et réduit la production agricole dans le monde. Les étiquettes de séquences exprimées de microsatellites (EST-SSRs) sont des ressources importantes pour l'investigation de la diversité génétique et sont des marqueurs utiles pour des applications divers en génétique et amélioration des plantes, car ces marqueurs montrent une variation dans la partie exprimée dans le génome. Les amorces EST-SSR sont moins polymorphes comparés avec les SSRs génomiques dans la production végétale à cause de la grande conservation des séquences d'ADN dans les régions transcrites [2]. Un intérêt porte actuellement, sur les enzymes comme les protéinases (cystéine protéinase) qui sont impliquées dans plusieurs voies de dégradation des protéines. Leurs action peut être inhibées par les inhibiteurs de la cystéine protéinase ou appelées aussi la superfamille des cystatins. Certaines enzymes comme la cystéine protéinase sont affectés par les stress abiotiques chez les plantes [3]. L'expression des gènes codant les inhibiteurs des protéinases (cystéine protéinase) est généralement limitée à des organes spécifiques ou à des phases particulières durant le développement de la plante, comme le stade germination [4], le vieillissement précoce des feuilles [5], le déficit hydrique (sécheresse), ou le froid et la salinité [6]. Les information sont très limitées concernant ces inhibiteurs chez les plantes et spécifiquement chez la légumineuse *Medicago truncatula* Gaertn, en relation avec la salinité.

Le but de cette étude est d'évaluer, en premier lieu, le degré du polymorphisme du marqueur de séquence exprimé EST-SSR (MTIC 124) chez les deux génotypes contrastés de *Medicago truncatula* Gaertn au stress salin (Tru 131, tolérant et Jemalong, sensible). En deuxième lieu, c'est de rechercher les similitudes (similarités) de séquence avec celles du locus étudié en utilisant les bases de données moléculaires Unigene et Uniprot, et par conséquent, déterminer les protéines exprimées par ce locus.

2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL

Pour la caractérisation moléculaire utilisant le marqueur EST SSR (MTIC 124), nous avons utilisés dans cette étude les graines de deux génotypes contrastés au stress salin, Tru 131(Tolérant) fournies par l'institut IDGC de Sidi Belabbès et Jemalong (sensible) qui le génotype de référence [7, 8],

2.2 MÉTHODES

2.2.1 EXTRACTION D'ADN ET AMPLIFICATION PAR PCR

L'ADN génomique est extrait pour chaque génotype, à partir de jeunes plants obtenus après 7 jours de germination (10 graines par génotype). L'ADN est isolé en utilisant la méthode CTAB adaptée par Udupa *et al* (1999). Le locus EST-SSR (MTIC 124) localisé sur le chromosome 3 (LG 3) (Tab 1), a été choisi à partir d'une série de microsatellites de *Medicago truncatula* développée par Journet *et al* (2001).

Ils sont disponibles sur la base de donnée « GenBank EST / <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/> ».

L'amplification de l'ADN génomique a été faite selon la méthode Udupa *et al* (1999) dans un milieu réactionnel pour PCR de 10 µl contenant 50 ng d'échantillon d'ADN, tampon PCR 1x, 0.2 mM dNTPs, 10 pmole pour chaque amorce et 1 unité de la Taq polymérase. Le profil d'amplification comprend une période initiale de la dénaturation de l'ADN et l'activation de la Taq polymérase à 94°C pendant 2mn, suivie par 35 cycles à 94°C durant 30 s, une hybridation à 55°C durant 30 s, et une élongation à 72°C durant 45 s. L'extension finale est faite à 72°C durant 7 mn avant un refroidissement à 4°C. Les produits PCR sont analysés en gel à 6% de polyacrylamide dénaturant. Après électrophorèse, les bandes d'ADN sont colorées au bromure d'éthidium (BET) et visualisées sous UV.

2.2.2 ANALYSE DES DONNEES ET RECHERCHE DE SIMILITUDES DE SEQUENCES AU LOCUS EST-SSR (MTIC 124)

Pour le locus étudié, la composition en allèles SSR est déterminé pour chaque génotype. Les valeurs du contenu d'information sur le polymorphisme (PIC) sont calculées selon la formule suivante : $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$ où P_{ij} est la fréquence de l'allèle i révélée utilisant l'amorce j [11]. La diversité génétique pour chaque locus est calculé comme suit : $H_i = 1 - \sum P_i^2$ où H_i est l'index de la variation génétique et P_i est la fréquence d'allèle pour chaque locus [12].

