

Etude des peroxydases d'écotypes d'*Opuntia ficus indica* L. en relation avec le développement dans des conditions de stress salin

Khales, A. & Baaziz, M.

Equipe de Biochimie et Biotechnologie des Plantes, Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences Semlalia, B.P 2390, Marrakech, Maroc.

E-mail : baaziz@ucam.ac.ma

Résumé

La salinité constitue l'un des stress abiotiques les plus répandus au niveau de la planète et limite fortement les rendements. Le figuier de barbarie, *Opuntia ficus indica* L, plante bien adaptée à l'aridité contribue à la valorisation des sols marginaux. La sélection de génotypes appropriés par les marqueurs biochimiques physiologiques et moléculaires est indispensable pour la valorisation des ressources génétiques de l'espèce. Les peroxydases (POX) sont des oxydoréductases fréquemment utilisées comme marqueurs de la résistance aux contraintes.

L'effet du NaCl sur la croissance de jeunes boutures de 5 écotypes présentant un polymorphisme morphologique a montré que le traitement de longue durée est nécessaire pour une meilleure discrimination des génotypes résistants et sensibles au stress.

Du point de vue biochimique, l'extraction par solubilisation progressive des peroxydases a permis de révéler que le stress salin provoque une augmentation des peroxydases dans les fractions solubles et ioniques préparées à partir d'écotypes tolérants. Ces changements sont reflétés au niveau des profils électrophorétiques par l'apparition d'isoformes acides et basiques chez les écotypes dont la croissance n'est pas affectée par le sel. Les autres écotypes répondent en majorité par l'activation d'isoformes préexistants.

Mots clés: figuier de barbarie, peroxydases, salinité, électrophorèse, croissance, résistant, sensible.

Introduction

Dans les zones arides et semi arides, notamment au bassin méditerranéen, la salinisation des sols constitue l'un des facteurs abiotiques majeurs qui réduit les rendements agricoles de plusieurs cultures.

L'introduction de plantes tolérantes à la salinité est l'une des techniques utilisées pour la valorisation des sols marginaux. Face à ce problème, l'espèce *Opuntia ficus indica* L. surnommée figuier de barbarie est une espèce végétale pérenne qui présente une capacité de s'adapter à diverses conditions climatiques. Elle participe à la stabilisation du sol et la lutte efficace contre l'avancée du désert. Le Maroc qui a connu plusieurs années de sécheresse successives gagnerait à développer la culture de cette plante et à intensifier la vulgarisation de son usage en tant que source fourragère et pourquoi pas son industrialisation.

Cependant le choix d'écotypes adaptés à chaque situation et de type de culture serait à notre avis la première préoccupation. Il serait donc intéressant de sélectionner parmi les ressources génétiques des génotypes appropriés. De plus l'étude des effets de la salinité sur la croissance et le développement des plantes et la recherche des marqueurs biochimiques de stress sont d'une grande importance dans la sélection d'écotypes résistants.

Les peroxydases ont été largement utilisées en vue de leur faible coût, leur grande diversité et leur large distribution.

Ce travail a pour objectif l'évaluation de la variabilité écophysologique de 5 écotypes d'O.f.i. présentant un polymorphisme morphologique en vue d'élucider leur degré de résistance à la salinité. Pour y parvenir, nous avons essayé d'évaluer dans un premier temps l'effet du stress salin sur la croissance des bourgeons chez les écotypes 'Skhour inerme' (1), 'Aissa' (2), 'Skhour épineux' (4), 'Moussa' (5) et 'Amez Miz' (8) et ceci en utilisant différentes doses de NaCl et dans un deuxième temps élucider la relation entre les peroxydases et la résistance à la salinité ceci dans le but de pratiquer une sélection précoce des plants d'O.f.i. tolérants à la salinité.

