



HAL
open science

Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le Rhizobium

Laaziza Ben Khaled, Asunción Gómez, Mario Honrubia, Abdallah Oihabi

► To cite this version:

Laaziza Ben Khaled, Asunción Gómez, Mario Honrubia, Abdallah Oihabi. Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le Rhizobium. *Agronomie*, 2003, 23 (7), pp.553-560. 10.1051/agro:2003030 . hal-00886208

HAL Id: hal-00886208

<https://hal.science/hal-00886208>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par le *Rhizobium*

Laaziza BEN KHALED^{a*}, Asunción MORTE GÓMEZ^b, Mario HONRUBIA^b, Abdallah OIHABI^a

^a Laboratoire de Physiologie Végétale, BP 2390, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech, Maroc

^b Laboratoire de Mycologie, Département de Biologie Végétale Campus Universitaire d'Espinardo, Université de Murcie, 30100 Murcie, Espagne

(Reçu le 5 mars 2002 ; accepté le 16 janvier 2003)

Abstract – Effects of salt stress in hydroponic media on clover plants inoculated with *Rhizobium*. The application of salt stress in hydroponic conditions on clover seedlings (*Trifolium alexandrinum* L.) inoculated with *Rhizobium* affected the nodulation starting from 2 g NaCl·l⁻¹, whereas the growth began to be reduced only from 4 g·l⁻¹. The growth of shoots was reduced by about 20% at 4 g·l⁻¹ and 44% at 6 g·l⁻¹. The development of the root system was less sensitive. This depressive effect on the growth was accompanied by biochemical and ultrastructural modifications. The soluble protein content of the leaves fell by about 75% at 6 g·l⁻¹ of NaCl. Proline and soluble sugars accumulated mainly in leaves, where they probably contributed to the osmotic adjustment phenomena. The transport and/or the utilization of starch was affected, so it accumulated in the chloroplasts. Salt stress also caused disorganization of the thylakoid membranes and an accumulation of lipidic globules inside the chloroplasts.

clover / *Rhizobium* / salt stress / nodulation / growth

Résumé – L'application d'un stress salin en milieu hydroponique à des plantules de trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) inocuées par le *Rhizobium* affecte la nodulation à partir de 2 g·l⁻¹ NaCl alors que la croissance ne l'a été qu'à partir 4 g·l⁻¹. La croissance pondérale de la partie aérienne a été réduite de 20 % à 4 g·l⁻¹ et de 44 % à 6 g·l⁻¹. Le développement du système racinaire a été moins sensible. Cet effet dépressif sur la croissance s'est accompagné de modifications biochimiques et ultrastructurales. La teneur en protéines foliaires solubles a chuté d'environ 75 % à 6 g·l⁻¹ de NaCl. La proline et les sucres solubles se sont significativement accumulés dans les feuilles sous l'effet du sel. Ils participeraient aux phénomènes d'ajustement osmotique. Le transport ou/et l'utilisation de l'amidon ont été perturbés causant son accumulation dans les chloroplastes. Le stress salin a provoqué aussi une désorganisation des membranes thylakoïdiennes et une accumulation de globules lipidiques au niveau du stroma.

trèfle / *Rhizobium* / stress salin / nodulation / croissance

1. INTRODUCTION

Dans les zones arides et semi-arides, la contrainte saline s'associe souvent au déficit hydrique pour limiter la production des espèces végétales. Chez les légumineuses, cet effet est d'autant plus perceptible que la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique est très sensible à la contrainte saline [35]. La salinité affecte la multiplication et la survie du rhizobia dans le sol et la rhizosphère [2], inhibe le processus d'établissement de l'infection rhizobienne, entraînant une diminution du nombre de nodules, réduit leur contenu en lég'hémoglobine [14], diminue l'activité de la nitrogénase [13], altère la diffusion intranodulaire de l'oxygène [52] et modifie le statut ionique [53]. Toutefois, la diminution des photosynthétats fournis pour

les nodules [5, 20, 28] et la réduction des substrats fournis pour la respiration des bactéroïdes [13] constituent la principale limitation de la fixation symbiotique de l'azote sous contrainte saline.

Le métabolisme azoté et la synthèse protéique sont également sévèrement affectés par le stress salin, il en résulte un développement anormal des plantes et une diminution du rendement [44]. Il a également été démontré que certains composés notamment les sucres solubles et la proline s'accumulent dans les tissus des plantes cultivées sous stress salin [27, 34]. Ils seraient impliqués dans des mécanismes d'ajustement osmotique. D'autres molécules azotées comme la glycine-bétaine [18, 21, 22] et les polyamines [36] interviendraient également dans le même sens.

Communiqué par Gérard Guyot (Avignon, France)

* Auteur pour correspondance : benkha_az@hotmail.com

À l'échelle cellulaire, la salinité affecte l'ultrastructure des chloroplastes [1, 50] et plus particulièrement celle des grana [3, 46]. Chez le petit pois, le stress salin provoque la perte de l'enveloppe chloroplastique, l'apparition de gouttelettes lipidiques et la dégradation des membranes thylakoïdiennes [41]. L'accumulation de grains d'amidon a été également souvent rapportée [30, 38, 50].

Dans le cas de *Trifolium alexandrinum* L., les données biochimiques associées à l'accommodation au sel restent fragmentaires et peu nombreuses. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'effet la contrainte saline sur la croissance du trèfle et aux modifications biochimiques et structurales induites en conditions de dépendance stricte de la fixation symbiotique de N₂ pour sa nutrition azotée.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Les graines de *T. alexandrinum* L. nous ont été aimablement fournies par l'Institut National de la Recherche Agronomique de Dijon, France. Après désinfection dans une solution de H₂O₂ (15 %) pendant 30 min et rinçage à l'eau distillée stérile, la germination est effectuée dans une enceinte thermostatée (25 ± 1 °C) dans de la vermiculite préalablement stérilisée (200 °C, 4 h) et constamment humidifiée à l'eau distillée stérile.

