

Effect of iron supply on the growth, nutritional status and antioxidant activity of a forage legume *Sulla carnosa*

Effet de l'approvisionnement en fer sur la croissance, le statut nutritionnel et l'activité antioxydante d'une légumineuse fourragère *Sulla carnosa*



Conférence Scientifique
Internationale sur
l'Environnement et
l'Agriculture

N. JELALI*¹, N. BOUKARI¹, W. DHIFI², A. HICHEM¹, C. ABDELLY¹

¹ Laboratoire des plantes extrêmophiles, centre de biotechnologie, technopole de Borj-Cedria, Hammem-Lif, Tunis, Tunisie.

² Institut supérieur de biotechnologie de Sidi Thabet, université de la Mannouba.

*Corresponding author: nahidajelali@yahoo.fr

Abstract - The aim of this work is to study the effect of Fe supply on the growth, the ferric and potassium status as well as the antioxidant activity in a forage halophyte *Sulla carnosa*. For this reason, young seedlings were cultivated on liquid medium and two treatments were used: 50 μM Fe (+ Fe); control plants and 3 μM Fe (-Fe); deficient plants. The obtained results showed that Fe deficiency led to a significant decrease of the dry weight content in shoots and roots. However, the reduction rate was more important at the root level. Besides, the chlorophyll and the total Fe content were significantly inhibited in Fe deficient plants, compared to the control. However, the potassium content undergoes a significant reduction in shoots under Fe starvation conditions, against an accumulation noted in roots. On the other hand, the MDA content, which is an indicator of oxidative stress increased in the -Fe treated plants of *Sulla carnosa*. Interestingly, the determination of the total antioxidant activity with four different solvents, showed a marked stimulation of this activity with the solvent giving the best yield which is ethanol.

Keywords: *Sulla carnosa* ; iron deficiency; biomass production; nutritional status; antioxidant activity.

Résumé - Le présent travail vise à étudier l'effet de l'approvisionnement en Fe en faible quantité sur la croissance, la nutrition ferrique et potassique ainsi que l'activité antioxydante d'une halophyte fourragère *Sulla carnosa*. Pour ce faire, des jeunes plantules cultivés sur milieu liquide ont été soumises à deux types de traitements : 50 μM Fe (+Fe); lot des plantes témoins et 3 μM Fe (- Fe); lot des plantes déficientes. Les résultats obtenus ont montré que la déficience ferrique a significativement réduit la teneur en matière sèche aérienne et racinaire. Toutefois, le taux de réduction était plus important au niveau des racines. Outre, la teneur en chlorophylles et en Fe total ont été significativement inhibée au niveau des plantes déficientes, en comparaison avec les plantes témoins. Cependant, les teneurs en potassium subissent une réduction significative dans la partie aérienne, contre une accumulation dans les racines. D'autre part, la teneur en MDA, qui est un indicateur de stress oxydatif a augmenté chez les plantes déficientes de *Sulla carnosa*. La mesure de l'activité antioxydante totale avec quatre solvants différents, a révélé une stimulation importante de cette activité pour le solvant qui donne le meilleur rendement et qui est l'éthanol.

Mots clés: *Sulla carnosa* ; déficience ferrique; production de biomasse ; statut nutritionnel ; activité antioxydante.

1. Introduction

Les plantes spontanés qui ont subi une forte pression de sélection dans les biotopes à salinité et/ou sécheresse extrême, telles que les halophytes (plantes natives des biotopes salins), sont des espèces à potentialités multiples et intéressantes (Falleh 2011). Par ailleurs, la Tunisie dispose d'une diversité non négligeable d'espèces halophytiques à intérêt écologiques et économiques qui pourraient représenter un

potentiel agronomique important pour la production pastorale. Parmi ces espèces, les légumineuses halophytes possèdent une excellente qualité nutritive grâce à une teneur élevée en protéines, en éléments minéraux et en vitamines. La valorisation de ces espèces requiert l'étude de leur comportement en tant que réponses physiologiques et biochimiques sous l'effet des contraintes du milieu. En effet, plusieurs contraintes abiotiques telles que le manque d'eau, la salinité élevée, la température extrême, la luminosité excessive ainsi que le manque en éléments nutritionnels (Fe, P, Zn, K) peuvent affecter la productivité végétale en induisant un stress oxydatif généré par les espèces oxygénées réactives (EOR). A cet égard, le Fe est un élément vital pour la croissance et le développement des plantes puis qu'il est essentiel pour une multitude de fonctions et processus métaboliques et enzymatiques comme ceux en relation avec l'oxygène, le transport d'électrons, la fixation de l'azote, la biosynthèse des protéines, la respiration, la synthèse de chlorophylle et la photosynthèse (Briat 2007). Malgré son abondance dans le sol, le Fe est faiblement disponible parce qu'il est présent sous forme de composés oxyde et d'hydroxyde, particulièrement dans les sols calcaires (Ksouri 2007). Dans le bassin méditerranéen y compris la Tunisie, les sols calcaires sont très répandus. Ces sols sont caractérisés par un contenu élevé en carbonates et un pH élevé (8 – 8.5) ce qui favorise la précipitation d'un certain nombre d'éléments minéraux notamment le Fe (Dell'Orto et al. 2003). Le symptôme caractéristique de la déficience ferrique est la chlorose foliaire résultant d'une réduction importante de la concentration de chlorophylles, due à un manque de disponibilité du Fe dans la rhizosphère ou à une difficulté d'acquisition de ce nutriment par les racines (Pestena et al. 2005).

Outre, la physiologie et la biochimie des plantes sont affectées par la déficience ferrique, du fait que le Fe est un cofacteur important de plusieurs enzymes, y compris celle impliqués dans l'activité antioxydante (Marchner 1995). Par conséquent, la carence en Fe comme toutes les autres contraintes environnementales, peut conduire à une perturbation du système redox induisant un stress oxydatif à l'intérieur des cellules végétales (Ranieri et al. 2001). Ceci conduit à la formation de radicaux libres ou les espèces oxygénées réactives (EOR) telles que les superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), les peroxydes d'hydrogène (H_2O_2) et les radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}), qui sont toxique pour la cellule (Ranieri et al. 2003). Pour faire face aux dégâts provoqués par ces formes toxiques, les cellules végétales ont développé différents mécanismes adaptatifs à travers une cascade d'antioxydants qui stoppe la propagation des réactions de la chaîne oxydative (Jelali et al. 2014).

