

**UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

**Département de biotechnologie**

## **THESE DE DOCTORAT**

**Spécialité: Amélioration des productions végétales**

**ETUDE DES MARQUEURS MORPHOLOGIQUES, BIOCHIMIQUES ET  
MOLECULAIRES DES GENOTYPES D'*OPUNTIA*, EN RELATION AVEC LE  
DEVELOPPEMENT DANS DES CONDITIONS DE STRESS SALIN**

**Par**

**Bahia LALLOUCHE**

Devant le jury composé de :

M. BENMOUSSA	Professeur, U. de Blida 1	Président
A. BOUTEKRABT	Professeur, U. de Blida 1	Promoteur
M. BOUDJENIBA	Professeur, ENS. Kouba	Examineur
H. ABDELKRIM	Professeur, ENSA. Alger	Examineur
M. LAZALI	Maître de conférences, U. Khemis M.	Examineur
M. N. BOUKHATEM	Maître de conférences, U. de Blida 1	Examineur

Blida, 20 Mars 2018 à 10h00

**UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1**

**Faculté des sciences de la nature et de la vie**

**Département de biotechnologie**

## **THESE DE DOCTORAT**

**Spécialité: Amélioration des productions végétales**

**ETUDE DES MARQUEURS MORPHOLOGIQUES, BIOCHIMIQUES ET  
MOLECULAIRES DES GENOTYPES D'*OPUNTIA*, EN RELATION AVEC LE  
DEVELOPPEMENT DANS DES CONDITIONS DE STRESS SALIN**

**Par**

**Bahia LALLOUCHE**

Devant le jury composé de :

M. BENMOUSSA	Professeur, U. de Blida 1	Président
A. BOUTEKRABT	Professeur, U. de Blida 1	Promoteur
M. BOUDJENIBA	Professeur, ENS. Kouba	Examineur
H. ABDELKRIM	Professeur, ENSA. Alger	Examineur
M. LAZALI	Maître de conférences, U. Khemis M.	Examineur
M. N. BOUKHATEM	Maître de conférences, U. de Blida 1	Examineur

Blida, Novembre 2017

## ملخص

يؤثر الإجهاد الملحي تأثيراً سلبياً على نمو النبات وتنميته، وهو تحد كبير للزراعة. التين الشوكي، نبات يتكيف بشكل جيد مع الجفاف يسهم في تثمين التربة الفقيرة. إن اختيار الأنماط الجينية من التين الشوكي الملائمة و المناسبة، و ذلك باستعمال الخصائص المورفولوجية، الفسيولوجية، البيوكيميائية والجزيئية كمعلومات للتكيف ضروري لتثمين الموارد الجينية لهذا النوع من النبات. من أجل اختيار أنواع من التين الشوكي مقاومة للملوحة وتحديد المعايير الأكثر تميزاً وخصائص المقاومة، و كدراسة أولية، قمنا بتحليل وتقييم، سلوك خمسة (5) أنواع من التين الشوكي:

(*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, *O. amycteleae*, *O. streptacantha*, *O. robusta* var. *robusta* et *O. engelmannii* var. *longuiformis*) في ما يتعلق بالإجهاد الملحي. و لهذا الغرض، قمنا بغرس أظلاف متجانسة من الأنواع المذكورة سابقاً، و ذلك في أكياس بلاستيكية زراعية مليئة بالرمل، حيث تم سقيها أسبوعياً بواسطة مياه الشرب. كما أننا بدأنا في تطبيق الإجهاد الملحي فقط بعد ظهور الظلف الطري (في السنة الثانية بعد زراعة الأظلاف). حيث تم تطبيق أربعة مستويات من الإجهاد الملحي و ذلك باستعمال كلوريد الصوديوم: 0 (الشاهد)، 200 ملي مول، 400 ملي مول و 600 ملي مول لمدة 60 يوماً. تم قياس وتحليل 32 خاصية مورفولوجية، فزيولوجية و بيوكيميائية. و أظهرت النتائج أن إجهاد الملح له تأثير سلبي على نمو وتطور هذه الأنواع المختلفة من الصبار، بدرجات متفاوتة اعتماداً على النوع و العضو المدروس ومستوى الإجهاد الملحي المطبق. كما لاحظنا إنخفاض في عدد صبغيات الكلوروفيل ومحتويات المياه النسبية على مستوى الظلف. في حين أن نسب الصوديوم، البوتاسيوم، الكالسيوم، البرولين والسكريات القابلة للذوبان ازدادت عند جميع الأنواع المدروسة تحت تأثير الملوحة. و بعد تحليل النتائج ومقارنتها لوحظ، أن وزن الظلف الصغير يعتبر علامة إجهاد ملحي مورفولوجية، ومحتويات الكلوروفيل الكلي في الظلف الكبير و الصغير مستويات الكلوروفيل "أ" ومحتوى المياه النسبية على مستوى الظلف الكبير تعتبر علامات فسيولوجية للإجهاد الملحي، كما لاحظنا أن نسبة الصوديوم في الظلف تعتبر علامة للإجهاد الملحي المعدني. أما بالنسبة للإجهاد الملحي الحاد لوحظ أن علامة التمايز بين أنواع التين الشوكي المدروسة هو نسبة اليخضور (أ) المتواجدة في الظلف الكبير والصغير، كما أن تحليل المكونات الرئيسية أكدت لنا النتائج المحصل عليها سابقاً. أما فيما يخص التصنيف الهرمي التصاعدي فيجب النظر في كل مستوى من مستويات الإجهاد الملحي على حدى. حيث أن النتائج المحصل عليها بينت أن غالبية الأنواع المدروسة أظهرت مقاومة للملوحة على المستوى الأول (200 مل مول) والثاني (400 مل مول). وعلى العكس من ذلك فإنه على المستوى الثالث من الإجهاد الملحي (600 مل مول) سجلنا ثلاثة أصناف مختلفة، الصنف الأول مقاوم جداً ويضم النوع (*O. engelmannii*)، والثاني يتميز بمقاومة متوسطة ويضم النوع (*O. streptacantha*)، والثالث حساس ويضم النوع (*O. ficus indica*). كما إستنتجنا أن النوع (*O. engelmannii*) مقاوماً جداً مقارنة بالوعين (*O. amycteleae* و *O. robusta*) اللذين يعتبران حساسين للملوحة، حيث يعود سبب تحمل النوع (*O. engelmannii*) للإجهاد الملحي، قدرته على تخزين السكريات والبرولين في مختلف أجزائها وبهذا تعتبر هذه الخصائص كمعلومات فزيولوجية وبيوكيميائية مقاومة لدرجة الملوحة مما قد يسمح باستعمالها في برنامج إنتقاء أنواع الصبار. إن تحليل مقاطع (RAPD) بالنسبة لكل الأنواع المدروسة ومستويات الإجهاد الملحي المدروسة بينت أن هناك إختلاف على مستوى المعلومات الجينية وذلك بين مختلف الأنواع المدروسة، ونتيجة لذلك سجلنا ظهور بعض المعلومات على مستوى الشاهد وبعد تطبيق الإجهاد الملحي، كما أن بعض المعلومات لوحظت على مستوى الشاهد فقط، وأخرى جديدة ظهرت عند الأنواع المجهد. بالنسبة للنوع (*O. engelmannii*)

تحت إجهاد 600 مل مول سجلنا ظهور ثلاثة معلمات جديدة خاصة بمقاومة الإجهاد الملحي. من خلال هذا العمل نستخلص أن الخمسة عشر (15) معلمة جينية التي ظهرت عند أنواع التين الشوكي المدروسة قد تكون جد مفيدة في إنتقاء أنواع التين الشوكي المقاومة للملوحة.

**الكلمات المفتاحية:** التين الشوكي، الإجهاد الملحي، الخصائص المورفولوجية، الخصائص البيوكيميائية، الخصائص فسيولوجية، الحمض النووي، إختلاف جيني.