2.2. Inoculum rhizobien

La souche de *Rhizobium* utilisée (*Rhizobium* sp.) a été isolée à partir des nodosités des racines de plantes de trèfle cultivées sur un sol de la région de Marrakech. Cette souche a été par la suite purifiée sur milieu YEM gélosé (Yeast Extract Mannitol) selon la méthode de Jordan [29]. Les colonies gommeuses et bien circulaires avec un point blanc au milieu, sont multipliées par la suite dans des erlenmeyers de 250 ml sur milieu YEM liquide [56]. Les cultures sont incubées à 28 °C pendant 5 jours sous agitation. La densité des bactéries a été estimée par mesure de la densité optique à 620 nm et par dénombrement direct après étalement sur des boîtes de Pétri contenant 20 ml de milieu gélosé YEM.

2.3. Dispositif et milieu de culture

Nos expériences ont été conduites en aquaculture stricte dans des pots en plastique de 20 cm de profondeur préalablement désinfectés par trempage dans un bain d'eau chlorique pendant une nuit, ensuite rincés abondamment à l'eau distillée. Les solutions nutritives sont préparées en se référant au milieu de base de Long Ashton modifié [45]. Pour favoriser une bonne nodulation, les nitrates ont été supprimés de la solution nutritive et remplacés par des ions sulfates. La composition du milieu de base de Long Ashton modifié utilisé est : K₂SO₄ (2,29 mM) ; CaCl₂ (7,2 mM) ; K₂HPO₄ (1,15 mM) ; MgSO₄·7H₂O (1,45 mM), H₃BO₄ (3 µM) ; ZnSO₄·7H₂O (1,04 µM) ; MnSO₄·4H₂O (10 µM) ; CuSO₄·5H₂O (1 µM) ; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (4,3 µM) et de Fe-EDTA (63 µM).

2.4. Conditions de culture

De jeunes plantules âgées de 7 jours (stade feuilles cotylédonaire) sont repiquées sur des couvercles perforés adaptés à des pots de culture contenant 1,5 l de la solution nutritive de base avec une densité de 10 plantules/pot. Après deux jours d'acclimatation sur ce milieu, les différents lots de plantules exceptés les témoins sont transférés sur le même milieu contenant du NaCl à 2 g·l⁻¹. Une gamme (2 ; 4 ; 6 et 8 g de NaCl·l⁻¹) a été choisie suite à des essais préliminaires montrant que la limite de tolérance du trèfle au NaCl est 8 g·l⁻¹. Afin de limiter le choc osmotique, les lots de plantules ont été amenés progressivement (durant les trois jours suivants) à la concentration désirée en sel. Après chaque jour, si la concentration désirée n'est pas encore atteinte, les milieux de cultures ont été remplacés par la solution plus concentrée qui suit de la gamme (4, 6 et 8 g·l⁻¹). Une fois les différents traitements élaborés (plantules âgées de 13 jours), 1 ml (10⁸ bactéries) de la suspension bactérienne a été ajouté directement sur la racine de chaque plantule.

Les cultures ont été conduites dans une salle climatisée (25 ± 2 °C et ~ 70% d'humidité) sous un plafond lumineux avec une intensité d'éclairage de 240 µmol·m⁻²·s⁻¹ et une photopériode de 16 h. Les solutions ont été aérées en permanence à l'aide de capillaires en plastique, préalablement désinfectés à l'eau de Javel pendant une nuit, reliés à des pompes d'aquarium. Les milieux ont été renouvelés chaque semaine et leur pH maintenu à 6,2 par addition de KOH (1N).

La conductivité électrique (C.E.) de la solution nutritive de chaque traitement a été déterminée par un conductivimètre de type (WTW) Tetracon 96 (Tab. I).

2.5. Estimation de la croissance

Après 1 mois de culture les plantules de trèfle encore au stade végétatif (7 à 8 feuilles chez les plantes témoins pour les traitements 2 et 4 g·l⁻¹ de NaCl et 5 à 4 feuilles pour les traitements 6 et 8 g·l⁻¹ de NaCl) ont été récoltées. Leur croissance a été appréciée par mesure des paramètres suivants : poids de la matière fraîche (MF) de l'ensemble de la plante, poids de matière sèche (MS) des plantes après dessiccation à 80 °C pendant 48 h, hauteur de la partie aérienne, longueur des racines et nombre de nodules par plante.

2.6. Dosage des protéines solubles dans les feuilles

Pour chaque traitement, des feuilles bien développées (200 mg), de même rang foliaire sont prélevées et utilisées pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford [8]. L'extraction des protéines solubles est faite dans un tampon phosphate (pH 7,0). La densité optique est mesurée à 595 nm. La gamme étalon est établie avec le sérum albumine bovine.

Tableau I. Conductivité électrique à 25 °C en (ds·m⁻¹) des différents milieux de cultures utilisées.

	NaCl (g·l ⁻¹)				
	0	2	4	6	8
CE (ds·m ⁻¹)	1,44	5,22	8,82	12,18	15,49

2.7. Dosage de la proline libre dans les feuilles

L'extraction et la purification de la proline ont été effectuées selon la méthode de Paquin et Lechasseur [43]. La densité optique est mesurée à 515 nm. La gamme étalon est établie par la proline pure.

2.8. Dosage des sucres solubles

L'extraction a été effectuée à froid en broyant 300 mg de feuilles matures et fraîches de même étage foliaire dans 4 ml d'un mélange méthanol-chloroforme-eau (MCE, 12:5:1,v/v). Le broyat est ensuite centrifugé pendant 5 min à 2500 g, le culot est repris dans 4 ml de MCE. Cette opération est répétée 3 fois de suite et les surnageants sont mélangés. Les glucides ont été dosés dans l'extrait selon la méthode de Kochert [31]. La D.O. est mesurée à 485 nm et la gamme étalon est établie par le glucose pur.

2.9. Ultrastructure

Des feuilles de trèfle issues d'une culture en conditions aseptiques dans des tubes en verre contenant du milieu MS [40] avec et sans NaCl (0 et 7 g·l⁻¹), sous des conditions contrôlées de température et d'éclairage (éclairage : 60 μmol·m⁻²·s⁻¹, température : 25 °C et photopériode : 16 h), ont été découpées et fixées au glutaraldéhyde à 3 %, dans un tampon cacodylate 0,2 M et pH 7,2 pendant toute une nuit. Les pièces sont ensuite lavées trois fois avec le même tampon et post-fixées à l'osmium à 2 % dans le même tampon pendant 150 min puis déshydratées et incluses de façon orientée dans une résine (l'épon). Des coupes semi-fines colorées au bleu de toluidine et des coupes fines contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb ont été réalisées à partir des blocs d'inclusion et sont étudiées au microscope électronique.