Pour déterminer les séquences (hautement) similaires avec le locus EST-SSR (MTIC 124), nous avons utilisé les bases de données moléculaires UniGene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/>) et Uniprot (<http://www.uniprot.org/uniprot/>), afin d'en déduire la fonction principale des séquences protéiques exprimé par ce locus EST-SSR.

3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 POLYMORPHISME GENETIQUE CHEZ *MEDICAGO TRUNCATULA* GAERTN

Le marqueur EST- SSR (MTIC 124) a été utilisé pour analyser le degré du polymorphisme génétique avec les deux génotypes contrastés au stress salin de *Medicago truncatula* (Tru 131, tolérant et *Jemalong*, sensible). L'amplification d'ADN isolé à partir de 10 individus de jeunes plants pour chaque génotype a produit au total 20 amplicons (Fig 1). La taille des allèles détectés va de 100 à 280 pb. Le locus étudié est modérément polymorphe avec un index de diversité génétique (H_i) qui est de 0.32 et un PIC de 0.267 au sein de l'espèce *M. truncatula* (Tab 2).

3.2 RECHERCHE DE SIMILITUDE DE SEQUENCE ET PREDICTION DE FONCTION DU LOCUS EST-SSR UTILISE

Les résultats obtenus à partir de la base de donnée « UniGene » concernant les séquences protéiques hautement similaires pour le locus EST-SSR (MTIC124), a montré que ce dernier code pour l'inhibiteur de l'enzyme « cystéine protéinase », qui est exprimé principalement dans les racines de l'espèce *M. truncatula* (Tabl 2). La principale fonction de ce locus a été obtenu à partir de la base de donnée « Uniprot ». Les cystéines protéinases sont connues pour jouer un rôle essentiel dans la croissance des plantes mais aussi dans l'accumulation des protéines de réserves et dans la réponse au stress biotique et abiotiques [3]. Leur action peut être inhibées par les inhibiteurs de la protéinase qui sont induites par les stress abiotiques. Koizumi *et al* (1993), ont noté que les clones rd19 et rd21 codants différentes enzymes de cystéine protéinase chez *Arabidopsis thaliana* sont induits par un déficit hydrique sinon à un stress salin. Plusieurs études suggèrent que les « cystatins » réagissent aux stress abiotiques comme la sécheresse, la salinité, le froid et le traitement par l'acide abscisique [14, 15]. Toutefois, elles ont été détectées dans les tissus végétatifs, y compris les racines et les feuilles [16, 17]. Chez *Arabidopsis thaliana*, deux inhibiteurs de la cystéine protéinase « cystatins » désignés par AtCYSa et AtCYSb ont été caractérisés. L'analyse par la technique de Northern blot montre que l'expression de ces deux gènes codant les « cystatins » dans les cellules embryonnaires et les jeunes plants, est induite systématiquement par divers stress abiotiques [18]. Les résultats obtenus dans notre étude, suggèrent que le locus EST-SSR (MTIC 124) est fortement impliqué dans l'expression des gènes codants les inhibiteurs de la cystéine protéinase.

Tableau 1. Information sur le marqueur EST –SSR utilisé dans l'analyse moléculaire des deux génotypes contrastés de *M. truncatula*

EST SSR	LG	Amorces sens (F) et réverse (R) (5' → 3')	Motif de répétition	Température d'hybridation PCR	GenBank EST	Références
MTIC 124	3	F : TGTCACGAGTGTTGGAATTTT R : TGGGTTGTCAATAATGCTCA	[TG]7	55 C °	MtBC32B02R1 MtBC <i>Medicago truncatula</i> cDNA clone MtBC32B02T7, mRNA sequence	Journet <i>et al</i> , 2001. <i>Medicago truncatula</i> ESTs from endomycorrhizal racines (roots)

Tableau 2. Résultats sur les séquences hautement similaires avec le locus EST-SSR (MTIC 124) de *M. truncatula* via les bases de données UniGene et Uniprot