Matériel et Méthodes

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est constitué de boutures de raquettes de la deuxième génération de 5 écotypes d'O.f.i.: Skhour inerme (1), Aissa (2), Skhour épineux (4), Moussa (5) et Amez Miz (8). Le choix est basé sur les différences morphologiques ainsi que des différences dans la période de maturité des fruits. Le chlorure de sodium (NaCl) a été choisi

comme agent de stress. Trois concentrations de NaCl 0 (témoin), 200 mM et 400 mM ont été utilisées. Pour chaque écotype et chaque concentration, 10 répétitions sont destinées pour l'analyse des peroxydases et 10 autres pour le suivi de la croissance.

Les boutures sont plantées dans des plateaux à 20 alvéoles installés dans une salle de culture, à température ambiante, avec une photopériode de 16 heures. Les boutures sont arrosées de manière hebdomadaire par une solution nutritive (solution Hoegland). Le stress salin n'est appliqué qu'après une période d'acclimatation de façon à permettre aux boutures de s'adapter aux conditions de culture.

Des prélèvements de matériel végétal (0,25 g) sont effectués à partir de plantules témoins et traitées correspondant à chaque écotype sont réalisés après 15 jours, 30 j, 45 j et 60 j d'application du stress salin. Deux individus par écotype et par traitement sont échantillonnés lors de chaque prélèvement. Chaque individu subit trois répétitions. Les prélèvements serviront pour l'analyse des peroxydases.

Extraction par solubilisation progressive

Cette méthode a été utilisée dans plusieurs travaux antérieurs (Baaziz, 1990; Khaled et Baaziz, 2005). L'activité enzymatique est déterminée par spectrophotométrie à 460 nm en utilisant l'ortho-dianisidine comme substrat (Khaled et Baaziz, 2005). La variation de la densité optique est suivie pendant 2 min. Le dosage des protéines est utilisé selon la méthode de Lowry (1951).

Séparation des isoperoxydases par électrophorèse

Électrophorèse des formes acides

Les formes acides des POX sont séparées sur gel de polyacrylamide en gradient de 6 % à 15% (Baaziz et al; 1994)

Électrophorèse des formes basiques

Les isoformes anodiques sont séparées sur des gels continus de polyacrylamide à 10 % selon la méthode décrite par Baaziz et al (1994).

La révélation des peroxydases est réalisée à l'aide d'une solution de benzidine 0,05 % (P/V) préparée dans le tampon acétate 0,2 M (pH 5,0). Pour déclencher la réaction 1 ml de H₂O₂ à 1% est ajouté.

Les données sont soumises à l'analyse de la variance selon un modèle linéaire général par le programme SAS (Institut SAS, 1988). Le test de la comparaison multiple des moyennes a été aussi effectué.

Résultats et discussion

Les boutures des raquettes de 5 écotypes d'O.f.i. sont mises en culture en présence de concentrations croissantes de Na⁺. L'étude consiste à évaluer la réponse des plantes après 15 jours et 60 jours. Les résultats ont montré qu'il n'y pas de différences significatives entre les écotypes pour l'allongement des jeunes raquettes après 15 jours de salinisation, cependant des différences génotypiques sont particulièrement évidentes après un traitement de 60 jours (Fig. 1)

