

Etude comparative des mécanismes biochimiques et moléculaires de résistance au stress hydrique de deux variétés de blé dur

Zerrad W¹., Hillali S²., Mataoui B². S. El Antri S¹. Et Hmyene A¹.

1: Laboratoire de Biochimie, d'Environnement et d'Agroalimentaire. FST de Mohammedia B.P. 146.

Mohammedia 20650 Maroc.

2: Laboratoire de Biochimie. FST de Settat.

Résumé

Au Maroc, les cultures céréalières, importantes cultures, se concentrent principalement dans les zones arides et semi arides là où les conditions climatiques limitent sérieusement le potentiel de production. En raison du caractère imprévisible de la contrainte hydrique, la tolérance s'avère la stratégie la plus efficace dans les situations de stress sévère et prolongé. Lors de cette tolérance on assiste à des modifications de structures ou de fonctions qui augmentent la probabilité de survie et de production des plantes lors de ces conditions.

Dans ce travail, nous avons fixé comme objectif d'évaluer l'effet du stress hydrique sur des paramètres moléculaires tels que, la synthèse de la proline, des sucres totaux et réducteurs et des protéines totales, et d'examiner les différences dans ces paramètres entre deux variétés de blé dur Karim et Tomouh.

L'examen des résultats a montré que, lors de la restriction de l'alimentation en eau, le comportement des plantes se manifeste différemment d'un jour de stress à un autre et d'une variété à une autre.

En général, les conditions de contrainte hydrique, ont entraîné chez les deux variétés étudiées une réduction du potentiel hydrique, une accumulation d'osmoticums dont la proline et les sucres totaux et réducteurs ainsi qu'une augmentation dans la synthèse des protéines.

En conclusion, l'étude a montré que les deux variétés étudiées ont utilisé les mêmes stratégies de tolérance vis à vis du stress hydrique mais la seule différence qui existe c'est au niveau des taux de synthèse des marqueurs moléculaires étudiés.

Mots clés : Blé dur, Stress hydrique, Paramètres moléculaire, tolérance.

Introduction

Les stress environnementaux, notamment le stress hydrique, limitent sérieusement la croissance des plantes ainsi que la productivité végétale (Wang et al., 2003).

Au Maroc, le déficit hydrique constitue un important facteur limitant pour la production des cultures céréalières puisque 60% de la superficie réservée aux céréales se situe dans les zones arides et semi-arides (El Mourid et al., 1996) qui se caractérisent par une faiblesse et

une forte irrégularité des précipitations et de forte températures sur une grande partie de l'année (Boutfirass et al., 1994).

La présente étude vise à évaluer l'effet du stress hydrique sur des paramètres moléculaires tels que, la synthèse de la proline, des sucres totaux et réducteurs et des protéines totales, et d'examiner les différences dans ces paramètres entre deux variétés de blé dur Karim et Tomouh.

Matériel et Méthodes

Matériel végétal

Le matériel végétal est formé de deux variétés de blé dur Karim et Tomouh fournies par l'Institut National des Recherches Agronomiques de Settat.

Les graines ont été mises en culture à température ambiante et à l'obscurité pendant 7 jours tout en les arrosant une fois par jour.

Après 7 jours de germination, les germes de blé, des deux variétés, ont subi un stress hydrique de 3, 5, 7 et 9 jours par arrêt d'arrosage. Une partie de chaque variété a été arrosée normalement et a été considérée comme témoin.

Les coléoptiles des germes de blé, ainsi obtenues, ont été séparées des racines.

Détermination de la teneur en eau

La teneur en eau a été déterminée en plaçant des échantillons de poids déterminé dans une étuve portée à 75°C.

Les échantillons ont été pesés, à des intervalles de temps réguliers, jusqu'à obtention de poids constants.

Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines, extraites à partir des coléoptiles et des racines, a été effectué par la méthode de Folin (Lowry et al., 1952). Une gamme étalon est faite à l'aide d'une solution de sérum albumine de bœuf (SAB). La densité optique est lue à 750 nm au spectrophotomètre.

Dosage de la proline

La proline libre a été dosée par la méthode de Troll et Lindsley, (1955). Une gamme étalon est faite à l'aide d'une solution de proline pur. La densité optique est lue à 528 nm au spectrophotomètre.

Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux a été effectué par la méthode de Ashwel, (1957). Une gamme étalon est faite à l'aide d'une solution de glucose anhydre. La densité optique est lue à 585 nm au spectrophotomètre.

Dosage des sucres réducteurs

Le dosage des sucres réducteurs a été fait par la méthode de Nelson, (1944) modifiée par Samogy en (1952). Une gamme étalon est faite à l'aide d'une solution de glucose anhydre. La densité optique est lue à 700 nm au spectrophotomètre.

Résultats et discussion

La teneur en eau

Une comparaison entre l'évolution de la teneur en eau des deux variétés de blé dur (figure 1) a montré que le stress hydrique entraîne une chute du pourcentage d'eau aussi bien pour les racines que pour les coléoptiles.

Cette chute devient de plus en plus nette au fur et à mesure que le niveau de stress s'accroît. Ce résultat est en conformité avec les résultats d'autres chercheurs tels que El Mourid (1988), Samir (1993) et Casals (1996) qui ont aussi montré que l'effet dépressif de la carence en eau sur l'état hydrique de la plante peut être irréversible si la période de stress est prolongée.

En absence de déficit hydrique, la teneur en eau, des racines et des coléoptiles, reste presque stable chez les deux variétés.

Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales, extraites à partir des coléoptiles et des racines des deux variétés a montré (figure 2) qu'il y a une corrélation positive entre les jours de stress hydrique et le niveau de protéines totales aussi bien pour les racines que pour les coléoptiles.

D'autres chercheurs, en mesurant la quantité de protéines totales en fonction du déficit hydrique, ont montré qu'il peut y avoir soit une baisse (Kumar et Singh, 1991) ou une hausse (Rai et al., 1983) dans le niveau totale des protéines.

D'une manière générale, pour les deux variétés étudiées, la synthèse protéique racinaire en réponse au déficit hydrique débute très tôt pour atteindre des taux qui dépassent ceux des coléoptiles.

Cette synthèse protéique reste généralement plus remarquable au niveau de la variété Karim aussi bien pour les racines que pour les coléoptiles.

En absence de stress hydrique, les quantités de protéines totales des deux variétés restent proches l'une de l'autre surtout au niveau des coléoptiles.

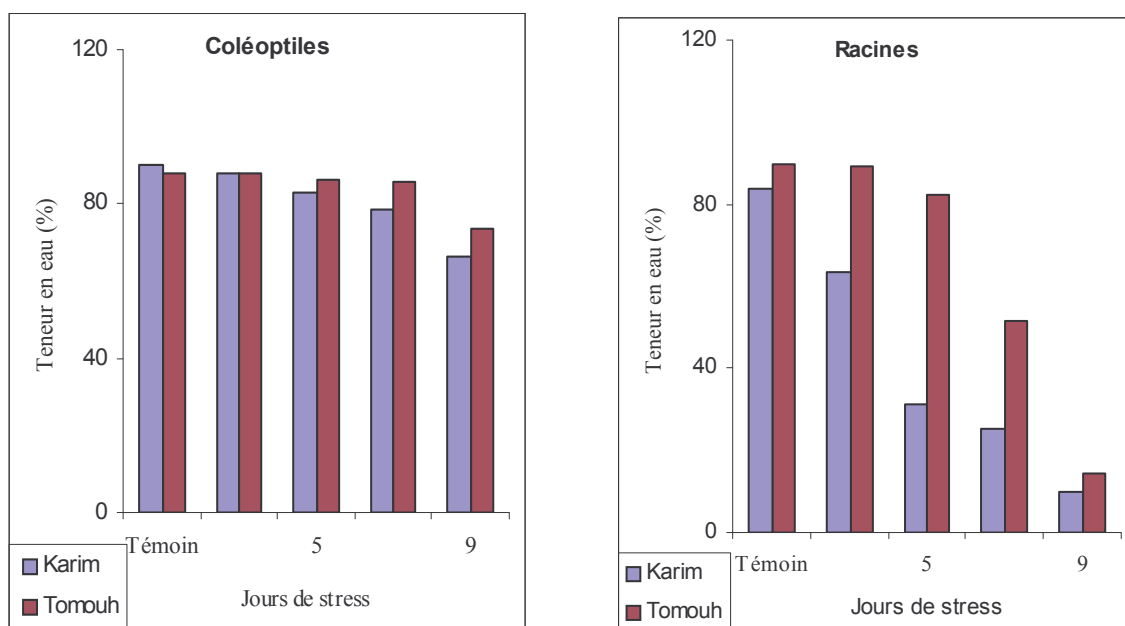


Figure 1: Comparaison entre l'évolution de la teneur en eau entre les racines et les coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress

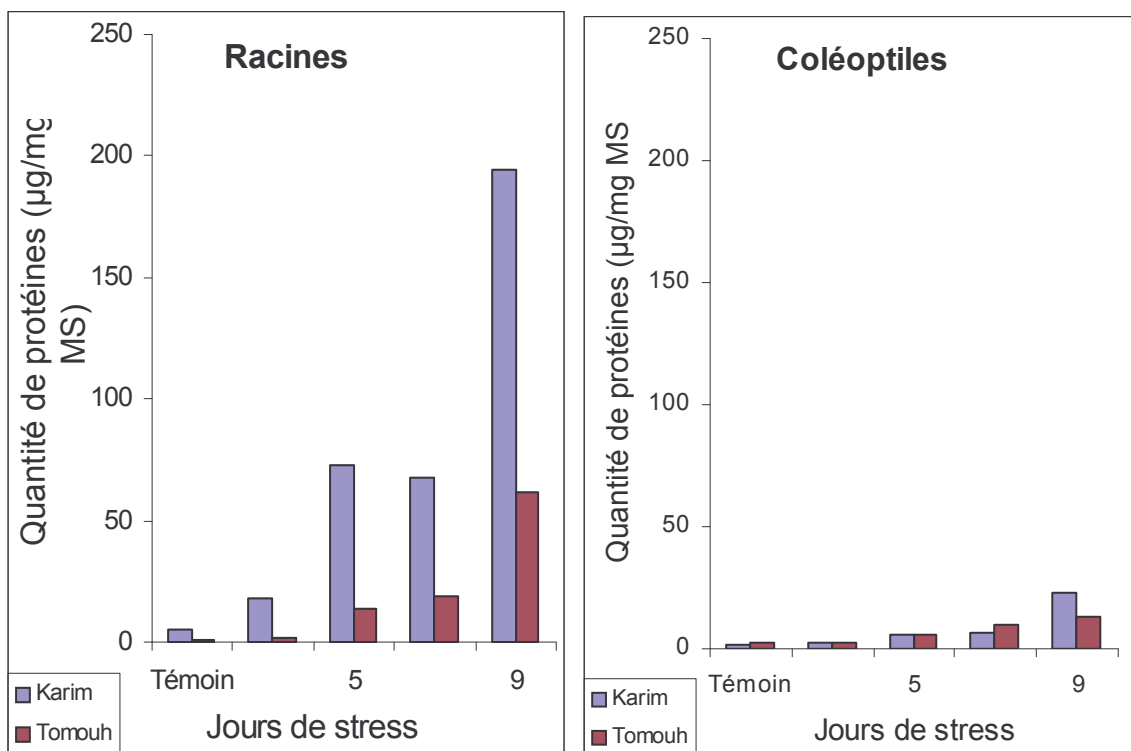


Figure 2: Comparaison entre l'évolution de la quantité des protéines totales entre les racines et les coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress

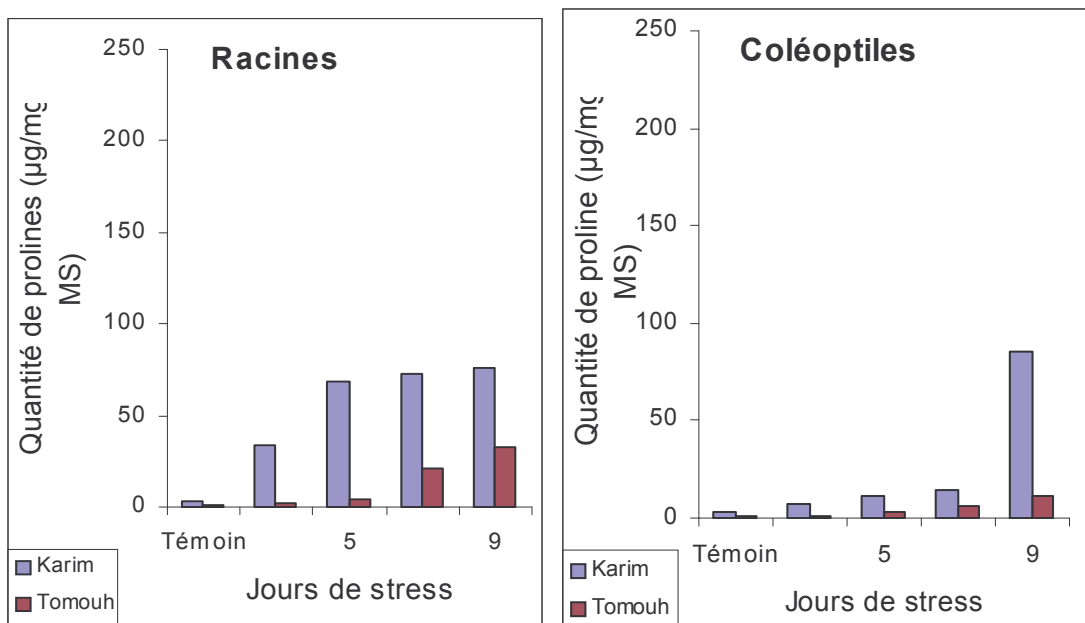


Figure 3: Comparaison entre l'évolution de la quantité de proline entre les racines et les coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress

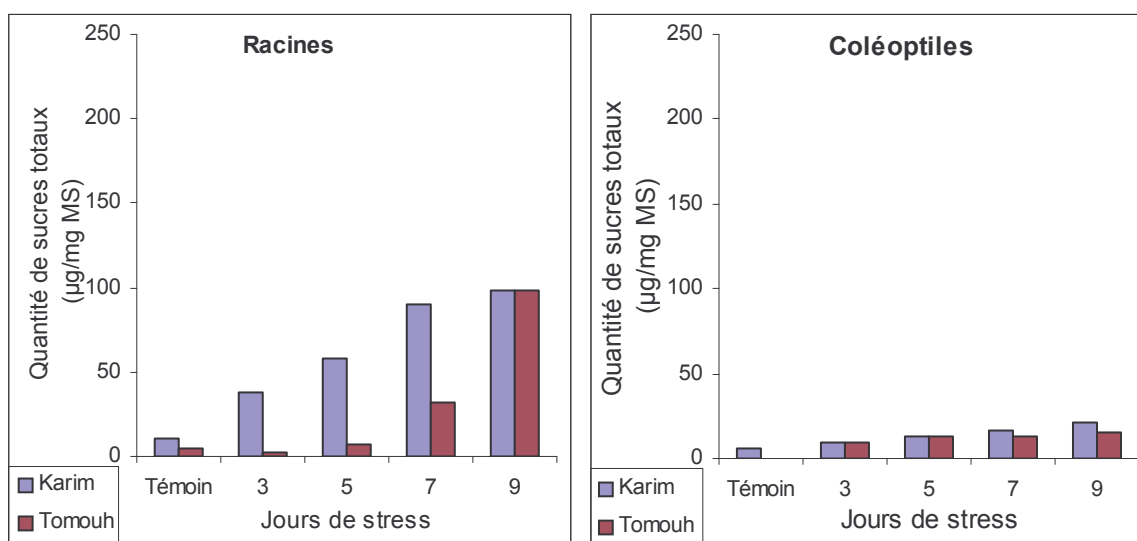


Figure 4: Comparaison entre l'évolution de la quantité de sucres totaux entre les racines et les coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress

Dosage de la proline

Le dosage a montré, en comparant l'évolution de la quantité de proline au niveau des racines et des coléoptiles des deux variétés en fonction de la durée du stress hydrique (figure 3), que l'augmentation de la quantité de proline est en corrélation positive avec le degré du stress hydrique.