3. RESULTATS

3.1. Effet du NaCl sur la biomasse du trèfle inoculé par le *Rhizobium*

Hormis la plus faible dose testée (2 g·l⁻¹), la salinité a affecté négativement la croissance des plantules de trèfle inoculé (Tab. II). La hauteur de la partie aérienne a diminué de 17 % à 4 g·l⁻¹ et de 40 % à 6 g·l⁻¹ de NaCl. Au-delà de cette dose, aucune diminution supplémentaire n'est enregistrée. L'allon-

gement de la racine a été moins sensible au stress salin. La diminution n'a été que de 9 % à 6 g·l⁻¹ et 26 % à 8 g·l⁻¹ par rapport à la longueur des racines des plantes témoins. La nodulation s'est montrée particulièrement sensible aux différentes concentrations de sel, le nombre de nodules chute progressivement dès la plus faible concentration de sel (2 g·l⁻¹) où il a été réduit de 20 %. Cette réduction atteint 40 % à 6 g·l⁻¹ et 66 % à 8 g·l⁻¹ de sel. Le nombre de nodules par unité de masse racinaire a été également réduit suite au stress salin traduisant une résistance relative de la croissance des racines (Tab. II).

La croissance pondérale (quantité de biomasse mesurée à la récolte) des organes photosynthétiques semble avoir été stimulée par la faible dose de NaCl (2 g·l⁻¹) (Fig. 1 A et B). À cette dose, la biomasse aérienne a été améliorée de 20 % comparativement aux plantes témoins. Au-delà de 2 g·l⁻¹, la croissance pondérale chute avec l'augmentation des doses de NaCl dans les milieux de culture (-20 % à 4 g·l⁻¹ et -44 % à 8 g·l⁻¹ de NaCl).

La croissance pondérale racinaire a été moins sensible au stress salin. Elle n'a été affectée qu'à 8 g·l⁻¹ de NaCl où le poids de matière sèche a enregistré une diminution d'environ 25 % (Fig. 2 A et B). À 2 g·l⁻¹ de NaCl, le rapport de matière sèche des racines/parties aériennes (Tab. II) est resté pratiquement identique à celui des plantes témoins. Ce rapport augmente pour les doses 4 et 6 g·l⁻¹ en raison de l'inhibition de la croissance pondérale des organes photosynthétiques et la conservation de celle des racines. À 8 g·l⁻¹ de NaCl, ce rapport diminue mais reste supérieur à celui des plantes témoins reflétant également la grande sensibilité de la partie aérienne au stress salin. Comme le montre les teneurs en eau (Fig. 2), les différentes doses de NaCl appliquées n'ont eu aucun effet sur l'état d'hydratation des plantes qui est resté comparable (90 % de la matière fraîche en moyenne) pour les différents traitements et organes.

3.2. Teneur en protéines solubles et en proline libre

La teneur en protéines solubles des feuilles de trèfle a diminué d'environ 27 % à 4 g·l⁻¹ et de 75 % à 6 g·l⁻¹ de NaCl (Fig. 3). Au delà de cette dose le contenu en protéines semble se stabiliser. Les résultats illustrés dans la figure 4 montrent que la salinité a induit aussi une accumulation remarquable de la proline dans les feuilles du trèfle. Cette accumulation est d'autant plus importante que la concentration en sel dans le milieu est élevée. À 2 g·l⁻¹ de NaCl la teneur en proline a doublé et a été 7 fois plus importante à 8 g·l⁻¹ NaCl comparative-ment aux témoins.

Tableau II. Effet du NaCl sur les paramètres de croissance, le nombre de nodules par plante et par la masse sèche (MS) des racines du trèfle inoculé par le *Rhizobium* et cultivé en milieu hydroponique.

Paramètres	NaCl (g·l ⁻¹)				
	0	2	4	6	8
Hauteur de la partie aérienne (cm)	23 ± 1,6	25,8 ± 3,2	19,2 ± 2,9	14 ± 3,6	13,7 ± 2,5
Longueur des racines (cm)	23 ± 5,6	23 ± 5,3	22 ± 3,8	21 ± 5,9	17 ± 4,0
Nombre des nodules/plante	15 ± 4,4	12 ± 4,0	10 ± 2,7	9 ± 2,6	5 ± 0,6
MS racines/MS parties aériennes (mg)	0,14 ± 0,02	0,15 ± 0,06	0,23 ± 0,06	0,35 ± 0,12	0,23 ± 0,12
Nombre total des nodules/MS racinaire	2,12 ± 0,73	1,45 ± 0,6	1,14 ± 0,31	0,97 ± 0,21	0,92 ± 0,16

Chaque détermination est la moyenne de 6 mesures indépendantes.

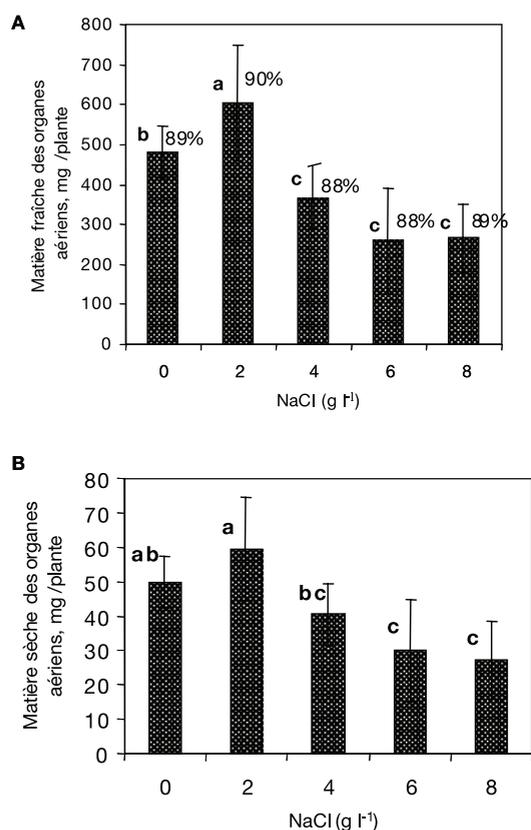


Figure 1. Effet de la contrainte saline sur la biomasse aérienne (A : matière fraîche, B : matière sèche) du trèfle inoculé par le *Rhizobium* et cultivé sur milieu hydroponique en présence et en absence de NaCl. Les valeurs sur les histogrammes correspondent aux teneurs en eau, exprimées en % de la matière fraîche. Les valeurs représentent les moyennes de 6 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

Une corrélation négative (Fig. 5) a été obtenue entre l'évolution des teneurs en protéines solubles et celles de la proline en fonction des teneurs en sel. Cette corrélation négative suggère que la proline provient au moins en partie d'une dégradation des protéines.