Dans ce cadre, l'implication de l'activité antioxydante dans la réponse à la déficience ferrique a fait l'objet de diverses études (Molassiotis et al. 2006 ; Donnini et al. 2009 ; Jelali et al. 2014). Outre, d'autres études sont intéressés par l'effet de cette contrainte sur les réponses physiologiques chez des légumineuses cultivées telles que la lentille et le pois chiche (Mahmoudi et al. 2005), l'haricot (Krouma et al. 2003) et le petit pois (Jelali et al. 2011). Cependant, les données qui se rapportent à l'effet de cette contrainte sur les légumineuses spontanées comme *Sulla* sont très rares. Pour ce faire, l'objectif de ce travail est d'étudier l'effet de la déficience et l'approvisionnement en Fe en faible quantité sur la croissance, la nutrition minérale et l'activité antioxydante d'une halophyte fourragère *Sulla carnosa*.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal et conditions de culture

Ce travail a été réalisé sur une provenance de *Sulla carnosa* (Sidi Khelif). Les graines matures ont été récoltées au mois d'Août de la sebkha de Sidi Khelif à Sousse près du golf de Hammamet. Après une scarification mécanique, les graines sont mises en imbibition pendant une demi-heure dans de l'eau distillée additionnée de quelques gouttes d'eau de javel. Ensuite, les graines sont mises à germer dans des boîtes de pétrie à l'obscurité à 20°C sur du papier filtre imbibé d'eau distillée. Après 5 jours, les jeunes plantules ont été repiquées sur des pots en PVC de 5 l contenant une solution nutritive complète (SNC) diluée (2 fois) continuellement aérée. La SNC est préparée selon Hoagland et Arnon (1950) avec la composition suivante en macroéléments : 1.25 mM $Ca(NO_3)_2$, 1.25 mM KNO_3 , 0.5 mM $MgSO_4$ et en micro éléments : 0.25 mM KH_2PO_4 and 10 μM H_3BO_3 , 1 μM $MnSO_4$, 0.5 μM $ZnSO_4$, 0.05 μM $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$ and 0.4 μM $CuSO_4$. Un mois plus tard, lorsque la longueur des tiges est d'environ 4 cm, les plantules sont transférées sur une solution nutritive complète et divisé en deux lots (3 répétitions pour chacun). Deux traitements ont été appliqués : +Fe : le premier lot des plantes témoins (SN + 50 μM Fe) et - Fe : le lot des plantes déficientes (SN + 3 μM Fe) où la déficience est due à un approvisionnement du fer en faible quantité. La conduite de culture a été effectuée dans une chambre de culture sous des conditions contrôlées sous plafond lumineux avec un rayonnement efficace de 250

$\mu\text{mol. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et une photopériode de 16h/8h (lumière-obscurité). La température moyenne et l'humidité relative sont respectivement de 24°C/60% le jour, et 18°C/80% la nuit. La solution nutritive est renouvelée tous les six jours et elle est continuellement aérée.

2.2. Détermination de la matière sèche

Au moment de la récolte, les parties aériennes et racinaires sont séparées et pesés avant et après 72 h de dessiccation dans une étuve à 70 °C. Les masses des matières fraîche et sèche des différents organes sont déterminées à l'aide d'une balance de précision, (Mettler type AE100 au 1/100 de mg).

2.3. Dosage des chlorophylles totales

La teneur en chlorophylle totale est déterminée selon la méthode de Torrecillas et al. (1984). En effet, la deuxième paire des folioles de la feuille qui se trouve juste sous l'apex est pesée, découpée et mise dans 5 ml d'acétone à 80%. Après 72 heures d'obscurité et à une température de 4 °C, on a mesuré la DO à 665 nm et à 649 nm. La teneur en chlorophylle totale est calculée en utilisant l'équation suivante :

$$\text{Chlorophylle totale } (\mu\text{g/ml}) = 6.45(A_{665}) + 17.72(A_{649})$$

A665 et A649 représentent les DO lues respectivement à 665 et 649 nm.

2.4. Extraction et dosage des éléments minéraux

Après dessiccation à l'étuve, la matière végétale est finement broyée par un broyeur en Agate type «FRITSCH» afin d'obtenir une poudre végétale permettant l'extraction des éléments minéraux.

2.4.1. Extraction et dosage du fer

L'extraction du Fe total a été effectuée selon la méthode de Grusak (1995). A une quantité de poudre végétale d'environ 100 mg, on ajoute 2,5 mL d'acide nitrique concentré (14,4 N) et 1 ml d'acide perchlorique concentré. Le mélange est placé dans un bécher (Duran) puis porté à une température de 150° C sur une plaque chauffante, jusqu'à dessiccation totale. Par la suite, on ajoute au résidu 1 ml de HNO₃, 2M. Après 10 minutes de repos, on ajuste à 25 ml avec l'eau distillée. Les extraits obtenus sont ensuite utilisés pour déterminer la quantité du Fe total au moyen d'un spectrophotomètre d'absorption atomique, type « Perkin Elmer AAS3110 ».

