

ETUDE COMPAREE DE LA TOLERANCE AU CHLORURE DE SODIUM
DE QUELQUES ESPECES ANNUELLES DU GENRE Medicago L.

Par AÛcha REFOUFI
Laboratoire d'Eco-génétique
I.N.S., U.S.T.H.B.

R E S U M E

Des expériences de tolérance au chlorure de sodium sont réalisées sur de jeunes plantes de six espèces annuelles de Medicago. Des résultats obtenus, il ressort clairement que les Medicago sont à placer parmi les plantes tolérantes. Cette tolérance est appréhendée à travers différentes réponses métaboliques. La plupart des espèces sont "inclusives" vis à vis de l'ion sodium et présentent une bonne affinité pour le potassium. Parmi les substances organiques dites "osmotiquement actives" accumulées en réponse à la salinité, la proline sous forme libre, apparait comme le régulateur osmotique principal.

I N T R O D U C T I O N

Le genre Medicago L. regroupe une centaine d'espèces dont une vingtaine, typiquement méditerranéennes, existent à l'état spontané en Algérie. Comme légumineuses, leur intérêt agronomique est connu depuis longtemps. En effet, les espèces de ce genre, en particulier l'espèce M. sativa, peuvent fournir un fourrage abondant riche en protéines. Parmi d'autres avantages que présentent les espèces de Medicago (les Luzernes), on peut citer l'amélioration de la fertilité des

sols grâce à leur association symbiotique avec *Rhizobium meliloti*, bactérie fixatrice d'azote atmosphérique. De plus, par leur aptitude à la régénération naturelle elles maintiennent un couvert végétal continu. Par ailleurs, leur système racinaire bien développé favorise la conservation du sol et assure une production de matière organique importante.

Au cours de ces dernières décennies, ces propriétés ont trouvé des applications agronomiques notamment dans la pratique des assolements légumineuses-céréales.

Le problème de la tolérance au sel chez les Luzernes annuelles est important à prendre en compte puisque leur distribution dans la nature semble surtout liée aux conditions édaphiques et en particulier à la teneur en sodium du sol (ADEM, 1974; ABDELGUERFI, 1976, 1978).

Dans le cadre de ce travail, la tolérance au chlorure de sodium de six espèces de *Medicago* est étudiée. Cette tolérance est évaluée en termes de croissance et de réponses métaboliques au niveau de quelques composés organiques particuliers comme la proline et les bétaines (composés à groupement ammonium quaternaire). Les taux d'accumulation du sodium et du potassium sont également pris en compte.

MATERIEL ET METHODES

1. ESPECES ETUDIEES ET ORIGINE DES SEMENCES

L'étude porte sur des espèces annuelles du genre *Medicago*. Onze populations appartenant à six espèces différentes ont été étudiées. (Tableau I).

TABLEAU I: Espèces et populations de *Medicago* retenues pour l'étude.

Les populations qui portent pour origine I.D.G.C. (Institut de Développement des Grandes Cultures) ont été obtenues par des cultures réalisées à El-Harrach.

ESPECES	POPULATIONS (Code)	ORIGINE
<i>M. ciliaris</i> All.	M.ci/14	Khemis Miliana Bouzedjar
	M.ci/16	
<i>M. orbicularis</i> (L)Bart.	M.or/13	Khemis Miliana
<i>M. scutellata</i> (L)Mill.	M.sc/41	I.D.G.C.
<i>M. aculeata</i> Gaertn.	M.ac/51	I.D.G.C.
	M.ac/58	
<i>M. truncatula</i> Gaertn.	M.tr/23	I.D.G.C.
	M.tr/30	
	M.tr/32	
<i>M. polymorpha</i> L.	M.po/5	I.D.G.C.
	M.po/17	

Le tableau I montre que *M. ciliaris* et *M. orbicularis* proviennent de récoltes effectuées dans l'Ouest de l'Algérie. Ce sont des récoltes personnelles effectuées en Mai 1984. Par ailleurs, nous avons fait appel à la collection importante existant à l'I.D.G.C. Les graines de quatre espèces et de plusieurs populations nous ont été fournies par cet institut.