3.3. Contenu foliaire en sucres solubles

À l'instar de la proline, les sucres solubles se sont accumulés dans les feuilles de trèfle. Cette augmentation a atteint 37 % à 4 g·l⁻¹ et 57 % à 8 g·l⁻¹ de NaCl et n'a été jugée statistiquement significative qu'à partir de 4 g·l⁻¹ NaCl (Fig. 6).

3.4. Ultrastructure des chloroplastes

Les cellules témoins (Fig. 7 A et B) montrent un aspect normal avec un cytoplasme réparti le long de la paroi pectocellulosique. Le centre de la cellule est occupé par une grande vacuole et toutes les cellules du parenchyme foliaire sont chlorophylliennes. À la périphérie des cellules, les chloroplastes sont pratiquement dépourvus de grains d'amidon.

Les cellules des plantes cultivées sous stress salin (Fig. 8 A et B) présentent des chloroplastes avec une désorganisation

des membranes thylakoïdiennes ; les empilements de thylakoïdes forment peu ou pas de grana. Des plastoglobules sont également observés. Les chloroplastes renferment de nombreux gros grains d'amidon qui occupent une partie importante du stroma. Des grains sombres qui semblent être des lipides sont visibles au niveau du cytoplasme cellulaire.

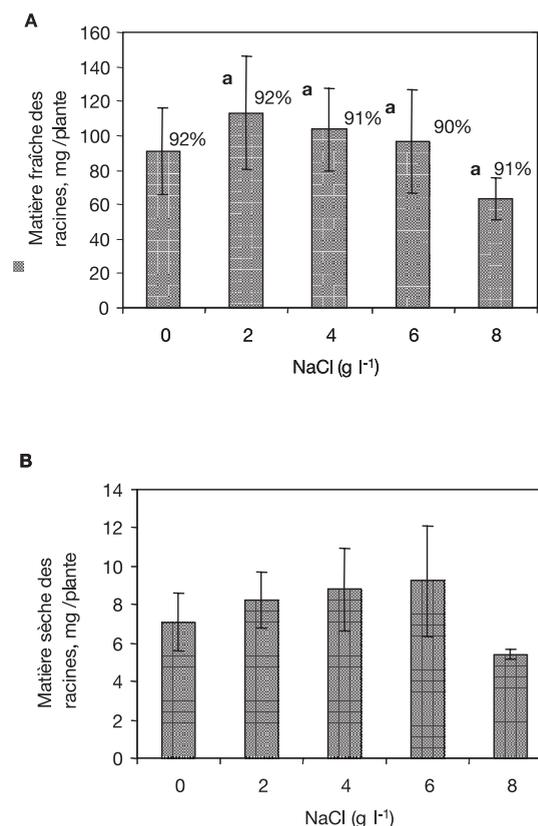


Figure 2. Effet de la contrainte saline sur la biomasse des racines (A : matière fraîche, B : matière sèche) du trèfle inoculé par le *Rhizobium* et cultivé sur milieu hydroponique en présence et en absence de NaCl. Les valeurs sur les histogrammes correspondent aux teneurs en eau, exprimées en % de la matière fraîche. Les valeurs représentent les moyennes de 6 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

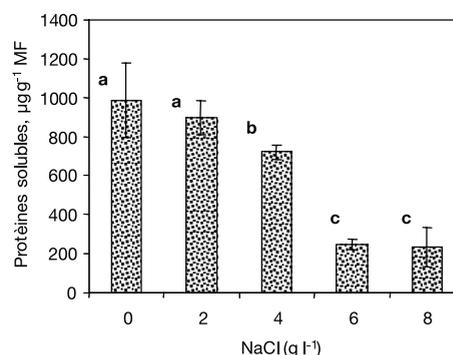


Figure 3. Effet du NaCl sur les teneurs en protéines solubles des feuilles du trèfle inoculé par le *Rhizobium* et cultivé en milieu hydroponique. Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

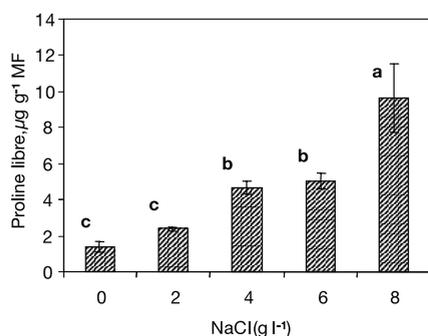


Figure 4. Effet de la contrainte saline sur les teneurs en proline des feuilles de trèfle inoculé par le *Rhizobium* et cultivé en milieu hydroponique. Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

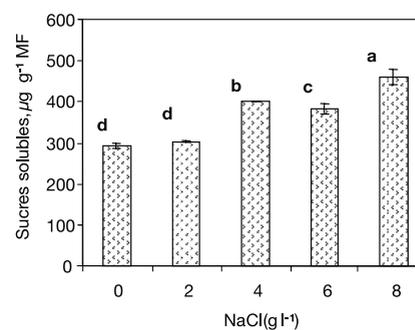


Figure 6. Effet de la contrainte saline sur les teneurs en sucres solubles dans les feuilles du trèfle inoculé par le *Rhizobium* et cultivé en milieu hydroponique. Les valeurs représentent les moyennes de 3 mesures individuelles, les intervalles de sécurité sont calculés au seuil de 95 % (test de Newman et Keuls).