2.4.2. Dosage du Potassium

Les ions K⁺ sont dosés sur les mêmes extraits que le Fe total. Le dosage de K⁺ se fait par photométrie à flamme (photomètre Corning). Le principe de la photométrie d'émission consiste à injecter l'élément minéral dissous dans la solution aqueuse dans une flamme air-propane. Il subit donc une excitation thermique et émet un spectre de raies caractéristiques qui sont sélectionnées par des monochromateurs (filtres) spécifiques. Derrière chaque filtre est installée une cellule photo-réceptrice qui détecte l'intensité de la lumière émise, celle-ci étant proportionnelle à la quantité de l'élément émetteur contenu dans la solution vaporisée. Les concentrations des différents échantillons sont déterminées en se référant à une gamme allant de 2 à 10 $\mu\text{g K}^+/\text{ml}$.

$$[\text{K}^+] = (\text{point de la } \gamma * \text{lecture} * V * \text{dilution} * 1000) / (\text{lecture de la } \gamma * \text{masse} * M)$$

2.5. Extraction et dosage du malonyldialdéhyde (MDA)

Les lipoperoxydes membranaires, produits par la peroxydation des lipides sous l'effet des EOR sont estimés selon la méthode de Hernandez et Almansa (2002). Des échantillons de 500 mg de matière fraîche sont broyés, avec une pincée de sable stérile, dans 5 ml d'acide trichloacétique (TCA, 0,1 %). Le broyat est centrifugé pendant 15 min à 15 000 g à 4 °C et le surnageant est conservé. La manipulation consiste à incuber un milieu réactionnel contenant 1 ml du surnageant et 4 ml d'acide thiobarbiturique TBA (0,5 %) préparé dans le TCA (20 %) pendant 30 min, dans un bain-marie à 95 °C. Dans ces conditions, les composés aldéhydes, essentiellement le malonyldialdéhyde, vont réagir avec le TBA pour former le complexe TBA-MDA. La réaction est arrêtée par un refroidissement immédiat dans de la glace pendant 10 min. Après une deuxième centrifugation de 10 min à 10 000 g, le surnageant est récupéré pour le dosage, par colorimétrie, des lipoperoxydes à 532 nm contre un blanc contenant 0,5 % TBA et 10 % TCA. Après soustraction de l'absorbance non spécifique lue à 600 nm, la concentration du

malondialdéhyde est calculée à l'aide de son coefficient d'extinction (155 Mm⁻¹. cm⁻¹) selon la formule suivante :

$$\text{MDA (nmol/g MF)} = \frac{(\text{DO532} - \text{DO600}) \times V_s}{0,155 \times \text{MF}}$$

Avec Vs : volume du surnageant et MF : matière fraîche.

2.6. Activité antioxydante totale

Ce test est basé sur la réduction du molybdène (VI) en molybdène (V) par l'extrait de plante. Cette réduction induit, à pH acide, la formation du complexe phosphate/Mo (V) de couleur verte (Prieto et al. 1999). Une aliquote de 0,1 ml d'extrait est combinée à 1 ml de solution composée d'acide sulfurique (0.6 N), de phosphate de sodium (28 mM) et de molybdate d'ammonium (4 mM). Les tubes sont incubés à 95°C pendant 90 mn. Après un repos de 6 minutes à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 695 nm contre un blanc contenant du méthanol à la place de l'extrait. L'activité antioxydante totale est exprimée en mg d'équivalent acide gallique par gramme de matière sèche (mg EAG. g⁻¹ MS).

2.7. Analyse statistique

La comparaison des moyennes est faite par le test de Student. Les intervalles de sécurité (IS) sont calculés au seuil de 5 %. Les analyses statistiques avec une seule variable sont faites avec le logiciel SPSS.10.

3. Résultats et Discussion

3.1. La croissance des plantes

En conditions de déficience ferrique, on a noté un effet dépressif de cette contrainte sur la teneur en matière sèche (MS). La figure 1 montre que la production de biomasse de la partie aérienne (PA) a enregistré une diminution significative qui est quantifiée de 20 % en comparaison avec les plantes témoins. Quand aux racines, on a noté de la même façon une réduction de 39 %.

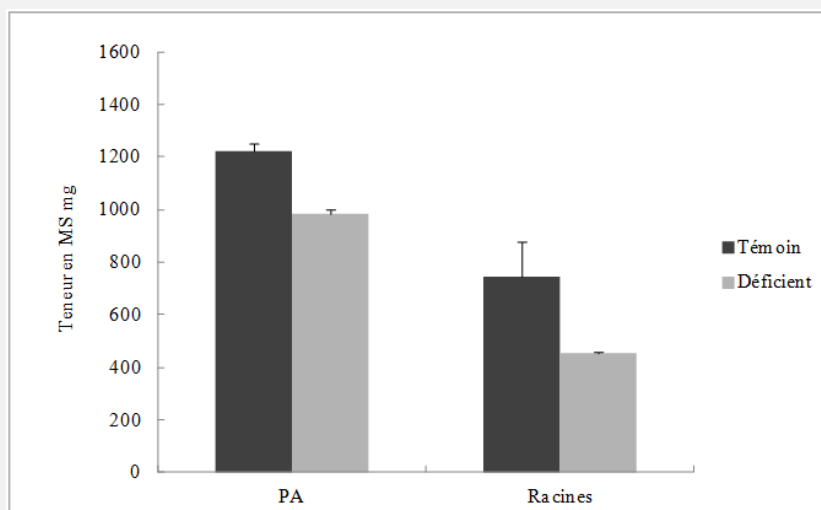


Figure 1. La variation de biomasse sèche de la partie aérienne (PA) et des racines après 15 jours de traitement chez des plantes de *Sulla carnosa* cultivées sur milieu complet (Témoin) et milieu déficient additionné d'une faible quantité de Fe (Déficient). Moyennes de 6 répétitions. Intervalles de sécurité au seuil de 5 %.