## RESUME

Le stress salin a un impact négatif sur la croissance et le développement végétal et constitue un défi agronomique majeur. L'*Opuntia*, plante bien adaptée à l'aridité contribue à la valorisation des sols marginaux. La sélection de génotypes appropriés par les marqueurs morpho-physiologiques, biochimiques et moléculaires est indispensable pour la valorisation des ressources génétiques de ce genre. Afin de sélectionner des espèces d'*Opuntia* tolérante à la salinité et identifier les paramètres les plus discriminants et les marqueurs de tolérance, nous avons analysé et évalué, en guise de prospection préliminaire, le comportement de cinq espèces d'*Opuntia* (*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, *O. amycleae*, *O. streptacantha*, *O. robusta* var. *robusta* et *O. engelmannii* var. *longuiformis*) vis-à-vis d'une contrainte saline. À cet effet, des cladodes homogènes, sont cultivés en pots remplis de sable inerte et arrosées de manière hebdomadaire par l'eau du robinet. Le stress salin n'est appliqué qu'après l'apparition des cladodes jeunes. Quatre concentrations de NaCl 0 (témoin), 200 mM, 400 mM et 600 mM ont été appliqués pendant 60 jours. Trente-deux paramètres morpho-physiologiques et biochimiques ont été analysés. Les résultats ont montré que le stress salin a un effet dépressif sur la croissance et le développement des différentes espèces d'*Opuntia* étudiées. Les pigments chlorophylliens et les teneurs relatives en eau sont également réduits. Tandis que celle en  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , proline et en sucres solubles augmentent. D'après l'analyse et la comparaison de  $F_{\text{observé}}$ , le poids frais des cladodes jeunes admis comme marqueur morphologique de stress, les teneurs en chlorophylle totale et « a » au niveau des cladodes jeunes sont admises comme marqueurs physiologiques de stress, la teneur en  $\text{K}^+$  dans la partie aérienne est admise comme marqueur minéral de stress, la teneur relative en eau au niveau des cladodes âgées est admise comme marqueur hydrique de stress. Parmi les composés azotés et les composés carbonyliques étudiés, la teneur en sucre soluble totale au niveau des cladodes jeunes est admise comme marqueur biochimique de tolérance à la salinité. L'intégration de l'ensemble des paramètres étudiés précédemment, montre que certains d'eux discriminent nettement entre le comportement des espèces d'*Opuntia* étudiées, sous stress sévère (600 mM), d'autres le sont sous stress faible (200 mM) ou sous stress modéré (400 mM). En effet, sous stress salin faible, la teneur en chlorophylle totale au niveau des cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant. Sous stress salin

modéré, les résultats montrent que la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes est plus discriminante. Alors que sous stress salin sévère, la teneur en chlorophylle « a » dans les cladodes jeunes est plus discriminante. L'Analyse en Composantes Principales a confirmé les résultats cités précédemment. La Classification Ascendante Hiérarchique doit considérer chaque niveau de stress séparément. Les résultats obtenus suivant cette stratégie montrent que sous stress faible et modéré la majorité des espèces sont résistantes, alors que sous stress sévère, 3 groupes peuvent être distingués ; le premier plus tolérant au sel comprend l'*O. engelmannii*, le deuxième moyennement tolérant comprend l'*O. streptacantha* et le dernier sensible comprend l'*O. ficus indica*. Nous avons constaté que l'*O. engelmannii*, est plus tolérante au stress salin que les espèces jugées sensibles l'*O. robusta* et l'*O. amyckae* qui ont totalement affectée par le stress salin. Ainsi, d'après nos analyses, il s'avère que le degré de tolérance de l'*O. engelmannii* est étroitement reposante sur son aptitude à maintenir l'activité photosynthétique et sa capacité d'accumulation de sucres solubles et de proline. L'analyse des profils RAPD générés pour l'ensemble des espèces et des variations épi-génétiques en conditions de stress salin indique la présence de différences de marqueurs entre les plantes témoins (0 mM) et stressées (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl). En effet, certaines bandes sont présentes aussi bien chez les plantes témoins que chez celles qui sont stressées, d'autres sont révélés que chez les témoins et de nouvelles bandes apparaissent chez les plantes stressées. L'ADN obtenu à partir des plantes de l'*O. engelmannii* sous stress sévère 600 mM enregistre l'apparition de trois bandes spécifiques de la tolérance à la salinité. Le présent cas d'études nous indique qu'une concentration égale à 600 mM est une concentration inductrice de variations épi-génétiques. Les 15 marqueurs spécifiques détectés dans le cadre de ce travail pourraient être fortement utiles dans les études de sélection assistée par marqueurs en condition de stress salin chez l'*Opuntia*.

**Mots-clés:** *Opuntia*, stress salin, marqueur morphologique, marqueur physiologique, marqueur biochimique, RAPD, variation épi-génétiques.

## ABSTRACT

Salt stress has a negative impact on growth and plant development and is a major agronomic challenge. *Opuntia*, a plant well adapted to aridity contributes to the development of marginal soils. The selection of appropriate genotypes by morpho-physiological, biochemical and molecular markers is essential for the valorization of genetic resources of this genus. In order to select Salt-tolerant *Opuntia* species and to identify the most discriminating parameters and tolerance markers, we analyzed and evaluated, as a preliminary survey, the behavior of five species of *Opuntia* (*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, *O. amyacleae*, *O. streptacantha*, *O. robusta* var. *robusta* et *O. engelmannii* var. *longuiformis*) against salt stress. For this purpose, homogeneous cladodes are grown in pots filled with inert sand and watered weekly with tap water. Salt stress is only applied after the appearance of young cladodes. Four concentrations of 0 (control) NaCl, 200 mM, 400 mM and 600 mM were applied for 60 days. Thirty-two morpho-physiological and biochemical parameters were analyzed. The results showed that salt stress has a depressive effect on the growth and development among the studied *Opuntia* species. The chlorophyll pigments and the relative water contents are also reduced. While we noticed a clear increase in  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , proline and soluble sugars. According to the analysis and comparison of  $F_{\text{observed}}$ , the fresh weight of the young cladodes admitted as morphological markers of stress, the total chlorophyll and "a" contents at the level of the young cladodes are admitted as physiological markers of stress.  $\text{K}^+$  in the aerial part is admitted as a mineral stress marker, the relative water content in the aged cladodes is allowed as water stress marker. Among the nitrogen compounds and the carbonyl compounds studied, the total soluble sugar content in the young cladodes is accepted as a biochemical marker of salinity tolerance. The integration of all the parameters studied previously, shows that some of them discriminate clearly between the behavior of the studied *Opuntia* species, under severe stress (600 mM), others are under low stress (200 mM) or under moderate stress (400 mM). Indeed, under low salt stress, the total chlorophyll content for young cladodes is the most discriminating parameter. Under moderate salt stress, the results show that the total chlorophyll content in young cladodes is more discriminating. While under severe salt stress, chlorophyll content "a" in young cladodes is more discriminating. The Principal Components Analysis confirmed the results mentioned above. The Hierarchical

Ascending Classification must consider each level of stress separately. The results obtained according to this strategy show that under low and moderate stress the majority of species are resistant, whereas under severe stress, 3 classes can be distinguished; the first more salt tolerant includes *O. engelmannii*, the second moderately tolerant comprises *O. srepacantha* and the last sensible includes the *O. ficus indica*. We found that the *O. engelmannii*, is more tolerant to salt stress than *O. robusta* and *O. amyckae*, these two species are considered sensitive and totally affected by salt stress. Thus, according to our analyzes, it appears that the degree of tolerance of *O. engelmannii* is closely based on its ability to maintain photosynthetic activity and its ability to accumulate soluble sugars and proline. The analysis of the RAPD profiles generated for all the species and epi-genetic variations under salt stress conditions indicates the presence of marker differences between the control (0 mM) and stressed (200 mM, 400 mM, 600 mMNaCl) plants. Indeed, some bands are present in both control and stressed plants, others are found in controls and new bands appear in stressed plants. The DNA obtained from the plants of *O. engelmannii* under severe stress 600 mM records the appearance of three specific bands of tolerance to salinity. This case study indicates that a concentration of 600 mM is an inducing concentration of epi-genetic variations. The 19 specific markers detected in this work could be of great value in *Opuntia's* salt-enhanced marker-assisted selection studies.