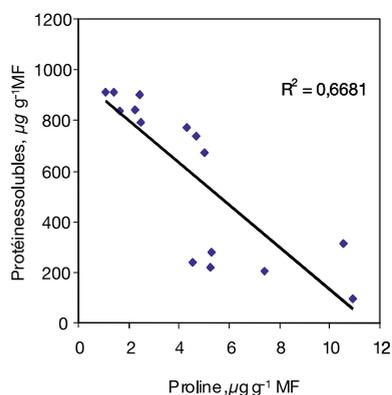


Figure 5. Corrélation entre la teneur des feuilles en protéines solubles ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) et leur contenu en proline ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ MF) de trèfle inoculé par le *Rhizobium* en milieu hydroponique en présence de différentes concentrations en NaCl. La corrélation a été établie en considérant les valeurs individuelles (3 par traitement) des protéines solubles et de la proline.

4. DISCUSSION

L'exposition des plantules de trèfle inoculées par le *Rhizobium* à la salinité s'est traduit par une chute de la croissance pondérale surtout de la partie aérienne et une réduction du nombre de nodules. En effet, la salinité diminue la survie des rhizobia [2, 15] et inhibe l'expansion et la courbure des poils absorbants [57] ce qui entraîne une réduction du nombre de ces organes symbiotiques. Zahran et Sprent [62] rapportent que le processus d'installation de la nodosité est plus sensible au stress osmotique que l'est le métabolisme des racines et des parties aériennes de la plante. Chez le trèfle nous avons observé une chute du nombre de nodules par unité de masse racinaire en fonction du degré de la salinité accompagnée d'une résistance relative de la croissance des racines. Toutefois, il semble que ces réponses dépendraient de l'espèce. Saadllah et al. [49] ont observé chez le haricot une chute de la croissance de racines associée à une augmentation du rapport nombre de nodule/unité de matière sèche racinaire.

L'effet de la salinité n'est pas homogène pour tous les organes. Les réponses morphologiques, physiologiques et métaboliques de ces derniers sont différentes [24] et parfois même opposées entre les stades juvéniles et adultes [39, 63]. D'après nos résultats, la salinité a réduit davantage la croissance des parties aériennes du trèfle comparativement à celle des racines. Des résultats similaires ont été rapportés par Dubey et Singh [16]. Cette résistance du système racinaire du trèfle au stress salin peut être due à une diminution de l'allocation du carbone pour la croissance foliaire au profit de la croissance racinaire [9]. La réduction de la croissance peut être aussi liée à des perturbations des taux des régulateurs de croissance (acide abscissique et cytokinines) induites par le sel [32, 59], parfois à une réduction de la capacité photosynthétique suite à une diminution de la conductance stomatique de CO_2 sous la contrainte saline [51].

Néanmoins, il faut signaler que les effets de la salinité sur la croissance et la productivité ne sont pas toujours négatifs. Des concentrations faibles en NaCl ($2\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) dans le milieu a conduit à une stimulation de la production de la matière fraîche et sèche des organes aériens du trèfle. Une réponse analogue a été signalée chez la luzerne [26].

Il est également établi que la salinité restreint la production de biomasse à travers une limitation de l'absorption du potassium et du calcium [33] et de leur transport [55] ; un supplément de Ca^{2+} dans le milieu de culture corrige ces effets [47]. Cette perturbation de la disponibilité du calcium inhibe également l'établissement de la nodulation (attachement bactérien-absorbants) [62]. Smith et al. [54] précisent que des composés calcium-dépendants de la paroi sont impliqués dans la reconnaissance *Rhizobium*-poil absorbant. L'augmentation du coût énergétique de la croissance en raison des différentes dépenses supplémentaires couvrant les besoins des transports ioniques et de l'ajustement osmotique aboutit à la réduction de la production de biomasse [6].

Par ailleurs, nos résultats ont montré que la réduction de la croissance chez le trèfle s'accompagne de modifications ultrastructurales. D'autres auteurs [30, 42] ont montré que la structure des chloroplastes est affectée par les conditions environnementales sévères et en particulier par le stress salin qui

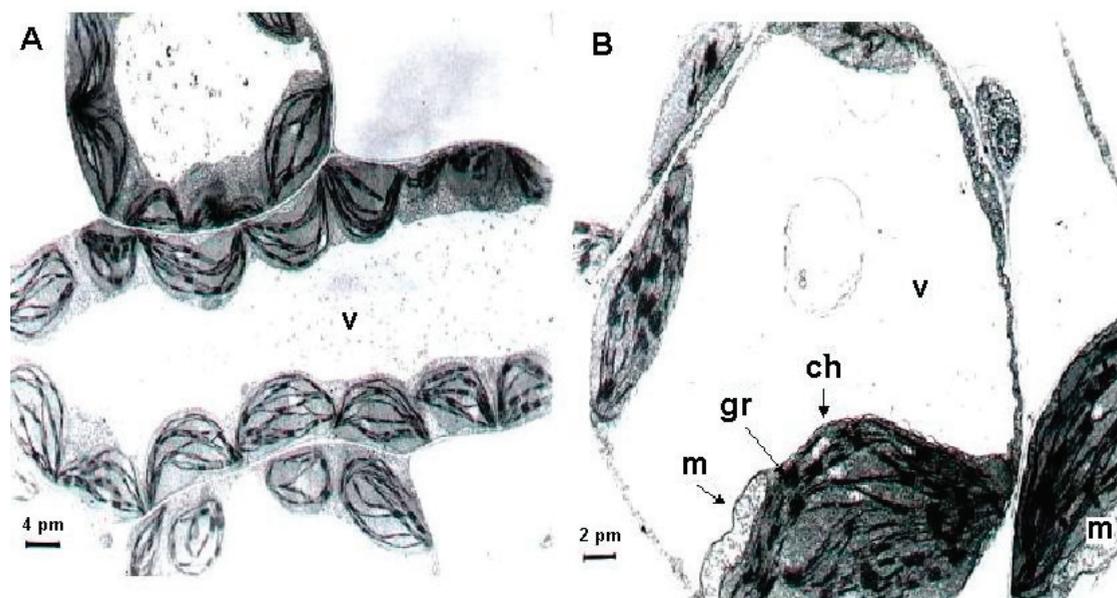


Figure 7. Cellule parenchymateuse de feuille témoin de *Trifolium alexandrinum* L. **ch** : chloroplastes, **gr** : grana, **m** : mitochondries, **v** : vacuole. Echelle : A = 4 µm, B = 2 µm.