2. MISE EN CULTURE

Au laboratoire les cultures sont réalisées dans une salle climatisée. Pour les expériences de contraintes salines, les plantules (stades première feuille unifoliolée pour la première expérience et première feuille trifoliolée pour la deuxième expérience) sont placées dans un milieu de Hoagland (HOAGLAND et ARNON, 1938) additionné de chlorure de sodium de façon à obtenir des milieux de concentrations finales de 100 , 200 et 300 mM en NaCl. Le lot témoin est mis sur milieu minéral dépourvu de sel.

3. METHODE D'EXTRACTION

Le matériel foliaire sec est broyé au mortier préalablement refroidi, en présence de sable de Fontaine bleu. Il est ensuite trituré dans 5 ml d'éthanol à 80⁰ GL. Le broyat ainsi obtenu est soumis à quatre extractions successives. Chaque extraction est suivie d'une centrifugation à froid (à 4 500 t./mn). L'extrait hydroalcoolique ainsi obtenu est évaporé à sec à une température de 37⁰C et sous vide à l'évaporateur rotatif. Le résidu est repris dans 1 ml d'eau distillée. L'extrait sera utilisé pour les analyses quantitatives de la proline, des bétaines (C.G.A.Q.) ainsi que de certains éléments minéraux (Sodium, Potassium).

4. ANALYSES QUANTITATIVES

- Pour les C.G.A.Q., les dosages sont réalisés selon la méthode de STOREY et WYN JONES (1977).
- La proline libre est dosée par la méthode de TROLL et LINDSLEY (1955).

- Les ions sodium et potassium sont dosés directement dans les extraits dilués à l'eau distillée. Ils sont déterminés par photométrie de flamme.

R E S U L T A T S

1. EXPERIENCE 1

Dans une première expérience de 48 heures, les plantules traitées à NaCl à 100 mM ne reflétaient aucune perturbation majeure dans leur croissance et leur développement.

1.1. COMPOSITION ORGANIQUE

Les déterminations des teneurs en proline libre et en bétaines sont effectuées dans les extraits de plantules entières (Tableau II).

Les plantules des différentes populations accumulent des quantités importantes de proline sous forme libre lorsqu'elles sont placées en présence de NaCl à 100 mM. Comparées à celles des témoins, les teneurs sont parfois très élevées comme c'est le cas des échantillons de *M. polymorpha* (M.po/5; M.po/17), *M. truncatula* (M.tr/30) et *M. orbicularis* (M.or/13).

Pour ce qui est des teneurs en bétaines, la réponse du végétal diffère. Les valeurs regroupées dans le tableau II montrent qu'en général, les teneurs en bétaines ne sont que peu modifiées par le traitement. Toutefois, les teneurs semblent varier sous l'action du sel pour une population de *M. polymorpha* (M.po/5) et une de *M. ciliaris* (M.ci/16).

TABLEAU II: Teneurs en proline libre et en bétaines des jeunes plantes de *Medicago* traitées ou non avec NaCl 100 mM. (Durée de traitement: 48 heures).

POPULATION	CONCENTRATION EN NaCl DU MILIEU EN mM	PROLINE LIBRE umoles/g M.S.	BETAINES umoles. G.B/g M.S.
M.sc/41	0	9,4	36
	100	12,6	44
M.ac/51	0	9,3	48
	100	18,2	50
M.ac/58	0	17,2	53
	100	26,5	39
M.po/5	0	0,6	29
	100	25,6	49
M.po/17	0	0,4	27
	100	13,6	22
M.tr/23	0	5,1	60
	100	13,8	56
M.tr/30	0	0,6	59
	100	31,8	41
M.tr/32	0	3,4	62
	100	37,4	47
M.or/13	0	0,9	59
	100	14,0	30
M.ci/14	0	1,3	189
	100	6,9	179
M.ci/16	0	0,3	152
	100	6,4	178

1.2. COMPOSITION MINERALE

Généralement l'accumulation nette du sodium se fait au détriment du potassium dont les teneurs régressent dans les plantes traitées par NaCl. La figure 1 présente les teneurs en Na^+ et K^+ des plantes entières traitées ou non avec NaCl. Dans tous les cas étudiés on note une forte accumulation de Na^+ . Celui-ci est présent en quantités infimes dans les plantules témoins. Dans celles que l'on a traitées pendant 48 heures, les teneurs en ions sodium sont élevées. Mais son accumulation est plus ou moins rapide selon les espèces.