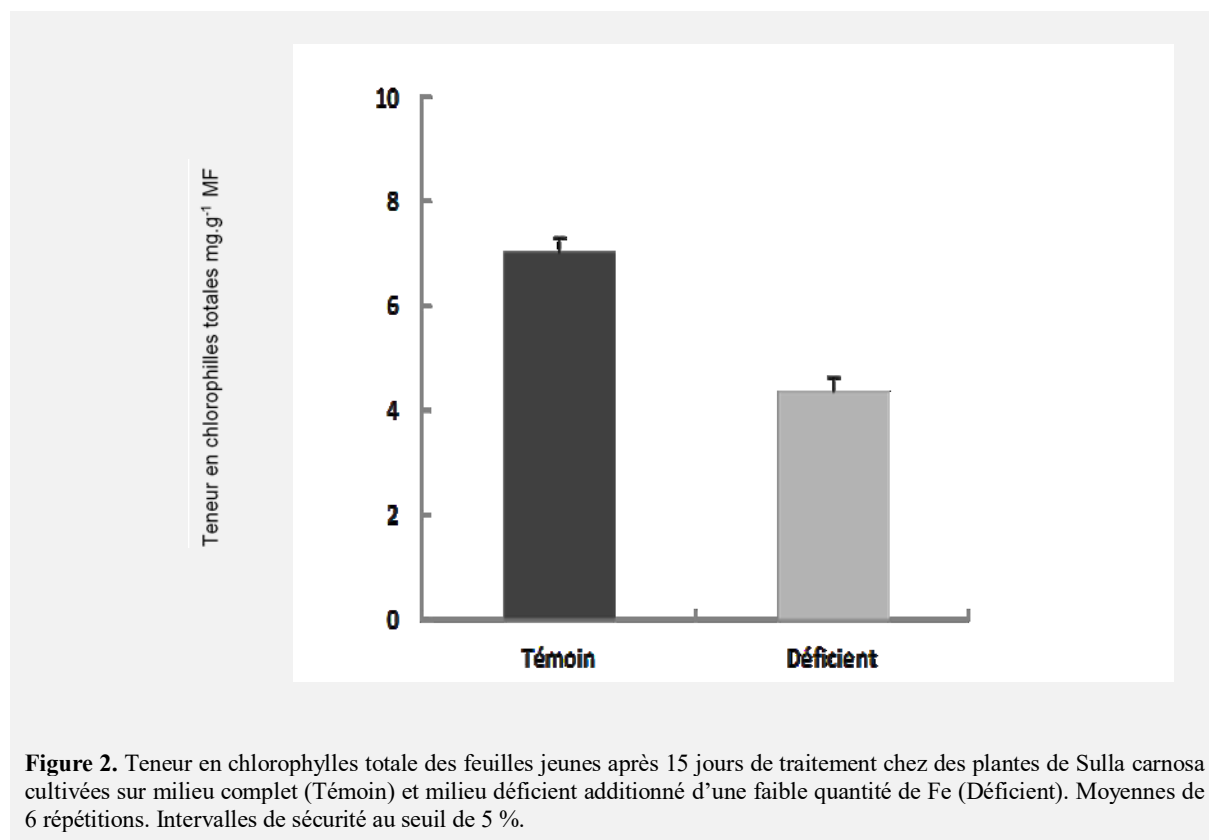
Notre étude a révélé l'apparition de la chlorose foliaire chez les plantes déficientes de *Sulla carnosa*. La chlorose ferrique a été également décrite chez d'autres légumineuses cultivés comme le pois chiche (Mahmoudi et al. 2005), le medicago (M'sehli et al. 2008) et notamment le petit pois (Jelali et al., 2011). Des résultats similaires ont été également rapportés chez les arbres fruitiers et la betterave à sucre

(López-Millán et al., 2001; Larbi et al., 2006), le soja (Zocchi et al. 2007) et l'arachide (Zuo et al. 2007). Néanmoins, l'état chlorotique enregistré durant les premiers jours du traitement montre que les feuilles jeunes de *Sulla carnosa* ne sont pas sévèrement affectées par la chlorose ferrique, en comparaison avec d'autres légumineuses. En effet, selon des travaux précédents fait par Krouma et al. 2003, ils ont noté une forte chlorose au bout de 10 jours de traitement chez quelques variétés d'haricot sous l'effet de la déficience en Fe.

Outre, nos résultats ont montré que la production de matière sèche a été légèrement affectée chez les plantes déficientes de *Sulla carnosa* (taux de réduction de l'ordre de 20 et 39%, respectivement pour la partie aérienne et racinaire). Dans la littérature, une relation étroite entre la croissance et la tolérance à la déficience ferrique a été souvent décrite de positive chez plusieurs espèces comme le pêcher (De La Guardia et al. 1995), le citrus (Pestana et al. 2005), la vigne (Bavaresco et Poni 2003; Ksouri et al. 2007) ainsi que le medicago (M'sehli et al. 2008) et le petit pois (Jelali et al. 2011). Sachant que la réduction de la croissance par la déficience ferrique a été considérée par De la Guardia et Alcántara 2002 comme un critère de sensibilité des espèces à cette contrainte, on peut alors suggérer la tolérance relative de la variété (Sidi Khelif) de *Sulla carnosa*.

3.2. Le statut chlorophyllien

Pour mieux décrire l'état chlorotique de ces plantes, nous avons apprécié cet état à la récolte finale en mesurant la teneur des feuilles jeunes en chlorophylles totales. Nos résultats montrent une diminution significative de la teneur en chlorophylles totales chez les feuilles jeunes des plantes soumises aux conditions de déficience en Fe (Déficient) en comparaison avec les plantes témoins (Témoin) avec un taux de réduction de 38 % (Fig.2).



Parallèlement à l'apparition des symptômes de chlorose, la déficience ferrique a entraîné une baisse des teneurs des feuilles jeunes en chlorophylles totales chez les plantes déficientes de *Sulla carnosa*. Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents portant sur l'effet de la déficience ferrique directe ou induite par le bicarbonate chez le pois chiche (Mahmoudi et al. 2005) et le petit pois (Jelali et al. 2011).

3.3. Nutrition ferrique

Les teneurs en Fe total après 15 jours de traitement sur milieu témoin (Témoin) et déficient en Fe (Déficient) sont représentées par la figure 3. Sur milieu normalement fourni en Fe (Témoin), les plantes de la variété Sidi khlif montrent au niveau de leur PA des teneurs voisines de l'ordre de 1032 $\mu\text{g/g MS}$. L'application de la déficience ferrique induit une baisse légère de ces teneurs avec un taux de réduction de 15 % en comparaison avec le témoin (Fig.3.1). Cependant, il est important à signaler qu'on a noté une réduction importante au niveau de la partie racinaire qui est de l'ordre de 57 %.