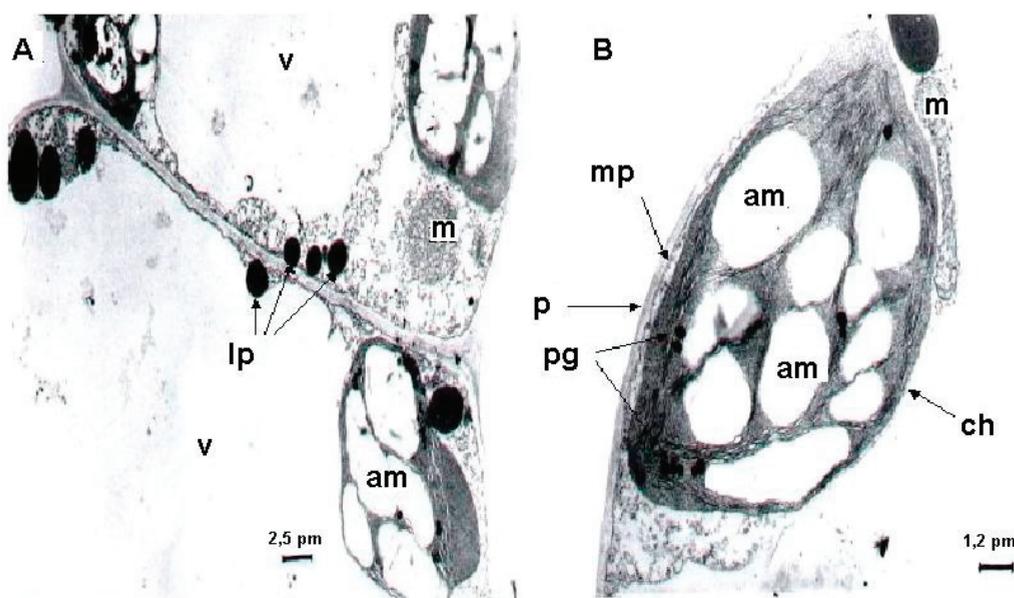


Figure 8. Cellule parenchymateuse de feuille de *Trifolium alexandrinum* L. stressée ($7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ de NaCl). **ch** : chloroplastes, **am** : grains d'amidon, **pg** : plastoglobules, **lp** : grains dense de lipides, **m** : mitochondries, **v** : vacuole. Echelle : A = 2,5 µm, B = 1,2 µm.

entraîne une désorganisation des systèmes granaires et lamellaires. Hernandez et al. [23] relie l'altération de la structure des thylakoïdes provoquée par le NaCl à l'induction d'une surproduction de l'ion superoxyde activé ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Salama et al. [50] rapportent que les modifications structurales des thylakoïdes sont liées à un changement de la composition ionique de l'espace stromatique. Toutefois, selon Ball et al. [4] la perméabilité des membranes thylakoidiennes aux ions Na^+ et Cl^- est considérée comme basse ce qui expliquerait le maintien d'une certaine capacité photosynthétique sous la contrainte saline [19].

La diminution de la teneur foliaire en protéines solubles sous stress salin serait en partie due à l'effet inhibiteur de NaCl sur la nodulation et sur la fixation symbiotique de l'azote [5]. Plusieurs auteurs rapportent que l'altération de la diffusion intra-nodulaire de l'oxygène [17] et l'inhibition de l'activité enzymatique de la glutamine synthétase (GS) et la glutamate synthase dépendante de NADH (NADH-GOGAT) [7, 12, 37] sous la contrainte saline sont parmi les facteurs limitant la biosynthèse protéique. L'accumulation de la proline est souvent rapportée comme conséquence de stress hydrique ou/et salin [11, 17, 60]. La forte accumulation de la proline dans les

feuilles de trèfle pourrait être le résultat d'une diminution de son oxydation ou/et d'une réduction de son utilisation dans la synthèse protéique [10]. De même une hydrolyse des protéines riches en proline et/ou une synthèse activée de cet acide aminé aboutiraient à son accumulation dans les cellules. La corrélation négative entre l'évolution des teneurs en protéines solubles et celles de la proline en fonction des teneurs en sel suggère une provenance catabolique au moins dans le cas des faibles doses de NaCl. Les travaux de Roosen et al. [48] sur *Arabidopsis thaliana* cultivée sous stress salin montrent que la proline est formée à partir de glutamate via la pyrroline-5-carboxylase synthétase, alors qu'en l'absence de sel l'ornithine est le substrat préférentiel pour sa synthèse. Chez *Phaseolus aureus*, le sel induit une inhibition de l'activité de la proline déshydrogénase et de la proline oxidase tandis que chez *Morus alba*, la pyrroline-5-carboxylase synthétase est stimulée [58]. Une stimulation de l'activité de cette dernière a été également rapportée chez *Arachis hypogaea* L. [22], *Vigna aconitifolia* [25] et *Arabidopsis thaliana* [61].

L'accumulation de l'amidon observée au niveau des chloroplastes du trèfle accompagnée d'une augmentation des teneurs en sucres solubles peut être attribuée au moins en partie à une première réaction de dénaturation de la saccharose phosphate synthase dans le cytosol, et aussi à une inhibition intrachloroplastique des enzymes impliquées dans la dégradation de l'amidon suite à un changement dans la composition ionique des chloroplastes [50]. Des résultats comparables ont été rapportés par Flowers et al. [18] et Keiper et al. [30]. Olmos et al. [41] ont rapporté chez le petit pois une diminution des sucres accompagnée d'une augmentation de la teneur en amidon; d'autres travaux révèlent une diminution des teneurs en sucres et en amidon [30]. Chez le riz cultivé sous stress salin, il a été observé une dégradation de l'amidon et une accumulation des sucres s'accompagnant de l'augmentation de l'activité de l'amidon phosphorylase, de celle de la glucose phosphate synthase et d'une diminution de l'activité de l'invertase [16].

5. CONCLUSION

L'exposition des plantules de trèfle, cultivées en milieu hydroponique et dépendant de la fixation symbiotique de l'azote, au stress salin s'est traduite par une réduction de la croissance des parties aériennes et du nombre de nodules. Cette réduction de la croissance s'est accompagnée de modifications biochimiques et structurales. Les teneurs en protéines foliaires chutent alors que la proline et les sucres solubles se sont accumulés dans les cellules. Ces derniers contribueraient aux phénomènes d'ajustement osmotiques. La salinité a induit une désorganisation des membranes thylakoidiennes et une accumulation de l'amidon et de globules lipidiques au niveau des chloroplastes. Une approche enzymatique aidera à la compréhension de ces modifications biochimiques et des mécanismes de résistance biochimique aux perturbations induites par le sel chez le trèfle.