Génotypes de <i>M. truncatula</i>	EST SSR	S.Z	N.A	N.G	H_i	PIC	Similarités de protéines sélectionnées	Identité	G.A	R.E
Tru 131 (T)	MTIC 124	10	2	2	0.32	0.26	Cysteine proteinase inhibitor (MTR_3g043750) mRNA, complete cds	100 %	XP_003599710.1	Racines (root)
<i>Jemalong</i> (S)										

T : Tolérant. S : Sensible. S.Z: Taille de l'échantillon N.A: Nombre d'allèles. N.G: Nombre de génotypes.

G.A: Numéro d'accension à "Gene bank". R.E: Expression restreinte. PIC: Contenu en polymorphisme. H_i : diversité génétique. Hautement informatif : (PIC > 0.50), Modérément informatif : (0.25 < PIC < 0.50) et faiblement informatif : (PIC < 0.25), non informatif : (PIC = 0).

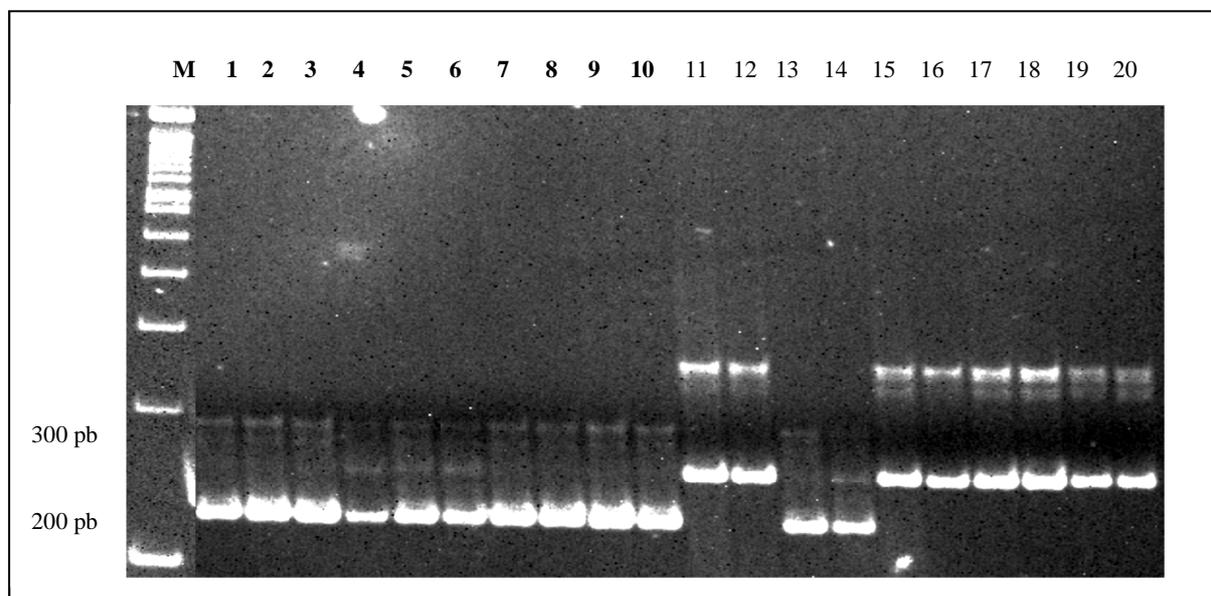


Figure 1.- Profils du marqueur EST-SSR des deux génotypes contrastés au stress salin de *M. truncatula* [Jemalong 'sensible' : 1.....10] et [Tru 131 'tolérant' : 11.....20] généré par l'amorce MTIC 124.
M : Marqueur de poids moléculaire

4 CONCLUSION

A partir de l'analyse des résultats obtenus, nous proposons que le marqueur polymorphe de gènes exprimés EST-SSR (MTIC 124) approprié pour l'étude de la tolérance au stress salin chez la plante *Medicago truncatula* Gaertn. Les résultats de recherche in silico de similitude de séquence via les bases de données moléculaires (Unigene et Uniprot), nous ont permis de déterminer des similarités de fonction avec les inhibiteurs de la cystéine protéinase « cystatins », exprimé par le locus EST-SSR étudié. Beaucoup d'études montrent que ces types d'enzymes sont impliqués dans la tolérance au stress salin. L'étude au niveau racinaire du transcriptome chez cette légumineuse, donnera sans doute plus d'informations sur la compréhension de l'expression des gènes impliqués dans la tolérance à la salinité.