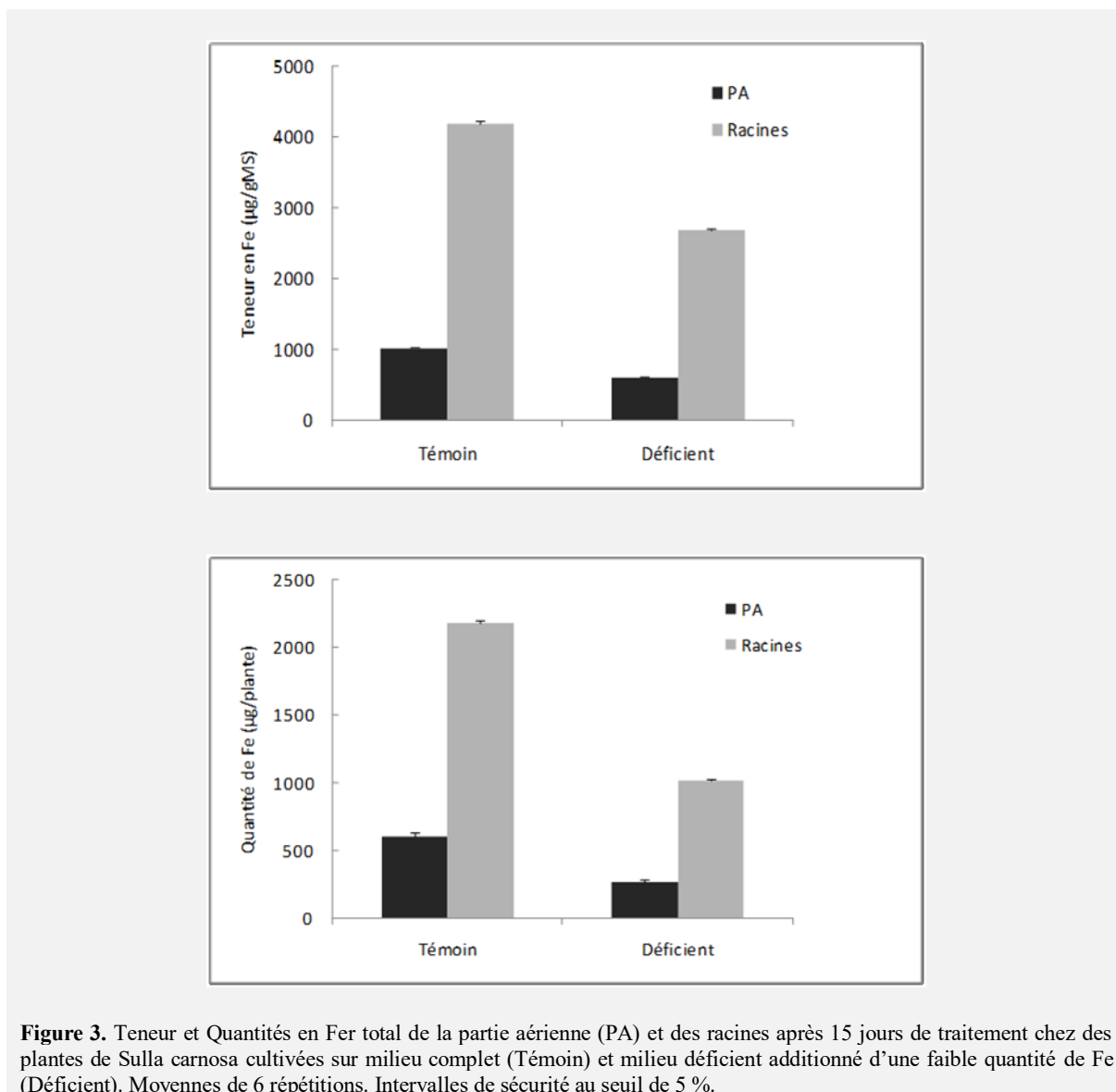


Figure 3. Teneur et Quantités en Fer total de la partie aérienne (PA) et des racines après 15 jours de traitement chez des plantes de *Sulla carnosa* cultivées sur milieu complet (Témoin) et milieu déficient additionné d'une faible quantité de Fe (Déficient). Moyennes de 6 répétitions. Intervalles de sécurité au seuil de 5 %.

Nos résultats ont montré que la déficience ferrique a entraîné une baisse des teneurs en Fe total chez les plantes déficientes de *Sulla carnosa* à la fois au niveau de la partie aérienne et racinaire. De même, l'effet de cette contrainte sur les quantités de Fe montre des variations étroitement liées au degré de sensibilité, notamment au niveau des racines reflétant essentiellement une limitation de prélèvements réalisés par les plantes sur milieux déficients (Fig. 3). Ce comportement des plantes déficientes peut être expliqué par le fait que l'efficacité d'utilisation du Fe au niveau de la partie aérienne est meilleure chez les plantes témoins pourvues. Ce critère est à l'origine de la capacité de maintenir la croissance et de préserver une concentration adéquate en chlorophylles chez les plantes pourvues en Fe (Témoin). La capacité de certains génotypes à modifier la répartition du Fe entre les différents organes en condition d'alimentation limitée en ce nutriment semble expliquer leur performance relative (Dasgan et al. 2003). Ceci suggère que la tolérance relative de *Sulla Carnosa* est fort probablement liée à son aptitude à assurer

une alimentation convenable en Fe à ses feuilles jeunes. En effet, en condition de déficience ferrique, les feuilles deviennent les sites préférentiels d'accumulation du Fe aux dépens des autres organes surtout les racines. Cette différence génotypique peut souligner l'importance de la compartimentation du Fe dans les tissus foliaire et de sa disponibilité physiologique (Dasgan et al. 2003). Dans ce contexte, Nikolic et Kastori, 2000 ont montré que la chlorose ferrique pourrait résulter d'un déficit en Fe bivalent nécessaire pour la biosynthèse de chlorophylles. Ces résultats sont également en accord avec d'autres précédemment décrits chez la tomate (Dasgan et al. 2003), le maïs (Tewari et al. 2005) et la vigne (Ksouri et al. 2007).