**Key words:** *Opuntia*, salt stress, morphological marker, physiological marker, biochemical marker, RAPD, epigenetic variation.



## REMERCIEMENTS

Mon premier remerciement est adressé à notre Dieu, qui grâce à lui j'ai pu poursuivre ce travail.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par **Pr. Ammar BOUTEKRABT**, Professeur à l'université de Saad Dehleb de Blida. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension et ses intérêts portés à ce sujet de recherche.

Je tiens à remercier tout spécialement **Dr. ZOGHLAMI Néjia**, Maître de Conférences au Laboratoire de Physiologie Moléculaire des Plantes (CBBC), qui malgré ses lourdes tâches m'a accueilli durant deux stages consécutifs dans les années 2014 et 2015 pour la réalisation de la partie Biologie moléculaire. Ses expertises dans les domaines de la biologie moléculaire et la bio-informatiques, sa rigueur scientifique, ainsi que sa gentillesse, son soutien moral, sa patience a grandement contribué à l'aboutissement de cette thèse. Je suis très reconnaissante et heureuse d'avoir eu l'occasion de travailler avec une personne avec si grand professionnalisme.

Mes remerciements les plus chaleureux au président du jury, **Pr. BENMOUSSA M.**, Professeur de Production végétale à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie- Université de Blida d'avoir eu l'amabilité d'accepter aimablement de critiquer et de juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honorée par sa participation au jury.

Je tiens à remercier également **Pr. BOUDJNEBA M.**, Professeur à l'E. N. S Kouba, d'avoir accepté, malgré ses préoccupations et ses tâches d'enseignement et d'encadrement, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Que **Pr. ABDELKRIM H.**, Professeur à ENSA. Alger, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail, je remercie également **Dr. LAZALI M.**, d'être parmi les examinateurs non seulement pour sa gentillesse, mais aussi pour sa grande disponibilité. Je remercie, infiniment **Dr BOUKHATEM M.N.** Maître de conférences à l'université de Blida pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **MLIKI Ahmed**, Directeur du Laboratoire de Physiologie Moléculaire des Plantes (LPMP) au Centre de Biotechnologie

de Borj-Cédria (CBBC) en Tunisie de m'avoir acceptée au sein de son Laboratoire et mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ce travail.

Je désire remercier également **BEN RHOMDHANE Mariame**, Thésard au Laboratoire Physiologie Moléculaire des Plantes (CBBC) pour son aide précieuse lors de la réalisation de l'analyse moléculaire.

Merci aussi à tous mes collègues et amis. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien.

Je dédie ce travail à mes parents, mes filles (**Kinana, Ithar et Ghofrane**) et toutes ma famille.

Ma profonde reconnaissance à mon cher époux **Mr. HADJKOUIDER Boubakr** pour son soutien sans faille, sa grande indulgence, sa compréhension et surtout sa contribution dans le partage de stress de la recherche.

Cette thèse m'a donné l'occasion de rencontrer et de travailler avec des personnes absolument épatantes. Il est difficile de leur dire ici à quel point j'ai été touchée par tout ce qu'ils ont fait pour moi.

## TABLE DES MATIERES

RESUME

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LE GENRE <i>OPUNTIA</i>	19
1.1 Origine	19
1.2 Répartition	20
1.3 Nom et classification	24
1.4 Description morphologique	25
1.5 Etablissement de plantation	27
1.6 Importance du genre <i>Opuntia</i>	29
CHAPITRE 2 : L'ETUDE DU STRESS SALIN CHEZ LES PLANTES	31
2.1 Salinité du sol	31
2.2 Les composantes de la contrainte saline	32
2.3 Mécanismes de tolérance à la salinité au niveau cellulaire	34
2.4 Comportement et capacité d'adaptation à la salinité	35
2.5 Les marqueurs RAPD " <i>Random Amplified Polymorphic ADN</i> "	39
CHAPITRE 3 : MATERIEL ET METHODES	41
Partie 1: Etude de l'effet du NaCl sur le comportement morpho-physiologique et biochimique de cinq espèces d' <i>Opuntia</i> et la recherche des marqueurs morphologique, physiologique et biochimique lié au stress	41
3.1.1 Introduction	41
3.1.2 Matériel végétal	41
3.1.3 Méthodes d'étude	42
3.1.4 Dispositif expérimental	43
3.1.5 Analyse morphologique de la diversité génétique en fonction de la salinité	43
3.1.6 Analyse physiologique de la diversité génétique en fonction de la salinité	45

3.1.7 Analyse biochimique de la diversité génétique en fonction de la salinité	47
3.1.8 Analyses statistiques des résultats	49
Partie 2 : Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de 32 paramètres morpho-physiologique et biochimique et évaluation de la tolérance de cinq espèces d' <i>Opuntia</i> au stress salin	50
3.2.1 Comparaison multiple des moyennes et $F_{\text{Observée}}$	50
3.2.2 Corrélation entre les paramètres	50
3.2.2 Analyse en Composante Principale (ACP)	50
3.2.3 Classification Hiérarchique Ascendante CHA	51
Partie 3 : Analyse de la diversité génétique et des variations épigénétiques chez différentes espèces d' <i>Opuntia</i> par les marqueurs moléculaires RAPD en réponse à la salinité	52
3.3.1 La technique RAPD	52
3.3.2 Migration électrophorétique	56
3.3.3 Optimisation des conditions de l'amplification PCR	56
3.3.4 Sélection des amorces	57
3.3.5 Conditions de l'amplification	57
3.3.6 Visualisation des produits d'amplification	57
3.3.7 Traitements statistiques des données expérimentales	58
 CHAPITRE 4 : RESULTATS ET DISCUSSION	 60
Partie I: Etude de l'effet du NaCl sur le comportement morpho-physiologique et biochimique de cinq espèces d' <i>Opuntia</i> et la recherche des marqueurs morphologique, physiologique et biochimique lié au stress	60
4.1.1 Les paramètres morphologiques	60
4.1.2 Les paramètres physiologiques	71
4.1.3 Les paramètres biochimiques	87
4.1.4 Discussion	93
Partie 2 : Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de 32 paramètres morpho-physiologique et biochimique et évaluation de la tolérance de cinq espèces d' <i>Opuntia</i> au stress salin	105
4.2.1 Comparaison multiple des moyennes et $F_{\text{Observée}}$	105
4.2.1.1 Stress 200 mM NaCl	105
4.2.1.2 Stress 400 mM NaCl	106
4.2.1.3 Stress 600 mM NaCl	107
4.2.2 Analyse en composantes principales (ACP)	108
4.2.2.1 Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de 32 paramètres morpho-physiologique et biochimique sous régime d'eau non saline (Témoin = 0 mM NaCl)	108
4.2.2.2 Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de 32 paramètres morpho-physiologique et biochimique sous régime d'eau faiblement saline (200 mM NaCl)	110
4.2.2.3 Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de 32 paramètres morpho-physiologique et biochimique sous régime d'eau modérément saline (400 mM NaCl)	112
4.2.2.4 Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de 32 paramètres morpho-physiologique et biochimique sous	

régime d'eau fortement saline (600 mM NaCl)	114
4.2.3 Evaluation de la tolérance de cinq espèces d' <i>Opuntia</i> au stress salin	117
4.2.3.1 Classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) sans stress « Témoin »	117
4.2.3.2 Classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) sous stress faible (200 mM NaCl)	118
4.2.3.3 Classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) sous stress modérée (400 mM NaCl)	119
4.2.3.4 Classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) sous stress sévère (600 mM NaCl)	120
4.2.4 Discussion	122
Partie 3: Analyse de la diversité génétique de cinq espèces d' <i>Opuntia</i> par les marqueurs moléculaires RAPD en réponse à la salinité	128
4.3.1 Sélection des amorces	128
4.3.2 Polymorphisme génétique liés aux marqueurs RAPD	131
4.3.3 Caractérisation des fragments par amorces	135
4.3.4 Visualisation de la structuration phylogénétique	142
4.3.5 Analyse Factorielle de Correspondances	144
4.3.6 Classification hiérarchique	145
4.3.7 Discussion	149
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE	 152
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
APPENDICES	