Un classement des espèces traitées, réalisé selon leur aptitude à accumuler du Na en 48 heures donne le résultat suivant:

M. truncatula (M.tr/32)(M.tr/30) > M. aculeata (M.ac/58) >
M. ciliaris (M.ci/14), > M. polymorpha (M.po/5) >, M. po-
lymorpha (M.po/5) > M. truncatula (M.tr/23) > M. aculeata
(M.ac/51) > M. polymorpha (M.po/17) > M. orbicularis (M.or/13),
M. ciliaris (M.ci/16) > M. scutellata (M.sc/41).

L'évolution de la teneur en potassium est différente (Fig. 1). Certaines espèces arrivent à maintenir la teneur en K^+ dans les plantules traitées à un niveau semblable à celui des plantes témoins. C'est le cas des espèces M.tr/23; M.tr/30, M.po/5 et M.ci/14. D'autres espèces présentent une diminution plus ou moins importante du contenu en K^+ dans les échantillons traités (M.ac/58, M.tr/32, M.po/17 et M.ci/16).

Malgré des différences significatives, en général on note que la quantité de Na^+ accumulée excède en fin d'expérience la quantité de K^+ stockée dans les mêmes conditions.

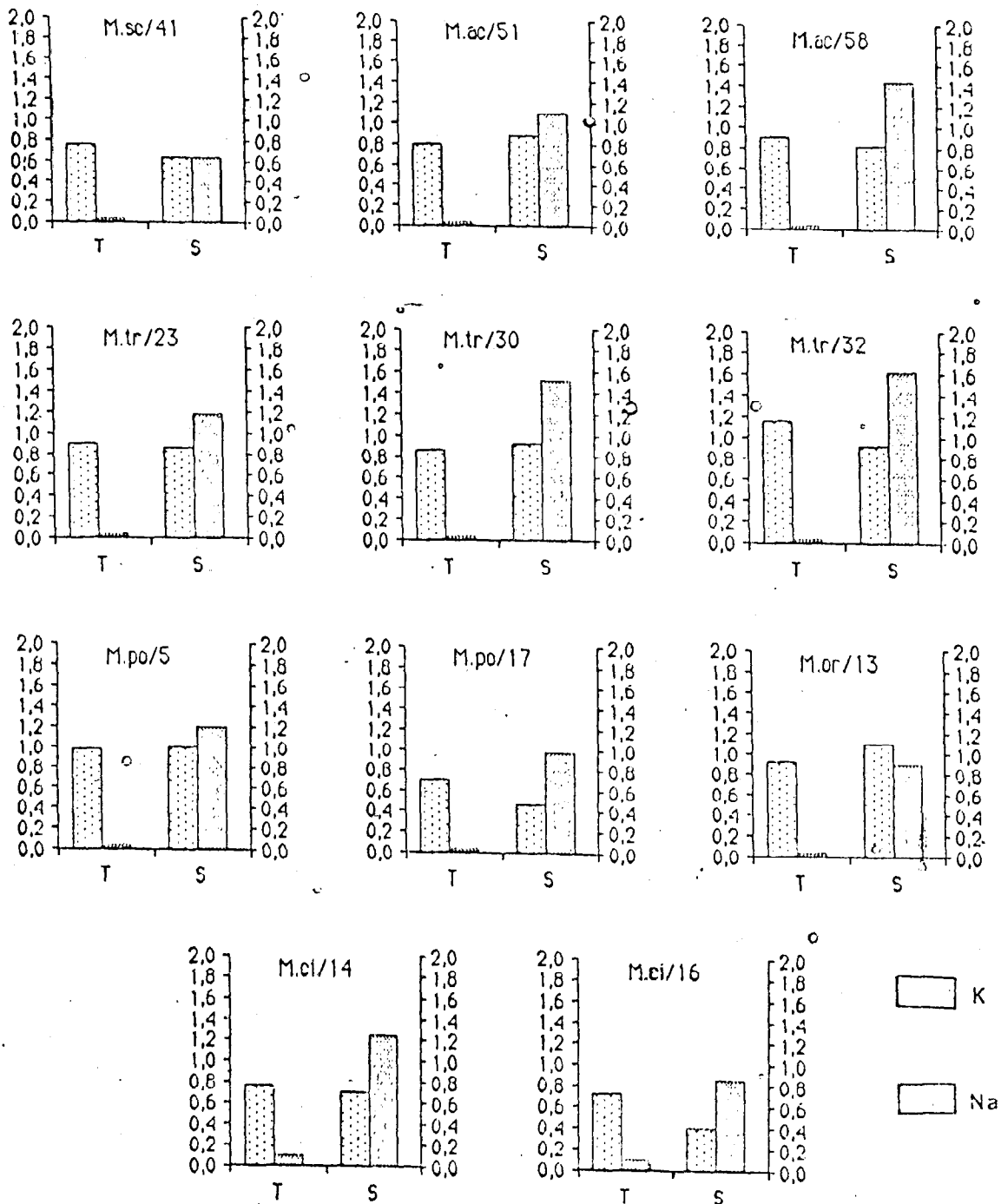


Figure 1 : Teneurs en sodium et potassium des plantules de Medicago traitées ou non à l'aide de NaCl 100 mM .

Durée du traitement : 48 heures .

Les résultats sont exprimés en $\text{meq} \cdot \text{g}^{-1}$ M.S.(matière sèche)