3.4. Nutrition potassique

L'examen de la figure 4 qui présente les teneurs en potassium accumulées dans les différents organes montrent que cet élément est plus pourvu dans la PA que dans les racines. Les teneurs en cet élément dans la PA subissent une réduction significative avec un taux de réduction de 30 %. Quand aux racines, au contraire, on a enregistré une stimulation sous condition de déficience ferrique avec un taux d'augmentation de l'ordre de 102%, en comparaison avec le témoin (Fig 4). Cependant, il est important à signaler que la déficience en Fe n'a aucun effet sur les quantités de cet élément pour la PA. Toutefois, une réduction significative a été notée au niveau des racines et qui est de l'ordre de 57% (Fig 4).

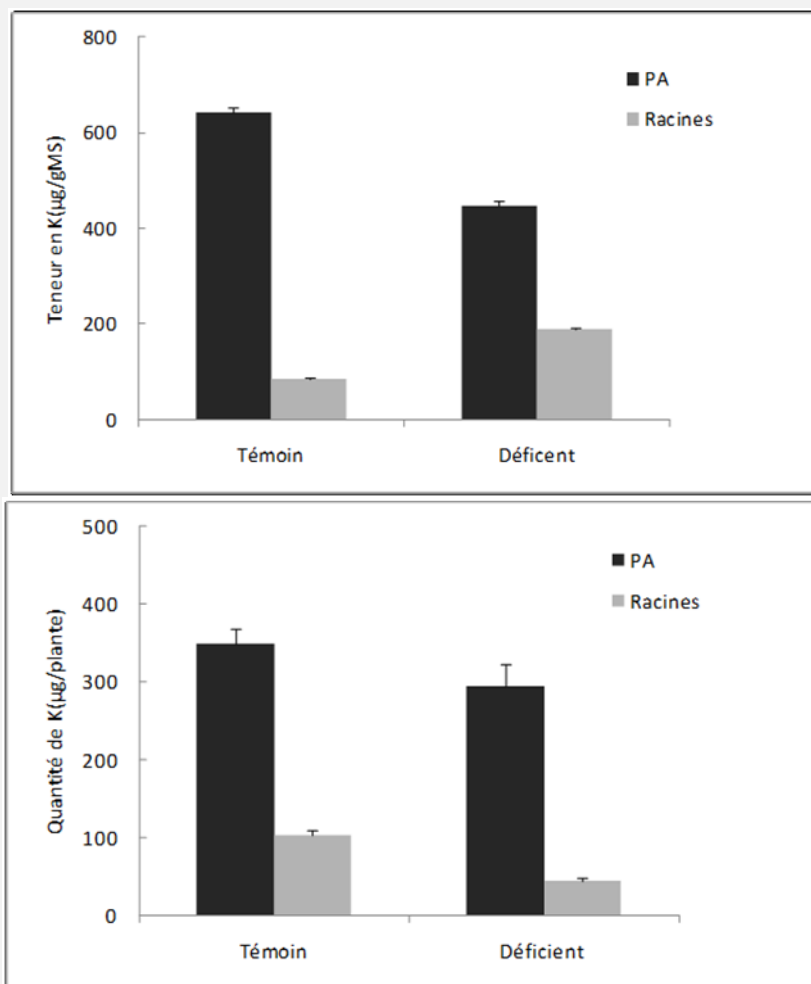


Figure 4. Teneur et Quantités en potassium de la partie aérienne (PA) et des racines après 15 jours de traitement chez des plantes de *Sulla carnosa* cultivées sur milieu complet (Témoin) et milieu déficient additionné d'une faible quantité de Fe (Déficient). Moyennes de 6 répétitions. Intervalles de sécurité au seuil de 5 %.

La réduction des teneurs et des quantités de potassium au niveau de la PA des plantes déficientes de *Sulla Carnosa* peut être expliqué par le maintien de la production de la biomasse. Toutefois, l'élévation de la teneur en cet élément dans les racines contre la diminution de sa quantité (Figure 4) peut être

expliquée par sa dilution dans la biomasse. Le même comportement a été trouvé chez le poirier (López-Millán et al. 2001). Outre, il a été décrit par plusieurs auteurs que la contrainte ferrique imposée par l'absence du Fe augmente les teneurs en K^+ et diminue celles de Ca^{2+} ce qui conduit à une augmentation du rapport K/Ca (Abadia et al. 2002). L'implication du potassium dans la synthèse protéique et d'autres composantes de la croissance (dont l'expansion foliaire) est bien élucidée et l'enrichissement des feuilles en cet élément en conditions de déficience ferrique peut constituer une caractéristique des plantes tolérantes à cette contrainte nutritionnelle (López-Millán et al. 2001).

3.5. Teneur en MDA

L'évaluation du stress oxydatif est faite généralement par la détermination des produits de dommage. Parmi les différents dérivés lipidiques qui peuvent être déterminés nous avons les aldéhydes comme le dialdéhydemalonique (MDA). Dans notre travail, les teneurs en MDA mesuré par la concentration du complexe MDA-TBA formé, augmentent chez *Sulla carnosa* sous conditions de déficience ferrique. En faite, on a noté une accumulation plus importante de MDA (+81%) chez les plantes déficientes en comparaison avec le témoin (Fig 5).