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Technique RAPD utilisée dans l'étude du polymorphisme génétique de différentes espèces d' <i>Opuntia</i>	40
Tableau 2.2	Marqueur RAPD liés au stress salin de différentes espèces d' <i>Opuntia</i>	40
Tableau 3.1	Composition de la solution TAE (x50)	55
Tableau 3.2	Composition du tampon de charge	56
Tableau 3.3	Liste des amorces utilisées dans les réactions RAPD	57
Tableau 4.1	Caractères morpho-physiologique et biochimiques de quatre espèces d' <i>Opuntia</i> après 60 jours de stress salin (0 et 200 mM)	99
Tableau 4.2	Caractères morpho-physiologique et biochimiques de quatre espèces d' <i>Opuntia</i> après 60 jours de stress salin (0 et 400 mM)	101
Tableau 4.3	Caractères morpho-physiologique et biochimiques de quatre espèces d' <i>Opuntia</i> après 60 jours de stress salin (0 et 600 mM)	103
Tableau 4.4	Valeurs propres	109
Tableau 4.5	Vecteurs propres	112
Tableau 4.6	Valeurs propres	114
Tableau 4.7	Valeurs propres	116
Tableau 4.8	Matrice de proximité (Distance euclidienne)	117
Tableau 4.9	Matrice de proximité (Distance euclidienne)	119
Tableau 4.10	Matrice de proximité (Distance euclidienne)	120
Tableau 4.11	Matrice de proximité (Distance euclidienne)	121
Tableau 4.12	Liste des amorces RAPD utilisées et qualité de leurs produits d'amplification	130
Tableau 4.13	Polymorphisme génétique généré à l'aide de 3 amorces RAPD chez les espèces d' <i>Opuntia</i> stressées aux différents niveaux de NaCl.	134
Tableau 4.14	Les marqueurs spécifiques induite par l'application du stress salin faible, modérée et sévère (200 mM, 400 mM et 600 mM)	142
Tableau 4.15	Distances génétiques calculées par paires de génotypes de cinq espèces d' <i>Opuntia</i> non stressées et stressées aux trois niveaux de NaCl en utilisant 57 marqueurs RAPD.	143

## LISTE DES FIGURES

Figure 3.1	Plantation des boutures (cladodes) dans le substrat	44
Figure 3.2	Dispositif expérimental	44
Figure 3.3	Les différents organes des plantes d' <i>Opuntia</i> destinées pour l'analyse morphologique physiologique biochimique et minérales	44
Figure 4.1	Variation relative du nombre de racines chez les quatre espèces d' <i>Opuntia</i> soumise à un stress salin (0, 200 mM, 400 mM, 600 mM) pendant 60 jours.	61
Figure 4.2	Variation de la longueur de racine après 60 jours de stress salin au NaCl.	62
Figure 4.3	Variation du poids frais des racines après 60 jours de stress salin au NaCl.	63
Figure 4.4	Variation de la longueur des cladodes âgées après 60 jours de stress salin au NaCl.	64
Figure 4.5	Variation de poids frais des cladodes âgées après 60 jours de stress salin au NaCl.	66
Figure 4.6	Variation de la longueur des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin au NaCl.	67
Figure 4.7	Variation du poids frais des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin au NaCl.	68
Figure 4.8	PFR/PFC après 60 jours de stress salin à NaCl.	69
Figure 4.9	Effet de NaCl sur l'ensemble des paramètres morphologique	70
Figure 4.10	Variation des teneurs en chlorophylle totale au niveau des cladodes âgées	71
Figure 4.11	Variation des teneurs en chlorophylle totale au niveau des cladodes jeunes	72
Figure 4.12	Teneurs en chlorophylle « a » au niveau des cladodes âgées	73
Figure 4.13	Variation des teneurs en chlorophylle « a » au niveau des cladodes jeunes.	74
Figure 4.14	Variation des teneurs en chlorophylle « b » au niveau des cladodes âgées.	75

Figure 4.15	Variation des teneurs en chlorophylle « <i>b</i> » au niveau des cladodes jeunes.	76
Figure 4.16	Teneur en Na <sup>+</sup> au niveau des racines en fonction de la salinité	77
Figure 4.17	Teneur en Na <sup>+</sup> au niveau des cladodes en fonction de la salinité	78
Figure 4.18	Teneur en K <sup>+</sup> au niveau des racines en fonction de la salinité	79
Figure 4.19	Teneur en K <sup>+</sup> au niveau des cladodes en fonction de la salinité	80
Figure 4.20	Teneur en Ca <sup>2+</sup> au niveau des cladodes en fonction de la salinité.	82
Figure 4.21	Rapport en K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> au niveau des racines en fonction de la salinité	83
Figure 4.22	Rapport en K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> au niveau des cladodes en fonction de la salinité	84
Figure 4.23	Teneur en eau (%) au niveau des cladodes âgées	85
Figure 4.24	Teneur relative en eau (%) au niveau des cladodes jeunes	86
Figure 4.25	Teneur en proline au niveau des racines	87
Figure 4.26	Teneur en proline au niveau des cladodes âgées	88
Figure 4.27	Teneur en proline au niveau des cladodes jeunes	89
Figure 4.28	Teneur en sucre soluble totale au niveau de racines en fonction de la salinité	90
Figure 4.29	Teneur en sucre soluble totale au niveau des cladodes âgées en fonction de la salinité	91
Figure 4.30	Teneur en sucre soluble totale au niveau des cladodes jeunes en fonction de la salinité.	92
Figure 4.31	Analyse en composantes principales, superposition des variables et les espèces sur les deux axes ACP1 et ACP2.	109
Figure 4.32	Analyse en composantes principales, Superposition des variables et les espèces sur les deux axes ACP1 et ACP2.	111
Figure 4.33	Analyse en composantes principales, Superposition des variables et les espèces sur les deux axes ACP1 et ACP2.	113
Figure 4.34	Analyse en composantes principales, superposition des variables et les espèces sur les deux axes ACP1 et ACP2.	115
Figure 4.35	Classification hiérarchique ascendante (CHA) des 5 espèces d' <i>Opuntia</i> suivant le critère d'agrégation des moyennes pondérées (UPGMA) sans effet du stress salin (Témoin)	118
Figure 4.36	Classification hiérarchique ascendante (CHA) des 5 espèces d' <i>Opuntia</i> suivant le critère d'agrégation des moyennes pondérées (UPGMA) sous stress faible (200 mM NaCl).	119