(T): Témoin ; (S) : Traité à NaCl .

Cependant les espèces qui se distinguent sont *M. scutellata* pour qui les teneurs en Na^+ et K^+ sont presque égales et *M. orbicularis* qui a une teneur en K^+ légèrement plus élevée que celle du Na^+ .

2. EXPERIENCE 2

Dans une deuxième expérience d'une durée de 96 heures, les concentrations en sel varient de 0 à 300 mM. Trois espèces ont été retenues sur la base de leur aptitude à stocker de la proline libre, leur capacité d'accumuler le Na^+ et de leur comportement vis à vis du K^+ .

Il s'agit des espèces *M. truncatula* (M.tr/30), *M. polymorpha* (M.po/5) et *M. scutellata* (M.sc/41).

2.1. COMPOSITION ORGANIQUE

La proline libre est dosée dans les plantules des trois espèces de *Medicago* stressées ou non après 96 heures de traitement (Fig. 2). Celle-ci présente à l'état de traces sur milieu Hoagland, s'accumule dans les plantules cultivées sur NaCl jusqu'à 300 mM pour les espèces *M. scutellata* et *M. truncatula*. Pour *M. polymorpha*, on note une diminution de la vitesse d'accumulation de la proline entre 100 et 200 mM.

Pour ce qui est des teneurs en bétaines (Fig.3), les évolutions diffèrent de celles notées pour la proline. Celles-ci semblent peu modifiées par le traitement.