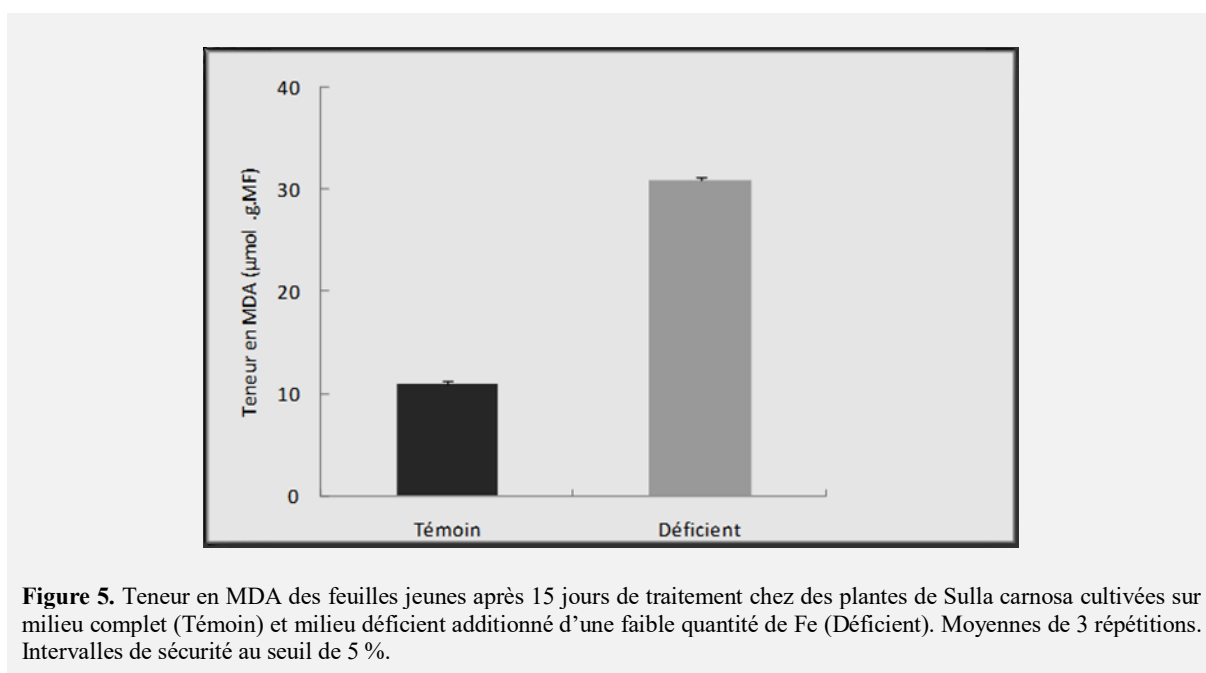


Figure 5. Teneur en MDA des feuilles jeunes après 15 jours de traitement chez des plantes de *Sulla carnosa* cultivées sur milieu complet (Témoin) et milieu déficient additionné d'une faible quantité de Fe (Déficient). Moyennes de 3 répétitions. Intervalles de sécurité au seuil de 5 %.

La peroxydation des lipides (MDA) est un symptôme attribué au dommage oxydatif et est souvent utilisée comme outil pour évaluer la sévérité du stress oxydatif et le degré de sensibilité des plantes, comme il est le cas pour d'autres contraintes abiotiques (Ranieri et al. 2003). Nos résultats ont montré une accumulation de MDA au niveau des feuilles jeunes des plantes déficientes de *Sulla carnosa*. Il est important à signaler, que cette accumulation peut être considérée comme un outil de tolérance envisagé par cette espèce vis-à-vis de la contrainte ferrique, malgré qu'elle est qualifiée de baisse en comparaison avec d'autres légumineuse (M'sehli 2008; jelali et al. 2011).

3.6. L'activité antioxydante

Comme le montre le tableau ci-dessous, on a noté tout d'abord que parmi les 4 solvants utilisés, le méthanol a donné la valeur d'activité antioxydante la plus élevée et qui est de l'ordre de 26 mg d'Equivalent d'acide gallique. Concernant l'effet de la contrainte ferrique sur cette activité, on a enregistré comme il est le cas pour la teneur en MDA, une stimulation de l'activité antioxydante totale avec un taux d'augmentation de 68% pour le solvant qui donne le meilleur rendement et qui est l'éthanol.

Tableau 1. L'activité antioxydante totale (exprimé en mg d'Equivalent d'acide gallique/MS chez des plantes de *Sulla carnosa* cultivées sur milieu complet (Témoin) et milieu déficient additionné d'une faible quantité de Fe (Déficient). Moyennes de 3 répétitions. Intervalles de sécurité au seuil de 5 %.

Solvant	Activité antioxydante totale	
	Témoin	Déficient
Acetone	11.7	23
Methanol	16.3	27
Hexane	4.5	7.8
Ethanol	14	29

Par ailleurs, la contrainte ferrique a provoqué une stimulation de l'activité antioxydante totale chez *Sulla carnosa*, ce qui confirme les résultats de la teneur en MDA et explique sa protection meilleure contre le dommage du stress oxydatif. Dans ce contexte, Dasgan et al. (2003), a montré que la variété de tomate Pakmor (tolérante) a une activité antioxydante beaucoup plus importante (trois fois plus élevé) que la variété Target (sensible) sous déficience ferrique. De même, Iturbe-Ormaetxe et al. (1995) ont trouvé que l'activité antioxydante a été stimulée par la contrainte ferrique chez le pois. Ces données ont été confirmées plus tard avec Jelali et al. (2011) qui a travaillé sur l'effet de la déficience ferrique chez deux cultivars de petit pois cultivé en Tunisie. Les auteurs ont noté que la tolérance relative du cultivar Kelvedon est reliée à une meilleure stimulation de l'activité antioxydante, en comparaison avec celui du sensible Lincoln.

4. Conclusion

Nos résultats montrent une tolérance relative de *Sulla carnosa* à la déficience ferrique et en particulier à l'approvisionnement en Fe en faible quantité. Plusieurs traits peuvent être associés à la tolérance relative de cette variété qui se distingue essentiellement par une meilleure aptitude à assurer une alimentation convenable en Fe au niveau la partie aérienne en augmentant la part du Fe alloué à ces organes. Ceci se traduit par une préservation de l'intégrité de son photosystème et un maintien de la croissance racinaire assurant ainsi une alimentation adéquate en éléments minéraux tel que le potassium. De plus, cette espèce étudiée est dotée d'une capacité à maintenir une activité enzymatique antioxydante assez élevé en comparaison avec les plantes témoins. D'autres investigations sont nécessaires pour étudier la nature des différences biochimiques et anatomiques qui se passent au niveau des feuilles soumises à des conditions de déficience ferrique. Des travaux supplémentaires peuvent aussi être dirigés pour l'identification des enzymes qui sont impliqués dans le système de défense intrinsèque contre les EOR et l'effet de la déficience ferrique sur l'activité de ces enzymes.