Remerciements: Ce travail a bénéficié du soutien financier de la coopération Maroc-Espagnole (Action Intégrée n° 2PRO/00).

REFERENCES

- [1] Ackerson R.C., Herbert R.R., Osmoregulation in cotton in response to water stress. I. Alterations in photosynthesis, leaf conductance, translocation, and ultrastructure, *Plant Physiol.* 67 (1981) 484–488.
- [2] Alexander M., Ecology of *Rhizobium*, in: Biological Nitrogen Fixation, Ecology, Technology and Physiology, Plenum Press N.Y., 1984, pp. 39–50.
- [3] Baker N.R., A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis, *Physiol. Plant* 81 (1991) 563–570.
- [4] Ball M.C., Butterworth J.A., Roden J.S., Christian R., Egerton J.J.G., Applications of chlorophyll fluorescence to forest ecology, *Aust. J. Plant Physiol.* 22 (1994) 311–319.
- [5] Bekki A., Trinchant J.C., Rigaud J., Nitrogen fixation (C_2H_4 reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress, *Physiol. Plant* 71 (1987) 61–67.
- [6] Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G., Adaptations to environmental stress, *Plant Cell* 7 (1995) 1099–1111.
- [7] Bourgeais-Chaillou P., Perez-Alfocea F., Guerrier G., Comparative effects of N-sources on growth and physiological responses of soybean exposed to NaCl-stress, *J. Exp. Bot.* 254 (1992) 1125–1233.
- [8] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [9] Brungoli E., Bjorkman O., Growth of cotton under continuous salinity stress: Influence on allocation pattern, stomatal and non stomatal components of photosynthesis and dissipation of exes light energy, *Planta* 187 (1992) 335–347.
- [10] Buhl M.B., Stewart C.R., Effects of NaCl on proline synthesis and utilisation in excised barley leaves, *Plant Physiol.* 72 (1983) 664–667.
- [11] Chen D.M., Keiper F.J., De Filippis L.F., Physiological changes accompanying the induction of salt tolerance in *Eucalyptus microcorys* shoots in tissue culture, *J. Plant Physiol.* (1997) 564–573.
- [12] Cordovilla M.P., Ligeró F., Lluch C., The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*, *J. Exp. Bot.* 45 (1994) 1483–1488.
- [13] Delgado M.J., Garrido J.M., Ligeró F., Lluch C., Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under sodium chloride stress, *Physiol. Plant.* 89 (1993) 824–829.
- [14] Delgado M.J., Ligeró F., Lluch C., Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants, *Soil Biol. Biochem.* 26 (1994) 371–376.
- [15] Dua R.P., Differential response of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes to salinity, *J. Agric. Sci.* 119 (1992) 367–371.
- [16] Dubey R.S., Singh A.K., Salinity induces accumulation of soluble sugars and alters the activity of sugar metabolising enzymes in rice plants, *Biol. Plant.* 42 (1999) 233–239.
- [17] El Mekkaoui M., Agbani M., Monneveux P., Rôle de la sélectivité K^+/Na^+ et de l'accumulation de proline dans l'adaptation à la salinité de l'orge (*Hordeum vulgare* L.) et du blé dur (*Triticum durum* Desf.), *Actes Inst. Agron. Vet. (Maroc)* 14 (1994) 27–36.
- [18] Flowers T.J., Troke P.F., Yeo A.R., The mechanism of salt tolerance in halophytes, *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28 (1977) 89–121.
- [19] Flowers T.J., Yeo A.R., Breeding for salinity resistance in crop plants: Where next?, *Aust. J. Plant Physiol.* 22 (1995) 875–884.
- [20] Georgiev G.I., Atkins C.A., Effects of salinity on N_2 fixation, nitrogen metabolism and export and diffusive conductance of cowpea root nodules, *Symbiosis* 15 (1993) 239–255.
- [21] Gerard H., Le Saos J., Billard J.P., Boucaud J., Effect of salinity on lipid composition, glycine betaine content and photosynthetic activity in chloroplasts of *Suaeda maritima* L., *Plant Physiol. Biochem.* 29 (1991) 421–427.
- [22] Girija C., Smith B.N., Swamy P.M., Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Env. Exp. Bot.* 47 (2002) 1–10.
- [23] Hernandez J.A., Olmos E., Corpas F.J., Sevilla F., Del Rio L.A., Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants, *Plant Sci.* 105 (1995) 151–167.