REMERCIEMENTS

Nous Remercions Madame la Professeure Fyad Lamèche F-Z de l'université d'Oran 1 pour l'octroi du matériel végétal nécessaire pour cette étude. Notre grande gratitude à Dr. Sripada M. Udupa de l'ICARDA-INRA-Rabat au Maroc, pour m'avoir permis d'effectuer l'expérimentation moléculaire au sein de son laboratoire.

REFERENCES

- [1] Young N. D. et Udvardi M. K., 2009.- Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(2):193-201.
- [2] Scott K. Egger P., Seaton G. Rossetto M., Ablet E. Lee L., Henry R., 2000.- Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 100 (5):723–726. DOI: 10.1007/s001220051344.
- [3] Grudkowska M. et Zagdanska B., 2004.- Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta biochimica Polonica*, 51(3): 609-624.
- [4] Botella M. A., Xu Y., Prabhe T. N., Zhao Y., Narasimhan M. L., Wilson K. A., Nielsen S. S., Bressau R. A, Hasegawa P. M., 1996.- Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. *Plant Physiology*, 112: 1201–10.
- [5] Huang Y. J., To K. Y., Yap M. N., Chiang W. J., Suen D. F., Chen S.C.G., 2001.- Cloning and characterization of leaf senescence up-regulated genes in sweet potato. *Physiologia Plantarum*, 113: 384–391.

- [6] Van der Vyver C., Schneidereit J., Driscoll S., Turner J., Kunert K., Foyer C.H., 2003.- Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional growth phenotype and enhances chilling tolerance. *Plant Biotechnology Journal*, 1: 101-112.
- [7] 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.
- [8] Amouri A. A., Fyad Lameche F. Z., Karkachi N, Variabilité de la tolérance au stress salin chez deux géotypes contrastés d'une légumineuse de *Medicago truncatula* au stade germination. *Algerian journal of arid environment*, 5 : 17-25, 2015
- [9] Udupa SM, Robertson L. D., Weigand F., Baum M., Kahl G, Allelic Variation at (TAA) Microsatellite Loci in a World Collection of Chickpea (*Cicer arietinum* L) Germplasm. *Molecular Genetics and Genomics*, 261: 354-363, 1999
- [10] Journet E. P., El Gachtouli N., Vernoud V., de Billy F., Pichon M., Dedieu A., Arnould C., Morandi D., Barker DG., Gianinazzi-Pearson V, *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 737-748, 2001
- [11] Anderson J. A., Churchill G. A., Autrique J. E., Tanksley S. D., Sorrells M. E, Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36 (1): 181-186, 1993
- [12] Nei M, Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70: 3321-3323, 1973
- [13] Koizumi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Tsuji H., Shinozaki K, Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 129: 175-82, 1993
- [14] Gaddour K., Vicente-Carbojosa J., Lara P., Isabel-Lamoneda I., Diaz I., Carbonero P, A constitutive cystatin-encoding gene from barley (Icy) responds differentially to abiotic stimuli. *Plant Molecular Biology*. 45: 599-608, 2001. DOI: 10.1023/A:1010697204686.
- [15] Diop N. N., Kidric M., Repellin A., Gareil M., d'Arcy-Lameta A., Pham Thi A.T., Zuily-Fodil Y, Amulticystatin is induced by drought-stress in cow-pea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. *FEBS Letters*, 577: 545-550, 2004
- [16] Lim C. O., Lee S. I., Chung W. S., Park S. H., Hwang I., Cho M. J, Characterization of a cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds. *Plant Molecular Biology*, 30: 373-379, 1996.
- [17] Pernas M., Sanchez-Monge R., Salcedo G, Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut, *FEBS Letters*, 467: 206-210, 2000.
- [18] Zhang X., Liu S., Takano T, Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance. *Plant Molecular Biology*, 68 :131-143, 2008.