5. Références

- Abadía J, López-Millán AF, Rombolà A, Abadia A (2002)** Organic acids and Fe deficiency: a review. *Plant Soil* 00241: 75–86.
- Bavaresco L, Poni S (2003)** Effects of calcareous soil on photosynthesis rate, mineral nutrition, and source-sink ratio of table grape. *J Plan Nutr* 26: 2123-2135.
- Briat JF (2007)** Iron dynamics in plants. In: Kader JC, Delseny M (ed) *Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology*, 46 pp 138–169.
- Dasgan H Y, Ozturk L, Abak K, Cakmak I (2003)** Activities of iron-containing enzymes in leaves of two tomato genotypes differing in their resistance to Fe chlorosis. *J Plant Nutr* 26: 1997-2007.
- Dell'Orto M, De Nisi P, Pontiggia A, Zocchi G (2003)** Fe deficiency responses in *Parietaria diffusa*: a calcicole plant. *J Plant Nutr* 26: 2057-2068.
- De La Guardia MD, Felipe A, Alcantara E, Fournier JM, Romera FJ (1995)** Evaluation of experimental peach rootstocks in nutrient solutions for tolerance to iron stress. In Abadia J (ed) *Iron Nutrition in Soils and Plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 201-205.

- De La Guardia MD, Alcantara E (2002)** A comparison of ferric-chelate and chlorophyll and growth ratios as indices of selection of quince, pear, and olive genotypes under iron deficiency stress. *Plant Soil* 241: 49-56.
- Falleh H, Jalleli I, Ksouri R, Boulaaba M, Guyot S, Magné C, Abdely C (2011)** Effect of salt treatment on phenolic compounds and antioxidant activity of two *Mesembryanthemum edule* provenances. *Plant Physiology and Biochemistry* 52: 1-8.
- Grusak MA (1995)** Whole-root iron (III)-reductase activity throughout the life cycle of iron-grown *Pisium sativum*: relevance to the iron nutrition of developing seeds. *Planta* 97: 111-117.
- Hernandez JA, Almansa MS (2002)** Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum* 115: 251-257.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950)** The water-culture method for growing plants without soils. *Calif Agr Expt Sta Circ* 347.
- Iturbe-Ormaetxe I, Moran JF, Arrese-Igor C, Gogorcena Y, Klucas RV, Becana M (1995)** Activated oxygen and antioxidant defences in iron-deficient pea plants. *Plant Cell Environ* 18: 421-429.
- Jelali N, Salah IB, M'sehli W, Donnini S, Graziano Z, and Gharsalli M (2011)** Comparison of Tree Pea Cultivars (*Pisum sativum*) Regarding Their Responses to Direct and Bicarbonate-Induced Iron Deficiency. *Sci Hort* 129: 548-553.
- Jelali N, Donnini S, Dell'Orto M, Abdely C, Gharsalli M, Zocchi G (2014)** Root antioxidant responses of two *Pisum sativum* cultivars to direct and induced Fe deficiency. *Plant Bio* 16 (3): 607-614.
- Ksouri R, Debez A, Mahmoudi H, Ouerghi Z, Gharsalli M, Lachaâl M (2007)** Genotypic variability within Tunisian grapevine varieties (*Vitis vinifera* L.) facing bicarbonate-induced iron deficiency. *Plant Physiol Biochem*: 1-8.
- Larbi A, Abadia A, Abadia J, Morales F (2006)** Down co-regulation of light absorption, and carboxylation in Fe-deficient plants growing in different environments. *Photosynth Res* 89: 113-126.
- López-Millán AF, Morales F, Abadia A, Abadia J (2001)** Iron deficiency-associated changes in the composition of the leaf apoplastic fluid from field-grown pear (*Pyrus communis* L.) trees. *J Exp Bot* 52: 1489-1498.
- Mahmoudi H, Ksouri R, Gharsalli M, Lachaâl M (2005)** Differences in responses to iron deficiency between two legumes: lentil (*Lens culinaris*) and chickpea (*Cicer arietinum*). *J Plant Physiol* 162: 1237-1245.
- M'sehli W, Youssfi S, Donnini S, Dell'Orto M, De Nizi P, Zocchi G, Abdely C, Gharsalli M (2008)** Root exudation and rhizosphere acidification in response to iron deficiency of two lines of *Medicago ciliaris*. *Plant and Soil* 312: 151-162.
- Nikolic M, Kastori R (2000)** Effect of bicarbonate and Fe supply on Fe nutrition of grapevine. *J Plant Nutr* 23: 1619-1627.
- Pestana M, De Varennes A, Abadia J, Faria EA (2005)** Differential tolerance to iron deficiency of citrus rootstocks grown in nutrient solution. *Sci Hort* 1004: 25-36.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M (1999)** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analyt Biochem* 269:337-341.
- Ranieiri A, Castagna A, Baldan B, Sebastiani L, Soltadini GF (2003)** H₂O₂ accumulation in sunflower leaves as a consequence of iron deprivation. *J. Plant Nutr* 26: 2187-2196.
- Tewari RJ, Kumar P, Parma NSN (2005)** Signs of oxidative stress in the chlorotic leaves of iron starved plants. *Plant Science* 169: 1037-1045.
- Torrecillas A, León A, Del Amor F, Martinez-Mompean MC (1984)** Determination rapida de clorofila en discos foliares de limonero. *Fruits* 39: 617-622.
- Zocchi G, De Nisi P, Dell'Orto M, Espen L, Gallina PM (2007)** Iron deficiency differently affects metabolic responses in soybean roots. *J Exp Bot*: 1-8.
- Zuo Y, Ren L, Zhang F, Jiang RF (2007)** Bicarbonate concentration as affected by soil water content controls iron nutrition of peanut in a calcareous soil. *Plant Physiol Biochem* 34: 46-57.