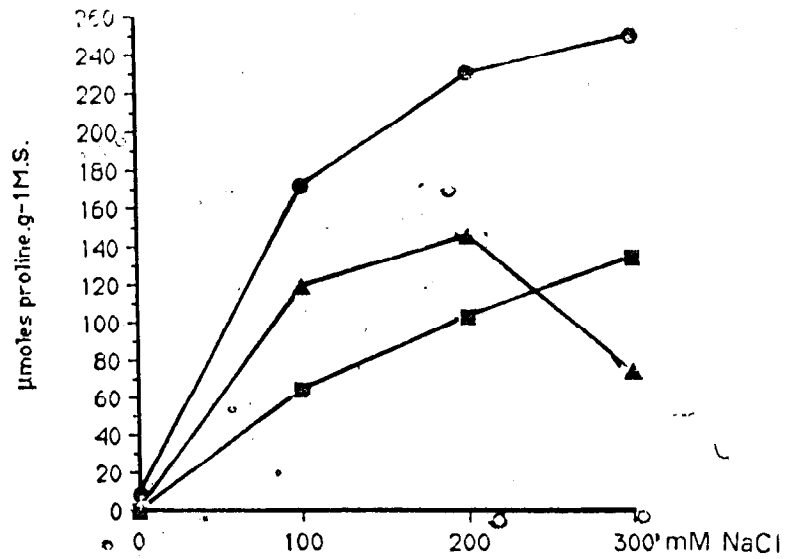


Figure 2 : Teneurs en proline libre des plantules entières de Medicago traitées à concentrations croissantes en NaCl après 96 heures de traitement .

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{moles de proline.g}^{-1}\text{M.S.}$

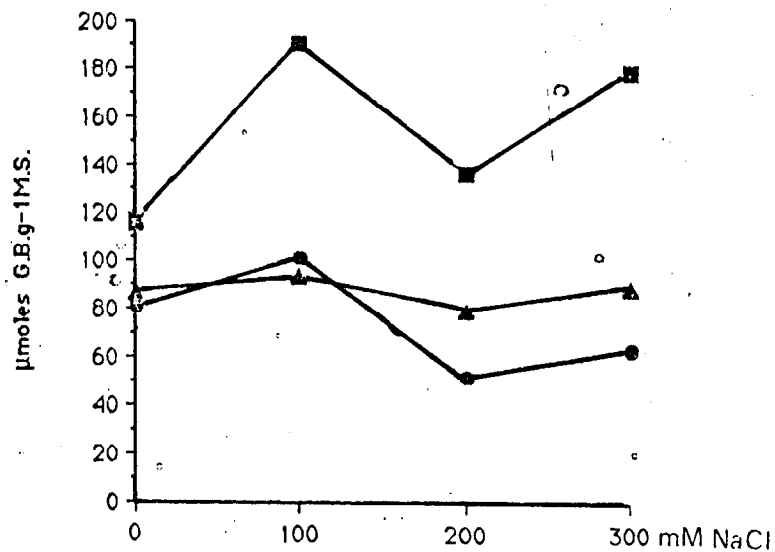


Figure 3 : Teneurs en bétaines (C.G.A.Q.) des plantules entières de Medicago traitées à concentrations croissantes en NaCl après 96 heures de traitement .

Les résultats sont exprimés en $\mu\text{moles de glycine-bétaine.g}^{-1}\text{M.S.}$

● M.sc/41 ▲ M.po/5 ■ M.tr/30

Elles sont déjà élevées dans le témoin. Toutefois, *M. truncatula* accumule des bétaines surtout à 100 mM de CaCl. Pour *M. polymorpha*, les teneurs restent relativement stables pour les trois concentrations en sel, celles de *M. scutellata*, les teneurs diminuent mais très faiblement.

2.2. COMPOSITION MINERALE

Les teneurs en sodium des trois espèces (Fig.4) augmentent progressivement dans les plantules stressées en fonction de la concentration en sel du milieu extérieur. Dans les témoins, les taux de Na^+ sont à la limite de la détection, alors que les plantules traitées à 300 mM NaCl ont des taux de Na^+ qui conduisent à des valeurs de l'ordre de 3 meq.g de matière sèche. Chez *M. polymorpha* cette teneur est atteinte sur un milieu trois fois moins concentré que le précédent (100 mM). A 200 mM en NaCl, cette espèce semble avoir atteint un niveau d'accumulation maximum.

Les "pertes" en potassium notées après 96 heures de traitement paraissent élevées (Fig. 5). Elles sont de plus de 50% pour les espèces *M. truncatula* et *M. polymorpha*. A l'inverse, *M. scutellata* semble être beaucoup moins affectée par l'excès de sodium stocké dans les tissus, étant donné que son taux d'accumulation de potassium dans les plantules les plus stressées n'est diminué que de 20 %.