Figure 4.37	Classification hiérarchique ascendante (CHA) des 5 espèces d' <i>Opuntia</i> suivant le critère d'agrégation des moyennes pondérées (UPGMA) sous l'effet du troisième niveau du salin (400 mM).	120
Figure 4.38	Classification hiérarchique ascendante (CHA) des 5 espèces d' <i>Opuntia</i> suivant le critère d'agrégation des moyennes pondérées (UPGMA) sous l'effet du troisième niveau de stress salin (600 mM).	121
Figure 4.39	Sélection des amorces RAPD à partir de 16 génotypes d' <i>Opuntia</i>	129
Figure 4.40	Fragments d'amplification générée par les amorces UBC-226, UBC-231, 241 chez 5 espèces d' <i>Opuntia</i> stressées aux différents niveaux de NaCl. M : marqueur UBC- de taille 100 pb.	133
Figure 4.41	Fragments spécifiques générés par les amorces UBC-226 chez 5 espèces d' <i>Opuntia</i> stressées aux différents niveaux de NaCl. (200 mM, 400 mM, 600 mM).	135
Figure 4.42	Fragments spécifiques générés par les amorces UBC-231 chez 5 espèces d' <i>Opuntia</i> stressées aux différents niveaux de NaCl. (200 mM, 400 mM, 600 mM).	137
Figure 4.43	Fragments spécifiques générés par les amorces UBC-241 chez 5 espèces d' <i>Opuntia</i> stressées aux différents niveaux de NaCl (200 mM, 400 mM, 600 mM).	139
Figure 4.44	AFC réalisée sur les données de génotypes à l'aide de 57 marqueurs RAPD chez 16 génotypes d' <i>Opuntia</i> stressée aux différents niveaux de NaCl en fonction des axes 1 et 2.	145
Figure 4.45	Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques entre 5 espèces d' <i>Opuntia</i> non stressées et stressées (200, 400 et 600 mM NaCl) établies sur la base de 57 marqueurs RAPD. (De A à H : groupes et sous-groupes individualisés).	147
Figure 4.46	Représentation radiée montrant la singularité d' <i>O. engelmannii</i> var. <i>longuiformis</i> stressé à 600 mM NaCl détectée sur la base de 57 marqueurs RAPD	148

## INTRODUCTION

À ce jour, les contraintes environnementales, notamment la salinité, deviennent de plus en plus défavorables pour la majorité des plantes. A travers le monde, plus de 800 millions d'hectares de terre sont affectés par la salinisation [1], dont 80 % sont d'origine naturelle et 20 % d'origine anthropique [2]. En outre, 3 hectares des terres arables sont perdus chaque minute à cause de la salinité du sol [2] et ceci plus particulièrement dans les régions arides et semi arides du fait des déficits d'humidité consécutifs, à la forte évaporation de l'eau souterraine et à la mauvaise gestion de l'irrigation [3]. Dans les zones arides et semi arides, notamment du bassin méditerranéen, la salinisation des sols constitue l'un des facteurs abiotiques majeurs qui réduit les rendements agricoles de plusieurs cultures. En effet, la dégradation de la qualité des sols et des eaux suite à l'irrigation constitue un danger sérieux pour la durabilité de ce système d'exploitation des terres [4, 5].

En Algérie, plus de 20 % des sols irrigués sont affectés par le problème de la salinisation [6]. De ce fait, l'introduction de plantes tolérantes est l'une des techniques utilisées pour la valorisation notamment des sols marginaux. Dans ce contexte, l'*Opuntia* est une plante végétale pérenne qui présente une capacité de s'adapter à diverses conditions climatiques.

En Algérie comme dans la Méditerranée, différentes espèces d'*Opuntia* sont énumérées et font depuis plusieurs siècles une partie intégrante du paysage agricole. En effet, plusieurs sont traditionnellement utilisées pour séparer et protéger les parcelles. Mais, elles représentent aussi une source de fruit pour la consommation des paysans propriétaires et une source fourragère pour leurs élevages en période estivale notamment ou quand le fourrage se fait rare. De plus, sous cette forme de culture, ne demande aucun soin particulier. C'est une culture bénéfique et sans frais. Sa propagation traditionnelle est facile et se pratique par simple enfouissement des cladodes dans le sol. Par ailleurs, les cactus participent également à la stabilisation du sol et à la lutte efficace contre l'avancée du désert. En fait, l'Algérie qui a connu plusieurs années de sécheresse successives gagnerait à développer la culture de cette plante et à intensifier la vulgarisation de son

usage en tant que source fourragère et pourquoi pas son industrialisation et commercialisation. Cependant, le choix des espèces adaptées à chaque situation et de type de culture serait à notre avis la première préoccupation. Il serait donc intéressant de sélectionner parmi les ressources génétiques l'espèce appropriée. En plus, l'étude des effets de la salinité sur la croissance et le développement des plantes et la recherche des marqueurs de stress sont d'une grande importance dans la sélection des espèces tolérantes. En effet, la réponse des plantes au stress salin est multiforme et correspond à un caractère multigénique [7]. Il est donc nécessaire de disposer de marqueurs multiples et fiables qui permettent de caractériser les comportements de tolérance.

Cette thèse a pour objectifs l'évaluation de la variabilité morpho-physiologique, biochimique et moléculaire de 5 espèces d'*Opuntia* en condition de stress salin, pour la sélection d'espèces d'*Opuntia* tolérantes à la salinité.

Pour ce faire, quatre thématiques ont été développées:

- ◆ Etude de l'effet du stress salin sur les paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques de plants issus des cladodes chez les espèces « *Opuntia ficus indica* Mill. f. *inermis*, *Opuntia amyacleae*, *Opuntia streptacantha*, *Opuntia robusta* var. *robusta* et *Opuntia engelmannii* var. *longuiformis* » et ceci à différentes concentrations de NaCl (0, 200, 400 et 600 mM);

- ◆ Identification de marqueur morphologique, physiologique et biochimique qui pourrait être liés à la tolérance au stress salin;

- ◆ Identification des paramètres les plus discriminants sous chaque niveau du stress salin liés à la tolérance au sel en plus des marqueurs (morphologique, physiologique et biochimique) déterminés précédemment qui pourraient être utilisés dans les programmes de sélection;

◆ Caractérisation moléculaire et analyse de variations épi-génétiques des différentes espèces de cactus à l'aide des marqueurs moléculaires randomisés (RAPD) en condition de stress salin. Cette approche pourrait largement aider dans le développement des marqueurs de la MAS (Marker Assisted Selection) qui pourraient être intéressants pour l'amélioration des *opuntiatees* et des pratiques agricoles en général.

Ce travail a été conduit en parfaite collaboration entre le Laboratoire de Biotechnologie Végétale en Algérie pour les parties morphologique, physiologique et biochimique et le Laboratoire de Physiologie Moléculaire des Plantes (LPMP) du Centre de Biotechnologie de Borj Cedria (CBBC) en Tunisie pour la partie moléculaire.

## CHAPITRE 1

### GENERALITES SUR LE GENRE *OPUNTIA*

#### 1.1 Origine

*Opuntia* a été certainement connu au début du 16<sup>ème</sup> siècle [8], et on croit que cette espèce a accompagné Columbus dans son premier retour vers l'Espagne en 1493, à la fin du 15<sup>ème</sup> siècle [9], elle est connue sous le nom de « figue du diable » à cause de ses épines [10].

Les espèces sont également enregistrées dans la culture, dans le Tlaxcala au Mexique, en 1519 [11]. Il y a également de l'évidence pour l'usage de l'*Opuntia*, par le Nazca au Pérou, plaçant ces usines en Amérique du sud, à une date très précoce [12].

Au 15<sup>ème</sup> siècle les européennes utilisaient les jeunes raquettes [13]. Elles ont été largement incluses dans les magasins de bateaux, comme assurance contre le scorbut [12].

On pense que cette pratique a contribué considérablement à la gamme naturalisée actuelle de l'*Opuntia* dans tous les habitats arides et semi-arides du monde [8, 9].

Bien que la plupart des travaux récents concèdent que cette espèce n'est pas indigène au vieux monde, les origines géographiques et évolutives de l'*Opuntia* restent opacifiées dans l'obscurité [8].

Toutes les cactacées sont originaires du nouveau monde, quelques genres seulement, sont peut-être originaires de l'ancien monde [14].

Au 16<sup>ème</sup> siècle les européens considèrent que les usines sont indigènes aux Indes occidentales [10].

D'autres travaux, ont proposé que l'*Opuntia ficus indica* était un cultivar inerme dérivé de l'*Opuntia megacantha*, une espèce du Mexique central [11].

Un certain travail cytologique, propose que cet octoploid cultivé (*Opuntia ficus indica*) soit dérivé d'un ancêtre mexicain diploïde [6]. L'*Opuntia ficus indica* est indigène à l'habitat tropical doux de montagne, non désertique [15].