Ce résultat est en conformité avec les recherches de plusieurs auteurs dont Monneveux et Nemmar (1986), Bellinger et al. (1991) et Gorham (1993).

Au niveau des coléoptiles des deux variétés étudiées, la teneur en proline demeure très faible durant les sept premiers jours de stress et l'accumulation de cet acide aminé ne commence à être visible qu'à partir du 9^{ème} jour.

Pour les racines, la synthèse de proline commence bien précocement surtout chez la variété Karim.

En absence de contrainte hydrique, le taux de proline chez les deux variétés reste très faible et presque stable pour les racines et les coléoptiles.

Dosage des sucres totaux

Le dosage des sucres totaux, extraits à partir des racines et des coléoptiles des deux variétés étudiées, a montré (figure 4) qu'il y a, généralement, une corrélation positive entre la quantité de sucres accumulés et la durée du stress hydrique. Ce résultat est en accord avec ceux de certains chercheurs dont Ben Abdellah et Ben Salem (1993).

En comparant l'évolution de la quantité de sucres totaux chez les deux variétés, on note que cette accumulation est plus nette au niveau des racines par rapport aux coléoptiles.

Au niveau des racines, la variété Karim commence à accumuler les sucres totaux très tôt (dès le 3^{ème} jour) par rapport à la variété Tomouh chez laquelle cette hausse ne devient remarquable qu'à partir du 7^{ème} jour du stress.

Au niveau des coléoptiles, même si l'accumulation reste faible pour les deux variétés étudiées mais elle dépasse la quantité de sucres totaux des témoins qui reste généralement très faible.

Dosage des sucres réducteurs

La comparaison entre l'évolution de la quantité de sucres réducteurs des deux variétés étudiées en fonction de la durée du déficit hydrique (figure 5) a montré qu'il y a une hausse dans le niveau des sucres réducteurs au niveau des racines et des coléoptiles. Cette augmentation devient de plus en plus nette au fur et à mesure que l'intensité du stress s'accroît.

Pour les deux variétés, le taux de sucres réducteurs racinaires dépasse celui des coléoptiles.

En absence de déficit hydrique, les quantités de sucres réducteurs des deux variétés restent faibles aussi bien pour les racines que pour les coléoptiles.

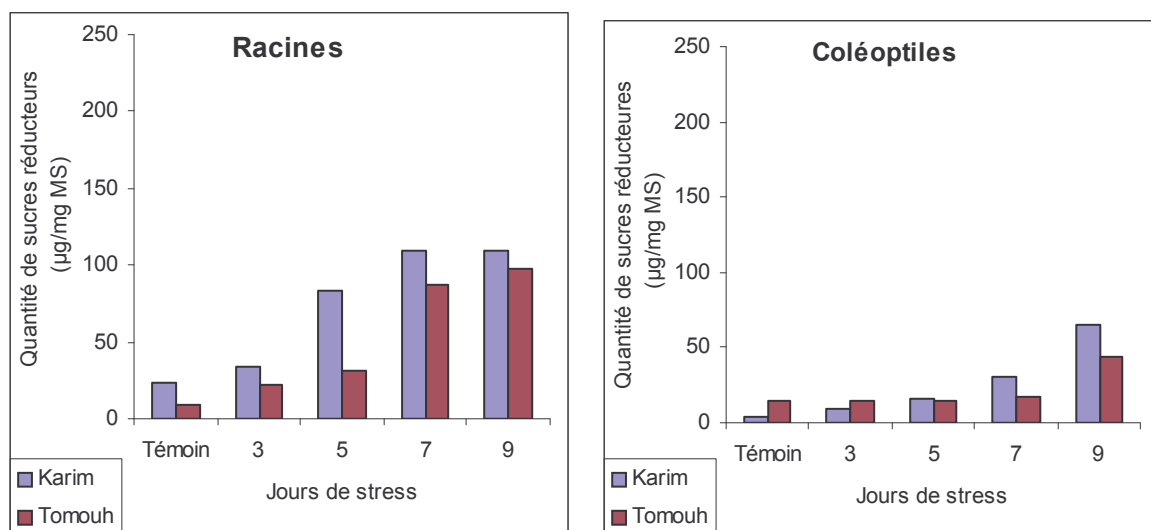


Figure 5: Comparaison entre l'évolution de la quantité de sucres réducteurs entre les racines et les coléoptiles des deux variétés durant les 9 jours de stress

Les résultats obtenus, à partir de l'étude de certains marqueurs moléculaires de résistance au stress hydrique chez les deux variétés Karim et Tomouh soumises à des conditions de déficit hydrique, par arrêt d'arrosage, ont montré que la réponse à cet aléa dépend de deux facteurs : variété et durée du stress.