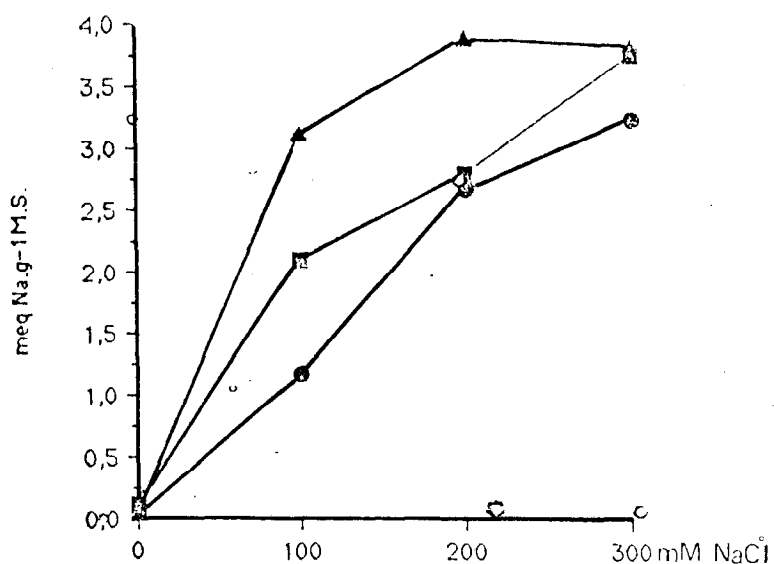


Figure 4 : Teneurs en sodium des plantules entières de Medicago traitées à concentrations croissantes en NaCl après 96 heures de traitement .

● M.sc/41 ▲ M.po/5 ■ M.tr/33

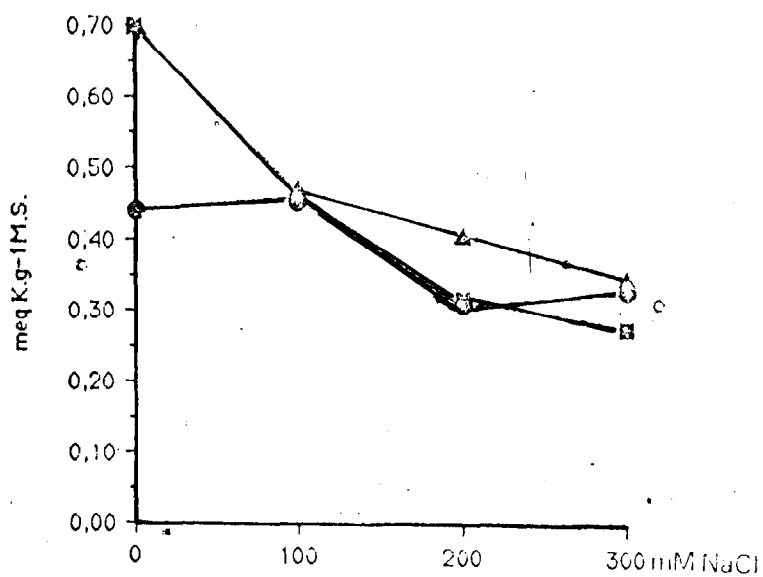


Figure 5 : Teneurs en potassium des plantules entières de Medicago traitées à concentrations croissantes en NaCl après 96 heures de traitement .

D I S C U S S I O N

Les expériences réalisées au laboratoire dans des conditions bien contrôlées, avaient pour objet la comparaison des propriétés de tolérance de diverses espèces de *Medicago* vis à vis du chlorure de sodium, ceci aux premiers stades de développement. Les résultats obtenus s'ils témoignent de la réponse des jeunes plantes placées dans des conditions optimales - la salinité mise à part - ne sont sans doute que difficilement transposables aux situations réelles rencontrées par les plantes dans leur biotope. On peut cependant considérer que la méthodologie utilisée permet d'exprimer certaines des potentialités adaptatives des différentes espèces à la salinité lorsque la germination et les premiers stades du développement se réalisent en absence de sel.