Il reste impossible de lui attribuer un lieu d'origine bien défini car on le rencontre dans toutes les régions chaudes et tempérées des deux amériques. Des restes de semences de fruits et quelques morceaux de Nopal (nom local du figuier de barbarie) ont été découverts au Mexique, depuis 700 ans, ce qui prouve que l'homme le connaît déjà à cette époque [9].

## **1.2 Répartition**

### **1.2.1 Répartition mondiale**

Parmi les Angiospermes, le Cactaceae est l'une des familles les plus distinctives et les plus réussies des usines du nouveau monde avec 1600 espèces [16]. Les régions de croissance importante sont le Mexique, la Sicile, le Chili, le Brésil, et l'Algérie font partie de l'Afrique nordique [17].

Dans leur pays d'origine, ils sont répandues sur la plus grande partie du sol américain [12]. Lopez-Garcia et al., (2001), ont proposé une approche plus large, ils ont défini quatre régions occupées par des *Opuntia* dont la superficie atteint 50 000 ha [17].

- Zone centrale méridionale : les principales espèces sont : *Opuntia ficus indica*, *Opuntia amyclaea*, *Opuntia mégacantha* et *Opuntia tomentosa*.
- Zone élevée de plateau : les principales espèces sont : *Opuntia leucotricha*, *Opuntia streptacantha*, *Opuntia robusta*, *Opuntia cantabrigiensis*.

- Zone du Nord : *Opuntia cantabrigiensis*, *Opuntia phaeacantha*, *Opuntia lindheimeri*, et *Opuntia rastrera*.
- Zone côtière du golfe du Mexique : *Opuntia lindheimeri*, *Opuntia leptocaulis*, *Opuntia microdasys*, *Opuntia imbricata*.

L'histoire de l'introduction de l'*Opuntia* de fourrage, au Brésil est une matière discutée, mais elle a été présentée probablement en 18<sup>ème</sup> siècle [18]. Les plus grands secteurs du monde de l'*Opuntia* cultivé, sont situés dans le nord-est semi-aride du Brésil, avec une prédominance de l'*Opuntia ficus indica* [19]. Dans le cadre des projets de la FAO/CIRGP/PNUÉ sur les ressources génétiques pour l'amélioration de la vie rurale dans les zones arides et semi-arides, ce projet a débuté en 1979, des plantations de cactus inermes destinées au broutement couvrent plus de 300 000 ha au Nord-Est du Brésil [20].

L'introduction de l'*Opuntia* en Asie a eu lieu à la fin du 17<sup>ème</sup> siècle. Sa présence est signalée aux Philippines dès 1695, en Chine en 1700 et en Inde vers 1780 [21].

En Palestine occupée, la culture de l'*Opuntia* est pratiquée de façon intensive et moderne avec des programmes de recherche et de développement pour la production fruitière et fourragère, ainsi que pour l'usage industriel [22].

Introduite en Europe vers le 15<sup>ème</sup> siècle [23]. En Espagne, elle a été introduite par les Conquistadores [23], aux alentours de 1500 [24]. PEDROA DE RIVERA, dans son voyage vers la nouvelle Espagne nordique au début du 18<sup>ème</sup> siècle, a rapporté, que dans la direction de San Juan Del Rio, Querétaro, il a trouvé la végétation épaisse de l'*Opuntia* [25].

En Sicile, l'*Opuntia* qui occupe près de 100 000 ha est destiné à la production fruitière et fourragère [10].

En Italie, il est cultivé sur une superficie de 1000 ha avec des programmes de fertilisation et d'irrigation annuelle [26].

En Afrique du sud l'*Opuntia* épineuse couvrait en 1942 une superficie importante avec près de 860.000 ha, il a été éliminé par l'introduction délibérée de deux cochenilles; *Cactoblatis cactorum* et *Dactylopus opuntia*; alors que l'*Opuntia* inerme résistant aux cochenilles, était sélectionné et multiplié dans les zones arides à des fins fourragères [11].

Présenté en Ethiopie à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, il est largement distribué dans les régions arides et semi-arides nordiques de l'Ethiopie [14]. La culture du cactus (*O. ficus indica*) est très répandue dans le Tigré, en Ethiopie du nord [26].

Il a été introduit par les espagnols, sur le pourtour de la Méditerranée et probablement à Madagascar, vers le 18<sup>ème</sup> siècle [27]. Dans le cadre des projets de la FAO/CIRGP/PNUE lancée en 1979, près de 100 000 ha d'*Opuntia* inerme ont été plantés au Sud-Ouest de Madagascar [26].

Il a été introduit en Afrique du nord vers le 16<sup>ème</sup> siècle. Sa plantation couvre environ 300 000 ha [25]. En Afrique du nord et au Proche-Orient, l'*Opuntia* est considéré actuellement comme une culture de subsistance importante. On estime que 700 000 à un million d'hectares ont été plantés [27]. Dans le cadre des projets de la FAO/CIRGP/PNUE lancé en 1979 près de 200000 ha d'*Opuntia* inerme ont été plantés en Afrique du nord [24].

En milieu méditerranéen, le figuier de barbarie fait depuis plusieurs siècles, partie intégrante du paysage des régions côtières et insulaires, comme en témoigne la facilité avec laquelle, il s'est adapté aux conditions climatiques. Il existe depuis longtemps de vastes zones de culture d'*Opuntia* en Algérie, au Maroc et en Tunisie [18].

La Tunisie dispose de 60 000 à 80 000 ha de cactus dont environ 35 000 ha sont plantés en zone steppique [10]. Une superficie importante est récemment plantée en Tunisie centrale; quelques 70 000 ha, dont 50 000 ha ont été plantés entre 1970 et 1975; cette superficie a évolué et a atteint environ 300 000 ha en 1996 [28] et atteint plus de 600 000 ha en 2015 [29].



Au Maroc, la majorité de la culture d'*Opuntia ficus indica* soit 85 % se trouve localisée au niveau de cinq grandes zones: Taounate (22230 ha); Chefchaouen (7050 ha); Al Hoceima (5000 ha); Ouzzane (3150 ha); Tétouan (2000 ha). Les autres plantations sont réparties entre Taza, Nador, Essaouira, El Jadida, Safi et d'autres régions [10]. Les superficies occupées ont triplé passant de 45.000 ha au début des années 1990, à plus de 150.000 ha actuellement [30].

### **1.2.2 Répartition en Algérie**

L'introduction de ce végétal vivace est possible dans la steppe Algérienne, pour la production de fourrage d'appoint, pour le maintien des sols dans le cadre d'une action de défense et de restauration, pour produire des fruits et pour la consommation humaine.

En zones steppiques algériennes, l'espèce *Opuntia* a été introduit à titre expérimental vers 1940 [10].

Durant la période coloniale, les premières réalisations à base de cactus ont été menées dans le cadre des périmètres de défense et restauration des sols dans la région de Nédroma (Tlemcen) [11].

En 1961, deux collections importantes de cactus ont été réalisées dans la région rurale de Zériba, et à Ain Oussera (Djelfa) [31].

Le cactus inerme a fait l'objet de plusieurs projets menés par la F. A. O. en Algérie [12] .

Suite à la recherche des espèces et des clones tolérants aux différentes contraintes des zones arides, des études sont menées en Algérie entre 1967-69, comportant soixante-sept espèces, cultivars et clones, établies au mois de Septembre 1967 par la F. A. O. à la station de Tâadmit à Djelfa [32].

Une collection a été aménagée à la sortie de M'sila, en 1969 par la F. A. O., elle est composée d'espèces et de variétés aux résultats encourageants [16].

Un important programme de plantation d'*Opuntia* a été lancé par l'I. N. R. F. en 1986-1987, à «El Mesrane» dans la wilaya de Djelfa. Celui-ci touche près de 400 000 ha, et vise, la mise en œuvre des méthodes de fixation des dunes et la reconstitution des zones de parcours.