Pour se conformer aux conditions de stress, les deux variétés ont édifié de nouveaux mécanismes d'adaptation et de nouvelles compositions cellulaires. Ainsi, pour garder le potentiel de turgescence aussi élevé que possible, après la chute très remarquable de la teneur en eau surtout au niveau des racines, les deux variétés ont accumulé certains osmotocums à l'intérieur de leurs cellules dont la proline et les sucres.

Le dosage de la proline libre a montré que le stress hydrique a entraîné l'accumulation de cette molécule chez les deux variétés. Cette augmentation de la concentration, qui était très nette au niveau des racines par rapport aux coléoptiles, peut être due aussi bien à l'inhibition de l'oxydation des protéines qu'à la dégradation des protéines en leurs précurseurs (Barnetts et Naylor, 1966 ; Morris et al, 1969). L'explication de l'accumulation de la proline est confuse, certains auteurs dont Hanson et al (1977), affirment que c'est une conséquence pathologique, d'autre comme Stewart et Lee (1974) suggère que la proline à de fortes concentrations agisse comme soluté pour l'ajustement osmotique, et aussi pour servir de réservoir de composés azotés et de carbone pour une utilisation ultérieure dans la croissance.

Les sucres solubles totaux ont aussi connus une augmentation de la concentration en réponse au déficit hydrique pour les deux variétés.

En effet les sucres, même s'ils représentent des osmotocums beaucoup moins puissant, ils participent eux également au maintien de la balance de la force osmotique pour garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevés que possible (Bouzoubaa et al., 2001) et permettent également une préservation de l'intégrité membranaire dans les organes desséchés ainsi qu'une protection des protéines (Darbyshire, 1974). Cette augmentation de la concentration des sucres solubles totaux, qui était très remarquable au niveau des racines que des coléoptiles, a été accompagnée par une dégradation de certains disaccharides d'où l'accumulation des sucres réducteurs qui ont montré, eux également, une augmentation de la concentration durant la période de stress pour les deux variétés de blé dur.

En plus du phénomène d'osmorégulation, les deux variétés de blé dur «Karim et Tomouh» ont répondu aux conditions de stress hydrique par une hausse dans le niveau de protéines totales aussi bien au niveau des racines qu'au niveau des coléoptiles. Cette augmentation est due a une activation d'un ensemble de gènes permettant la synthèse des protéines spécifiques associées aux stress tel que les protéines «LEA» qui assurent une protection de l'ensemble vitale des protéines cellulaires (David et Grongnet 2001), et les protéines de choc thermique qui permettent un maintien des structures protéiques et

membranaires de la cellule végétale (Baker et al., 1988).

En conclusion, l'étude a montré que les deux variétés étudiées ont utilisé les mêmes stratégies de tolérance vis à vis du stress hydrique mais la seule différence qui existe c'est au niveau des taux de synthèse des marqueurs moléculaires étudiés.