Chez les plantes glycophytes on distingue des plantes appelées "exclusives" qui ne peuvent pas accumuler le Na^+ et des plantes dites "inclusives" qui en absorbent dans une certaine limite (TOURAINÉ et AMMAR, 1985). Les observations réalisées ici suggèrent que les *Medicago* étudiés sont des espèces "inclusives" vis à vis de l'ion sodium. Cependant des différences sont notées entre espèces *M. truncatula*, *M. aculeata* et *M. polymorpha* qui se révèlent beaucoup plus "inclusives" que *M. orbicularis* et surtout *M. scutellata* qui stocke les quantités les plus faibles de Na^+ . La plupart de ces espèces et surtout les plus "inclusives" présentent aussi une grande affinité pour le K^+ puisqu'elles arrivent à maintenir leur teneur interne à une valeur suffisante pour éviter la carence, alors que la concentration en sodium du milieu extérieur est de 100 mM. Pour ce qui est du potassium deux espèces *M. scutellata* et *M. orbicularis* se

singularisent: la première réussit à maintenir l'équilibre quantitatif entre teneur du K^+ et teneur du Na^+ , alors que la seconde parvient à conserver sa sélectivité pour le K^+ .

Compte tenu des quantités de sodium accumulées en 48 heures dans les différentes espèces et aussi favorables soient-elles pour rétablir le potentiel nécessaire à l'absorption de l'eau, il était facile de prévoir des réponses métaboliques en relation avec le nouvel équilibre ionique réalisé. Compte tenu des résultats obtenus par ailleurs chez *Medicago sativa* (LESSANI et ANDREOPOULOS, 1969), nous avons cherché certaines déviations du métabolisme azoté connues pour être induites en présence de NaCl en excès. Les données rassemblées après cette première expérience à temps court ont mis en évidence une forte accumulation de proline sous forme libre dans les jeunes plantes de plusieurs espèces maintenues sur le milieu contenant NaCl (100 mM).

L'utilisation de milieux de plus en plus concentrés en NaCl et pour une durée de traitement 96 heures, permet de mieux appréhender le comportement des trois espèces *M. scutellata*, *M. truncatula* et *M. polymorpha*.

Dans ce cas là, *M. scutellata* accumule le plus de proline, semble moins "inclusive" pour le sodium et paraît avoir une grande affinité et une sélectivité pour le K^+ , elle peut être considérée comme une espèce résistante au chlorure de sodium.

M. polymorpha, espèce plutôt "inclusive" semble atteindre ses limites pour l'inclusion du sodium pour les concentrations externes de 200 mM en NaCl. Par ailleurs ses capacités à accumuler le K^+ en présence de Na^+ en excès sont

beaucoup plus limitées alors que sa réponse au niveau de la proline reste d'une bonne amplitude.

Sur ces bases on est conduit à penser que *M. polymorpha* est une espèce tolérante jusqu'à un seuil de salinité compris entre 100 et 200 mM NaCl et en tout état de cause beaucoup plus sensible au sel que *M. scutellata*. Il en est de même pour *M. truncatula* qui se révèle toutefois moins vulnérable que *M. polymorpha*.

Les jeunes plantes de *Medicago* placées dans un milieu salé se sont montrées capables d'accumuler rapidement des quantités considérables de proline sous forme libre. Cette réponse métabolique au niveau de la proline précède dans le temps l'inhibition de la croissance par NaCl. Toutefois une variabilité dans l'amplitude de la réponse est mise en évidence. Nous retiendrons ici que *M. polymorpha* qui s'est avérée l'espèce la plus sensible est aussi celle qui "produit" le moins de proline surtout pour la salinité 300 mM en NaCl. A l'inverse *M. scutellata*, l'espèce la plus résistante de l'étude a aussi les plus fortes teneurs en proline. Cette observation qui rejoint des faits déjà connus chez les plantes halophiles conduit à considérer la proline comme un des composants importants de l'adaptation métabolique des *Medicago* à la salinité. Son rôle pourrait se situer au niveau de l'ajustement osmotique des compartiments cellulaires par ailleurs enrichis par Na^+ et Cl^- en excès. Chez les autres Légumineuses placées en situation saline, la signification de la proline reste plus controversées, puisque sa concentration n'est élevée que lorsque la croissance est déjà fortement inhibée (LARHER et al, 1985).