L'*Opuntia ficus indica*, particulièrement la forme inerme, fait l'objet d'une importante utilisation dans les régions steppiques, et ce dans le cadre des programmes du HCDS (Haut-Commissariat au Développement de la Steppe) [12]. En effet, en 1993, un programme de restauration des parcours a été lancé par l'HCDS, réparti dans huit wilayates steppiques, a permis de valoriser l'intérêt porté pour la culture de l'espèce *O. ficus indica* dans la région Est et son introduction très encourageante au niveau des wilayates du centre et de l'ouest. Selon les spécialistes de l'H.C.D.S. (2015), une superficie importante est récemment plantée dans la wilaya de Souk-Ahras (10 000 ha).

### **1.3 Nom et classification**

Le genre *Opuntia* est intégré à la famille des Cactaceae, l'ordre des Caryophyllales et à la sous-classe des Caryophyllidae. Les Cactaceae appartiennent à des espèces succulentes caulinaires subdivisées dans les tribus des Pereskieae, Opuntieae et Cereae. La tribu des Opuntieae comprend le genre *Opuntia*, subdivisé à son tour en quatre sous-genres: *Platyopuntia*, *Cylindropuntia*, *Tephrocactus* et *Brasiliopuntia* [24]. Les sous genres les plus représentés en Afrique du nord sont les sous-genres *Cylindropuntia* comprenant les espèces à tiges cylindriques et le sous-genre de *Platyopuntia* représentant les espèces ayant des raquettes qui sont de fausses tiges [26].

#### **1.3.1 Classification du genre *Opuntia***

Embranchement :	Phanérogames
Sous/embranchement :	Angiospermes
Classe :	Dicotylédones
Sous-classe :	Caryophyllidae
Ordre :	Caryophyllales

Famille :	Cactaceae
Sous famille :	Opuntioideae
Tribu :	Opuntieae
Genre :	Opuntia
Sous-genre :	Platyopuntia, Cylindropuntia, Tephrocactus et Brasiliopuntia [24].
Espèces de sous genre :	<i>O. ficus indica</i> ; <i>O. vulgaris barbarica</i> Web.; <i>O. subterrane</i> ; Platyopuntia <i>O. monacantha</i> [27]. <i>O. robusta</i> Wendl.; <i>O. engelmannii</i> ; <i>O. streptacantha</i> Lem. ; <i>Opuntia cardona</i> Web.; <i>O. tenuispin</i> ; <i>O. lucens</i> ; <i>O. duranguensis</i> ; <i>O. chrysacantha</i> ; <i>O. leucotricha</i> [20]

## **1.4 Description morphologique**

### **1.4.1 Aspect général**

Les espèces d'*Opuntia* sont des plantes vivaces qui ont des formes très variées depuis le plus petit arbuste jusqu'à l'arbre de 5 à 7 m et même jusqu'à 15m de hauteur [20].

### **1.4.2 Système racinaire**

Les racines se développent à partir des aréoles, produisent avec le temps un vrai système racinaire [31]. Elles sont généralement fasciculées, particulièrement denses [20]. La racine principale est courte, mais les racines latérales ont une très grande extension [15].

### **1.4.3 Système caulinare**

#### **1.4.3.1 Tige**

Les *Opuntia* sont des cactus possédant des tiges à segments multiples. La tige charnue ou ligneuse couverte d'un épiderme [32].

### **1.4.3.2 Cladodes**

Anatomiquement, la raquette est formée par:

- Mucilage : le suc cellulaire de cladode concentré et mucilagineux, il permet à la plante de limiter la transpiration et donc de résister à la sécheresse [18].
- Epiderme : formé des cellules minces avec une paroi externe imprégnée d'une substance lipidique appelée cutine recouverte de cires [12].
- Stomates : En général les cactus ont peu de stomates, par unité de superficie que la plupart des autres espèces [22].
- Aréoles: ce sont des bourgeons axillaires modifiés, leur méristème, selon les cas, produisent des épines et des glochides, ou bien émettent des racines adventives et des nouvelles cladodes ou fleurs [26].
- Feuilles : Les feuilles des espèces d'*Opuntia* sont réduites en épines et il est parfois difficile de les identifier ou de retrouver leurs cicatrices [33].
- Epines : les épines sont attachées à la base par un bouchon, afin qu'elles ne soient pas enlevées facilement [20]. Elles seraient alors des poils spécialisés, protégeant les points végétatifs [12].
- Glochides : Les glochides sont de petits poils barbelés, différents des aiguillons, très cassants, que l'on trouve exclusivement chez les *Opuntioïdés* [27].

### **1.4.3.3 Fleurs**

Les fleurs sont hermaphrodites, solitaires et de différentes couleurs selon les espèces avec des sépales, des pétales et des étamines en nombre indéfini et en disposition spiralée. Leur gynécée est formé par un ovaire inféré constitué de 5 carpelles soudées qui se transforme à maturité en un fruit comestible [16, 13].

#### **1.4.3.4 Fruits**

La forme du fruit est oblongue ou ronde, en forme d'œuf, de 5 à 9 cm de long. Couvert de courtes épines et contient de nombreuses graines de 5 mm environ engluées dans un mucilage [14].

Les fruits d'*Opuntia* sont uniloculaires et polyspermiques. Il y a trois types de fruits [26] charnus ; secs et fruits de xoconostle (peu de pulpe, peau épaisse et acide).

- Peau : La peau est fine mais pleine d'épines. La couleur de la peau commence à changé à 70 jours après la floraison [22].
- Pulpe : Quatre-vingt-dix pour 100 de la pulpe sont constitués par les cellules parenchymateuses, provenant de l'épiderme dorsal de la couverture funiculaire. Le 10 % restants étant le tissu funiculaire [26].
- Graine : Le nombre de graines par fruit est très variable et cette variabilité est due probablement à la variation du nombre initiale des ovules [33].

#### **1.5 Etablissement de plantation**

La préparation du sol : peut se faire selon plusieurs possibilités :

- Labour de la totalité de la surface;
- Labour sur ligne de semis avec une scarification sur l'interligne;

L'apport du fumier se fait à la plantation, en enfouissement au moment du labour, on y ajoute 100 unités de P<sub>2</sub> O<sub>5</sub> par hectar;

Le séchage des raquettes avant la plantation est nécessaire pour diminuer la richesse en eau et éviter le risque de pourriture et assurer la reprise.

L'écartement et la densité des peuplements dépendent de deux groupes de facteurs [31]:

- Le climat ;

- Les conditions de cultures.

En zones arides et semi arides la densité peut varier de 1000 à 3000 pieds par hectare (150 à 400 mm) avec des écartements de 5 à 10 m entre les lignes. Pour le Nord de l'Afrique, la densité maximale, provisoirement préconisée est de 4000 à 5000 pieds à l'hectare avec des écartements de 4 à 5 m entre les lignes en culture non mécanisée et 6 et 7 m en culture mécanisée, sous les pluviosités supérieure à 400 mm [9]. Au Maroc, les espacements varient de 0,5 x 2 m à 4 x 4 m, alors que le plus utilisée dans la région de Tiznit est de 3 x 4 m, ce qui donne une densité de 830 plants / ha. Cependant la forte densité (1600 à 2000 plants / ha) n'est recommandée que pour les zones qui sont relativement bien arrosées [34].

Les différents essais sur la fertilisation, réalisés dans différentes parties du monde, montrent que la fertilisation détermine une augmentation remarquable de la production tant de fruits que de raquettes [35]. Des applications importantes d'azote, jusqu'à 160 kg / ha, favorisent l'augmentation du nombre de nouvelles raquettes chez *O. engelmannii* [24].

Au Maroc, il n'y a pratiquement aucun apport d'éléments fertilisants pour le figuier de barbarie en culture traditionnelle, cependant vu le gain d'intérêt pris par cette culture, durant ces dernières années, certains agriculteurs ont commencé à apporter du fumier à 63 leurs plantations de figuier à raison de 1 à 5 kg par plant. Cela engendre une augmentation de 20 à 30 % dans la productivité [34].