- [24] Hilal M., Zenoff A.M., Ponessa G., Moreno H., Massa E.D., Saline stress alters the temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidative expression in developing soybean roots, *Plant Physiol.* 117 (1998) 695–701.
- [25] Hu C.A.A., Delauney A.J., Verma D.P.S., A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylase synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 9354–9358.
- [26] Hussain G., Al-Jaloud A.A., Al-Shammary S.F., Karimulla S., Effect of saline irrigation on the biomass yield, and the protein, nitrogen and phosphorus, and potassium composition of alfalfa in a pot experiment, *J. Plant Nutr.* 18 (1995) 2289–2408.
- [27] Irigoyen J.J., Emerich D.W., Sanchez-Diaz M., Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants, *Physiol. Plant.* 84 (1992) 55–60.
- [28] Jeffrey R., Seemann, Christa Critchley, Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt-sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L., *Planta* 164 (1985) 151–162.
- [29] Jordan D.C., Family III, Rhizobiaceae, in: Krieg N.R., Holt J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 1984, pp. 234–256.
- [30] Keiper F.J., Chen D.M., De Filippis F.L., Respiratory, photosynthetic and ultrastructural changes accompanying salt adaptation in culture of *Eucalyptus microcorys*, *J. Plant Physiol.* 152 (1998) 564–573.
- [31] Kochert G., Carbohydrate determination by the phenolsulfuric acid method, in: Hellebust J., Craigie J. (Eds.), *Physiological and Biochemical Methods. Handbook of Phycological Methods*, Cambridge University Press, London, 1978, pp. 95–98.
- [32] Kuiper D., Schuit J., Kuiper P.J.C., Actual cytokinin concentrations in plant tissue as indicator for salt resistance in cereals, in: El Bassam N. et al. (Eds.), *Genetic Aspects of Plant Mineral Nutrition*, 1990, pp. 307–314.
- [33] Lachaal M., Abdelly C., Soltani A., Hajji M., Grignon C., Réponse physiologique de quelques légumineuses spontanées et cultivées à la contrainte saline, in: *Les colloques n° 77, INRA, Paris, 1995*, pp. 93–109.
- [34] Larher F., Quemener B., Hervochon P., L'ajustement osmotique pendant la vie végétative de *Cicer arietinum* L. cultivé en présence de chlorure de sodium, *Plant Physiol.* 312 (1991) 55–61.
- [35] Lauter D.J., Munns D.N., Clarkin K.L., Salt response of chickpea influenced by N supply, *Agron. J.* 73 (1981) 961–966.
- [36] Le Dily F., Billard J.P., Boucaud J., Polyamine levels in relation to growth and NaCl concentration in normal and habituated sugar beet callus cultures, *Plant Cell Env.* 14 (1991) 327–332.
- [37] Lluch C., Delgado M.J., Cordovilla M.P., Ocaña A., Ligeró F., Aspects physiologiques de la fixation d'azote de la symbiose *Rhizobium*-légumineuse sous stress salin : effet du nitrate, in: *Les colloques n° 77, INRA, Paris, 1995*, pp. 57–71.
- [38] Locy R.D., Chang C.C., Nielson B.L., Singh N.K., Photosynthesis in salt-adapted heterotrophic tobacco cells and regenerated plants, *Plant Physiol.* 110 (1996) 321–328.
- [39] Munns R., Termaat A., Whole plant responses to salinity, *Aust. J. Plant Physiol.* 13 (1986) 143–160.
- [40] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15 (1962) 473–497.
- [41] Olmos E., Hellin E., Cellular adaptation from a salt-tolerant cell line of *Pisum sativum*, *J. Plant Physiol.* 148 (1996) 727–734.
- [42] Osmond C.B., Winter K., Powles S.B., Adaptive significance of carbon dioxide cycling during photosynthesis in water stressed plants, in: Turner N.C., Kpamer P.J., Wiley and Sons (Eds.), *Adaptation of Plants to Water and High Temperatures Stress*, Sidney, 1980, pp. 139–153.
- [43] Paquin R., Lechasseur P., Observation sur une méthode de dosage de la proline libre dans les extraits de plantes, *J. Can. Bot.* 57 (1979) 1851–1854.
- [44] Pessaraki M., Huber J.T., Tucker T.C., Protein synthesis in green beans under salt stress with two nitrogen sources, *J. Plant Nutr.* 12 (1989) 1261–1377.
- [45] Plenchette C., Furlan V., Fortin J.A., Effect of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 107 (1982) 535–538.
- [46] Rahman M.S., Miyake H., Takeoka Y., Effects of exogenous glycinebetaine on growth and ultrastructure of salt-stressed rice seedlings (*Oryza sativa* L.), *Plant Prod. Sci.* 5 (2002) 33–44.
- [47] Rengel Z., The role of calcium in salt toxicity, *Plant Cell Env.* 15 (1992) 625–632.
- [48] Roosen N.H.C.J., Thu T.T., Iskader H.M., Jacobs J., Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* 117 (1998) 263–271.
- [49] Saadallah K., Drevon J.J., Abdelly C., Nodulation et croissance nodulaire chez le haricot (*Phaseolus vulgaris*) sous contrainte saline, *Agronomie* 21 (2001) 627–634.
- [50] Salama S., Trivedi S., Bushera M., Arafa A.A., Garab G., Erdei L., Effects of NaCl salinity on growth, cation accumulation, chloroplasts structure and function in wheat cultivars differing in salt tolerance, *J. Plant Physiol.* 144 (1994) 241–247.
- [51] Santiago L.S., Lau T.S., Melcher P.J., Steele O.C., Goldstein G., Morphological and physiological responses of hawaiian *Hibiscus tiliaceus* populations to light and salinity, *Int. J. Plant Sci.* 161 (2000) 99–106.
- [52] Serraj R., Roy G., Drevon J.J., Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their permeability to oxygen diffusion, *Physiol. Plant.* 91 (1994) 161–168.
- [53] Serraj R., Vasquez-Diaz H., Drevon J.J., Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion, and distribution in soybean, common bean, and alfalfa, *J. Plant Nutr.* 21 (1998) 475–488.
- [54] Smith L.T., Pocard J.A., Bernard T., Le Rudulier D., Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 3142–3149.
- [55] Soltani A., Hajji M., Grignon C., Recherches des facteurs limitants la nutrition minérale de l'orge en milieu salé, *Agronomie* 10 (1990) 857–866.
- [56] Somasegaran P., Hoben H.J., *Methods in Legume-Rhizobium Technology*, Research report from University of Hawaii, NIFTAL project and MIRCEN, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, 1985, 367 p.
- [57] Sprent J.I., Zahran H.H., Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity, in: Beck D.P., Materon L.A. (Eds.), *Nitrogen Fixation by Legumes in Mediterranean Agriculture*, Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 1988, pp. 145–151.
- [58] Sudhakar C., Lakshmi A., Giridarakumar S., Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity, *Plant Sci.* 161 (2001) 613–619.
- [59] Termaat A., Passora J.B., Munns R., Shoot turgor does not limit shoot growth of NaCl affected wheat and barley, *Plant Physiol.* 77 (1985) 869–872.
- [60] Ullah S.M., Soja G., Gerzabek M.H., Ion uptake, osmoregulation and plant-water relations in faba beans (*Vicia faba* L.) under salt stress, *J. Landwirtsch. Forsch.* (1994) 291–301.
- [61] Yoshida Y., Kiyosue T., Katagiri T., Ueda H., Mizoguchi T., Yamaguchi-Shinozaki K., Wada K., Harada Y., Shinozaki K., Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylase synthetase and accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress, *Plant. J.* (1995) 751–760.
- [62] Zahran H.H., Sprent J.I., Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosum*, *Planta* 167 (1986) 303–309.
- [63] Zid E., Étude de la nécrose foliaire chez différentes espèces de citrus cultivées en présence de NaCl, *Rev. Fac. Sci. Tunis* 4 (1989) 145–160.