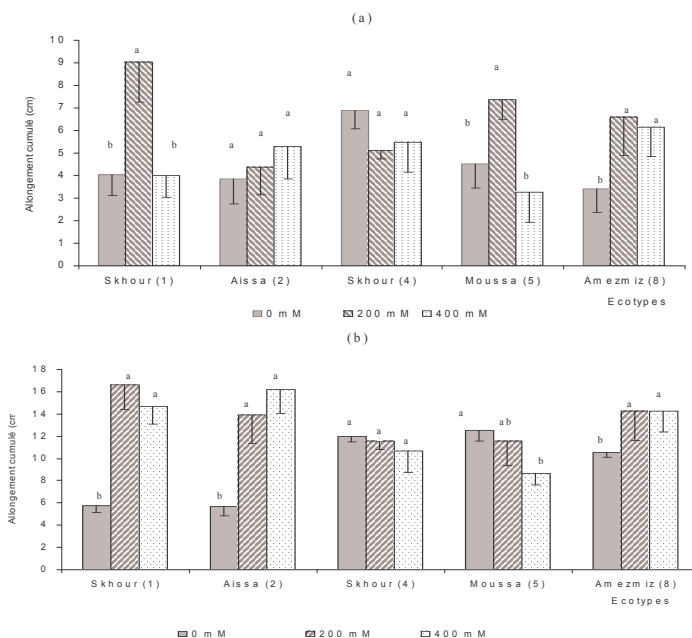


Fig.1: Effet de NaCl (0 mM, 200 mM et 400 mM) sur l'allongement cumulé des jeunes raquettes d'écotypes d'*Opuntia ficus indica* L. après 15 jours (a) et 60 jours (b). Les valeurs portant la même lettre (du même écotype) ne sont pas significativement différentes au seuil de 5 %.

L'écotype Moussa qui s'est montré tolérant à 15 jours de traitement s'est révélé être plus sensible à 60 jours, alors que la croissance des écotypes Skhour inerme, Aïssa et Amezmiz est plutôt stimulée par l'apport des sels dans le milieu de culture. Ces différences de tolérance au sel entre les génotypes à court terme et à long terme ont été également signalées par Cramer (2003).

D'autre part, des changements quantitatifs dans l'activité des peroxydases des 5 écotypes étudiés ont été enregistrés. L'augmentation significative de l'activité des POX solubles est enregistrée chez tous les écotypes en condition de stress. Le degré d'augmentation de cette activité dépend de la sévérité et de la durée du stress. En outre, l'élévation de l'activité des POX solubles est plus importante chez les écotypes tolérants. Des résultats similaires ont été signalés par Aouad (1997) sur les céréales.

Dans le cas des POX ioniques, l'effet du sel se manifeste globalement par une augmentation de l'activité enzymatique chez tous les écotypes aussi bien tolérants que sensibles. En revanche, d'autres recherches ont montré que cet accroissement de l'activité ne se manifeste que chez les variétés résistantes (Aouad, 1997).

La séparation électrophorétique des fractions solubles et ioniques des peroxydases extraites des jeunes raquettes des 5 écotypes cultivés en absence et en présence de NaCl (200 mM et 400 mM) a permis de révéler des changements qualitatifs apparents dans les zymogrammes des isoperoxydases acides des fractions solubles et ioniques (Fig. 2). En effet, après 60 jours de stress salin, l'activation des isoperoxydases de Rf 0,49 et 0,51 apparaît chez l'ensemble des écotypes. En plus, l'effet de sel s'accompagne par l'apparition de deux bandes d'intensité moyenne correspondant aux isoperoxydases acides migrant à des Rf égaux à 0,53 et 0,54 seulement chez l'écotype Skhour épineux à la concentration 200 mM (Fig. 2 B). Aussi, les profils obtenus dans le cas des peroxydases solubles (Fig. 2A) permettent de déceler l'augmentation de l'intensité des bandes les plus anodiques correspondant à une activation des isoperoxydases de Rf 0,52 et 0,53 et également l'induction de nouvelles isoformes de Rf 0,55 et 0,57 par le stress salin chez l'écotype Skhour épineux seulement.

Des travaux de Rodriguez Lopez et al. (2000) ont rapporté que l'augmentation du niveau d'une isoperoxydase anionique MPX induite par la salinité peut être reliée avec l'augmentation de la fermeté du melon, en conditions salines.

La séparation des peroxydases basiques montre que l'effet du sel agit particulièrement sur l'écotype Skhour épineux, et se traduit d'une part par l'apparition de bandes mineures d'intensité faible correspondant à des isoformes basiques migrant à des

Rf égaux à 0,3 et 0,34 et d'autre part par l'apparition de bandes d'intensité forte correspondant aux isoperoxydases les plus cathodiques de Rf 0,45 et 0,50.