Quel que soit le degré de tolérance des espèces de *Medicago* étudiées, leurs teneurs en bétaines sont relativement peu modifiées lorsque le sel est présent dans le milieu extérieur. Ceci singularise la signification de ces composés chez les *Medicago* où il ne semble pas y avoir réponse adaptative à leur niveau au moment de l'accommodation à la salinité. En effet, il est connu que dans un certain nombre de cas, l'accumulation des bétaines est liée aux contraintes imposées par l'environnement. C'est le cas particulier chez les Chénopodiacées et les Composées (WYN JONES et STOREY, 1981; JOLIVET et al, 1982). Les données obtenues ici suggèrent que ces réponses à caractère adaptatif pourraient être spécifiques de quelques familles.

C O N C L U S I O N

Cette étude fait ressortir que les *Medicago* étudiées sont à classer parmi les plantes tolérantes.

Les bétaines connues pour leur intervention lors de l'acquisition de la tolérance au sel chez les halophytes ne jouent qu'un rôle secondaire chez les *Medicago*.

En regard à des préoccupations agronomiques, l'intérêt des résultats obtenus est à souligner. En effet, si de jeunes plantes de *Medicago* arrivent à supporter des teneurs en sel relativement élevées pour des glycophytes (100 mM NaCl), leur introduction dans les processus d'assolement sur des sols salés pourrait être envisagée sur des bases rationnelles car il est bien considéré que les tous premiers stades de développement sont sans doute parmi les plus vulnérables aux contraintes de l'environnement.

R E M E R C I E M E N T S

Je remercie Monsieur F. LARHER, responsable du Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétales de Rennes I pour avoir participé à la réalisation de ce travail.

B I B L I O G R A P H I E

- ABDELGUERFI A., 1976 - Contribution à l'étude de la répartition des espèces locales de luzernes annuelles en fonction des facteurs du milieu (200 stations) Thèse. Dipl. Ing. Agron., I.N.A., Alger, 74 p.
- ABDELGUERFI A., 1978 - Contribution à l'étude écologique des luzernes annuelles en Algérie. Thèse de Magister, I.N.A. Alger. 116 p.
- ADEM L., 1974 - Etude du comportement des *Medicago* annuels (écotypes locaux et populations étrangères) dans les régions de Sétif, Médéa, Tiaret et Alger. Thèse. Dipl. Ing. Agron., I.N.A. Alger. 96 p.
- JOLIVET Y., LARHER F. et HAMELIN J., 1982 - Osmoregulation in halophytic higher plants: the protective effect of glycine betaine against the heat destabilization of membranes. *Plant Sci. Letters*, 25: 193 - 201.
- LARHER F., HUQ I.S.M. et GERANT-SAUVAGE D., 1985 - Sensibilité au chlorure de sodium chez les légumineuses au cours de leurs premiers stades de développement. Colloque de l'I.N.R.A., Nutrition azotée des légumineuses, Nov. 1985, Versailles.

LESSANI M.H. et ANDEREOPOULOS-RENAUD U., 1969 - Effet du chlorure de sodium dans le milieu sur l'activité respiratoire et sur le taux des glucides et des acides organiques chez la luzerne. C.R. Acad. Sci. Paris, 269: 951 - 953.

STOREY R. et WYN JONES R.G., 1977 - Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance. Phytochemistry, vol. 16 : 447 - 453.

TOURAINÉ B. et AMMAR M., 1985 - Etude comparée de la sensibilité au sel d'un Triticale et d'une orge. Agronomy, 5(5), 391 - 395.

TROLL W. et LINDSLEY J., 1955 - A photometric method for the determination of proline. J. Biol. Chem., 215: 655 - 660.

WYN JONES R.G., et STOREY R., 1981 - Betaines. in PALEG L.G., ASPINALL D., Eds.; "The physiology and biochemistry of drought resistance in plants. Acad. Press, Australia, 171 - 204.