Bibliographie

- Baker J., Steel CH et Dure IL. 1988. Sequence and characterization of 6 leaf proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11:277-291.
- Barnetts N.M. et Naylor A.W., 1966. Amino acids and protein metabolism in bermuda during water stress. *Plant Physiol.* 41: 1222-1230.
- Ben Abdallah N. et Ben Salem M., 1993. Paramètres morphophysologiques de sélection pour la résistance à la sécheresse des céréales. In : Monneveux P et Ben Salem M. (Eds); Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne, Diversité génétique et amélioration variétale. Montpellier (France), 15-17 décembre 1992. INRA. Les Colloques, pp : 173-190.
- Berlinger Y., Bensoud A. et Larher F. 1991. Physiological significance of proline accumulation, a trait of use to breeding for stress tolerance. In: Acevedo E., Conesa A.P., Monneveux P. and Srivastava J.P. Eds; Physiology-Breeding of winter cereals for stressed Mediterranean environments. Montpellier, France, July 3-6 1989, n° 55:449-458.
- Boutfirass M., Karrou M. et El Mourid M., 1994. Irrigation supplémentaire et variétés de blé dans les zones semi-arides du Maroc. In El Gharous M., Karrou M. et El Mourid M. (Eds); Aquis et perspectives de la recherche agronomique dans les zones arides et semi-arides du Maroc ; INRA-MIAC Eds. Actes de conférence, Rabat 24-27 Mai 1994, Maroc. pp : 176-179.
- Bouzoubaa Z. El Mourid M. Karrou M. et El Gharous M., 2001. Manuel d'analyse chimique et biochimique des plantes. Eds ; INRA Maroc.
- Casals M.L., 1996. Introduction des mécanismes de résistance à la sécheresse dans un modèle dynamique de croissance et de développement du blé dur. Thèse de Doctorat de l'INRA Paris Grignon, 93p.
- Darbyshire B., 1974. The function of the carbohydrate units of tree fungal enzymes in their resistance to dehydration. *Plant Physiol.* 54: 717-721.
- David J.C. et Grongnet J.F., 2001. Les protéines de stress. *INRA Prod. Anim.*, 14(1), 29-40.
- El Mourid M. 1988. Performance of wheat and barley cultivars under different soil moisture regimes in semi arid region. Ph.D. dissertation, Iowa State University Ames USA. 229p.
- El Mourid M., Karrou M., et El Gharous M. 1996. la recherche en aridoculture respectueuse de l'environnement. *Al Awamia.* 92 : 69-81.
- Gorham J. 1993. Stress tolerance and mechanisms behind tolerance in barley. In: Agronomical and physiological characterization of different barley genotypes to salt stress. Settat 1993.Meeting.
- Hanson A.D., Nelson C.E., et Everson E.H., 1977. Evaluation of free proline accumulation as an index of drought resistance using two contrasting barley cultivars, *Crop. Sci.* 17: 720-726.
- Kumar P.K. et Singh R.A., 1991. Germination and metabolism in susceptible and tolerant mung bean genotypes under moisture stress, *Indian J. Plant Physiol.* 34:267.
- Lowry O.H., Rosbrough, N. J., Farr, A. L. et Randall, R. J., 1952. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Monneveux P. et Nemmar M., 1986. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* desf.): étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie* 6 : 583-590
- Morris C.J., Thompson J.F. et Jonson C.M., 1969. Metabolism of glutamic and N-acetylglutamic acid in leaf discs and cell free extracts of higher plants. *Plant Physiol.* 44: 1023-1026.
- Nelson N 1944. A photometric adaptation of the somogyi method of determination. *J. Biol. Chem.* 153:375-380.
- Rai V.K., Singh G., Thakur P.S. et Banyal S., 1983. Protein and amino-acid relationship during water stress in relation to drought to drought resistance. *Plant Physiol. Biochem. (Suppl.)* 10: 161.
- Samir K., 1993. Réponses agrophysiologiques de trois variétés de blé dur au stress hydrique en zones semi-arides marocaines. Thèse de troisième cycle de la faculté des sciences de Meknes, 185p.
- Samogyi M., 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195 : 19-23.
- Sarda X., Vansuyt G., Tusch D., Casse-Delbart F. et Lamaze T., 1993. les signaux racinaires de la régulation stomatique. In Monneveux P et Ben Salem M. (Eds); Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne, Diversité génétique et amélioration variétale. Montpellier (France), 15-17 décembre 1992. INRA. Les Colloques, pp : 75-79.
- Stewart G.R. et Lee J., 1974. The role of proline accumulation in halophytes. *Planta.* 12: 279-289.
- Wang W.X., Brak T., Vinocur B., Shoseyov O. et Altman A., 2003. Abiotic resistance and chaperones: possible physiological role of SP1, a stable and stabilising protein from *Populus*. In: Vasil IK (ed) plant biotechnology 2000 and beyond. Kluwer, Dordrecht, pp 439-443.