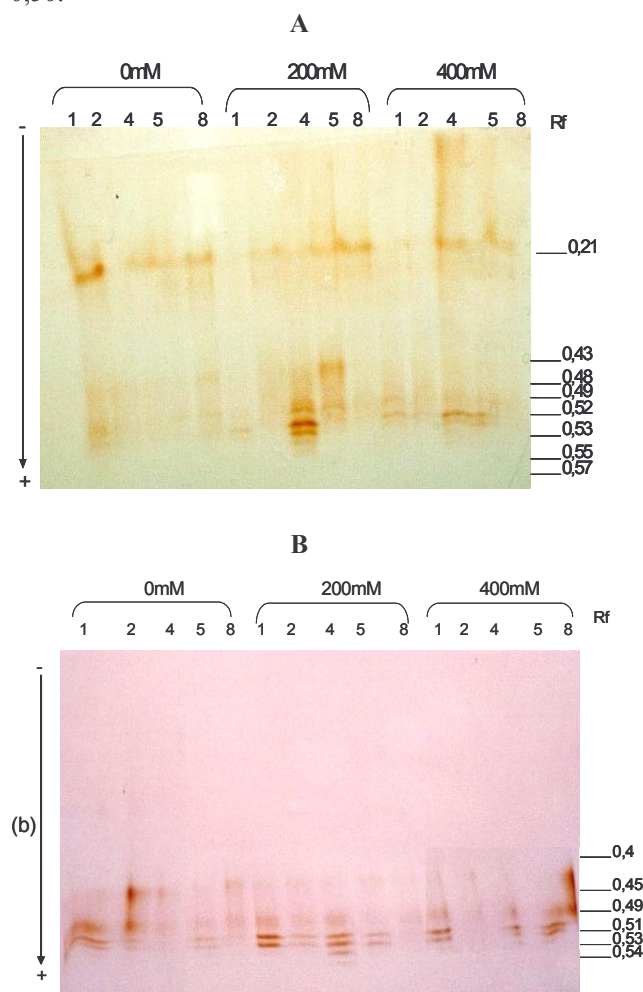


Fig.2 : Effet du sel sur le comportement électrophorétique des peroxydases acides sur gel de polyacrylamide à gradient (6-15%) des fractions solubles (A) et ioniques (B) des jeunes raquettes issus de boutures de 5 écotypes d'*Opuntia ficus indica* L. cultivées pendant 60 jours en absence du sel (0 mM) et en présence de 200 mM et 400 mM de NaCl. Les écotypes sont 'Skhour inerme' (1), 'Aïssa' (2), 'Skhour épineux' (4), 'Moussa' (5) et 'Amezmiz' (8).

Bibliographie

- Aouad A. 1997. Contribution à l'étude des peroxydases des céréales en relation avec la résistance à la salinité. Thèse de 3^{ème} cycle, Université Cadi Ayyad. Marrakech (Maroc) 198p
- Baaziz M. 1990. Contribution à l'étude des peroxydases du palmier dattier, *Phoenix dactylifera*

L. Relation avec la résistance de la plante à la maladie du bayoud, fusariose vasculaire à *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. Thèse de doctorat d'Etat des sciences, Université Cadi Ayyad, Marrakech (Maroc), 173 p.

- Baaziz M., Aissam F., Brakez Z., Bendiab K., EL Hadrami I., & Cheikh R. 1994. Electrophoretic patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxidase and polyphenoloxidase typifying calli and somatic embryos of two reputed date palm cultivars of Morocco. *Euphytica*, 76, 159-168.

- Cramer G. R. 2003. Differential effects of salinity on leaf elongation kinetics of three grass species. *Plant and Soil* 253, 233 – 244

- Khales A. & Baaziz M. 2005. Quantitative and Qualitative aspects of peroxidases extracted from cladodes of *Opuntia ficus indica* L. *Scientia Horticulturae* 103, 209-218

- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, 193, 265-275.

- Rodriguez- Lopez J.N., Espin J. C., del Amor F., Tudela J., Martinez V., Cerda A. & Garcia- Canovas F. 2000. Purification and kinetic characterization of an anionic peroxidase from Melon (*Cucumis melo* L.) cultivated under different salinity conditions. *J. Agric. Food chem.*48, 1537-1541.

- SAS Institute, 1988 : SAS/STAT User's Guide, Version 6.12. SAS Institute, Cary.