En Algérie, une expérimentation a été réalisée au Hodna (P = 224 mm) par la F.A.O. en 1974, la technique recommandée par cette dernière est :

Des plantations à raquette unique, l'application d'une fumure constituée d'un apport de 4 à 5 kg de fumier de mouton par pied (soit environ 10 t / ha), de 50 unités / ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et 20 unités / ha d'azote, on doit lors de l'implantation, éviter de mettre la raquette en contact avec du fumier [35].

## **1.6 Importance du genre *Opuntia***

L'*Opuntia* est devenu une récolte importante pour le fruit, le légum, et la production exotique de fourrage au Mexique, aux Etats-Unis, au Chili, en Argentine, en Palestine occupée, en l'Italie et en Afrique du sud. C'est un élément important pour la conservation des écosystèmes arides et protège les sols contre l'érosion, est encore utilisé en Tunisie, en Algérie et au Maroc pour ralentir et diriger le mouvement des sables [22].

L'utilisation de l'*Opuntia* est variable, dans des temps modernes. Les jeunes raquettes de l'*Opuntia ficus indica* sont moissonnées comme récolte végétale (souvent appelée les nopalitos). Bien que cette récolte soit mondiale, moins valable que la récolte du fruit, les produits végétaux de l'*Opuntia* sont disponibles sur beaucoup de marchés locaux et mondiaux [27]. Selon plusieurs auteurs les propriétés médicinales de l'*Opuntia* ont été signalées dès 1552. L'*Opuntia ficus indica* avec d'autres espèces d'*Opuntia*, ont été développés pendant des périodes précolombiennes, comme usine de centre serveur pour la cochenille (*coque de Dactylopius*) productrice de colorants vif rouge et pourpre [20].

### **1.6.1 Cladodes**

Les cladodes sont riches en vitamine C et les éléments minéraux tel que, le cuivre, le magnésium, et le fer. La teneur en sucre de la plupart des variétés d'*Opuntia* est relativement élevée (12 à 17 %) [16]. Les raquettes séchées, ont des teneurs en cendres élevées (jusqu'à 33 %); les teneurs en manganèse, cuivre, zinc, magnésium et fer sont généralement acceptables pour les ruminants.

Les cactus frais sont acceptés par les bovins, ovins et caprins [36].

### **1.6.2 Fruits**

Le fruit du figuier de barbarie est consommé à l'état frais, séché, congelé, confit, ou transformé en jus concentré, en confiture [36].

Au Chili, les figues de barbarie sont utilisées pour l'extraction d'un sirop dont les caractéristiques nutritionnelles sont similaires à celles du raisin et du maïs [28].

### **1.6.3 Graines**

On peut séparer les graines pour en extraire de l'huile qui constitue 8 à 9 % du poids sec de la graine [18]. Cette huile montre un degré élevé d'insaturation, ainsi qu'une teneur élevée en acide linoléique qui est de 60.3 %. Les graines de la figue de barbarie contiennent divers lipides neutres, le B- sitostérol représente 72 % des stérols totaux (le Y-tocophérol; le B- carotène) [31].

### **1.6.4 Fleurs**

Les fleurs de l'*Opuntia* sont comestibles. Les mexicains les mangent à la manière d'asperge et sont employées contre les inflammations intestinales et constituent une source nutritive très appréciée par les abeilles, d'où la possibilité de développer l'apiculture en parallèle [37].

### **1.6.5 Racines**

L'*Opuntia* est une espèce aux racines profondes et très étendues, en mesure d'exercer une action anti-érosive, efficace en stabilisant les surfaces en pente. Afin d'exercer une action de lutte efficace contre l'érosion éolienne et le phénomène du mouvement des dunes de sable, la culture de l'*Opuntia* est souvent accompagnée de feuilles de palmier coupées pour couvrir le terrain [22].

En outre, l'*Opuntia ficus indica* est utilisé en Tunisie, en Algérie et au Maroc, pour ralentir et diriger le mouvement des sables, augmenter le couvert végétal, et éviter la destruction des terrasses construites pour réduire l'effet de ruissellement [11].



## CHAPITRE 2

### L'ETUDE DU STRESS SALIN CHEZ LES PLANTES

#### **2.1 Salinité du sol**

Dans le monde, il y a plus de 800 millions d'hectares de terre touchés par la salinité [1]. Ce chiffre représente plus de 6 % de la superficie totale du monde. La plupart de ces terres infectées est due à des causes naturelles ou à l'accumulation de sels dans les zones arides et semi-arides [38]. L'altération des roches mères libère différents types de sels solubles, principalement des chlorures de sodium, de calcium, de magnésium et une quantité moins importante des sulfates et carbonates [39]. Le chlorure de sodium est le sel le plus soluble et abondamment libéré. L'autre cause de l'accumulation de sel dans le sol est le dépôt de sels océaniques réalisé par le vent et la pluie. L'eau de pluie contient 6 - 50 mg. kg<sup>-1</sup> de chlorure de sodium, la concentration diminue avec la distance de la côte. La pluie contenant 10 mg. Kg<sup>-1</sup> de chlorure de sodium déposerait 10 kg. ha<sup>-1</sup> de sel pour chaque 100 mm de précipitations par an [39].

À part les causes naturelles de salinité des sols, l'agriculture moderne, en raison du défrichage ou de l'irrigation conduit à l'augmentation de la salinité des terres.

L'irrigation combinée à un mauvais drainage est la cause la plus grave, parce qu'elle conduit à des pertes de terres agricoles productives. La raison de cette salinisation secondaire, par opposition à la salinisation primaire des marais salés en bord de mer, est que l'eau s'évapore mais les sels restent et s'accumulent dans le sol [40]. Selon la FAO, au niveau mondial, 10 millions d'hectares des terres cultivées sont abandonnés chaque année à cause des problèmes d'irrigation. Sur les 1,5 milliards d'hectares de terres cultivées par l'agriculture non irriguée, seulement 2 % (32 millions d'hectares) sont affectés par la salinité à différents degrés, alors que sur les 230 millions d'hectares des terres irriguées actuellement, ce chiffre s'élève à 20 % (45 millions d'hectares). En Afrique, 39 M ha, soit 2 % des terres arables, sont des sols salins et parmi eux 34 millions d'hectares sont des sols sodiques [41].

## **2.2 Les composantes de la contrainte saline**

Le stress salin s'applique sur la plante sous quatre types de contraintes.

### **2.2.1 Le stress osmotique**

La première conséquence de la salinisation tient à la modification du potentiel osmotique de la solution du sol, lorsque la teneur en sels croît [42]. Plus la solution du sol est salée, plus la pression osmotique est élevée et plus il est difficile pour les racines d'extraire l'eau de la réserve du sol. Il en résulte un ralentissement de la croissance [43]. La concentration en sels dépend de la teneur en eau du sol et augmente avec le dessèchement. C'est pourquoi l'excès de sels qui affecte les plantes est atteint beaucoup plus rapidement dans un sol sableux que dans un sol argileux qui piège les ions  $\text{Na}^+$  via les charges négatives de l'argile [44].

Chez les plantes absorbant l'eau par osmose, cette absorption est conditionnée par la différence de potentiel hydrique entre la racine et le sol [45]. La plupart des plantes sont capables d'ajuster leur potentiel osmotique interne en fonction de celui extérieur [46]. Mais cette régulation est très variable selon les espèces et présente des limites [47].

### **2.2.2 Le stress ionique**

L'accumulation des ions toxiques  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  au niveau du mésophylle des feuilles, affecte la croissance et le métabolisme de la plante [48]. Le sel endommage les structures lipidiques et protéiques des membranes plasmiques [49]. La présence de ces ions perturbent l'activité enzymatique cellulaire [50] principalement dans les tissus photosynthétiques [51].

La toxicité ionique peut être le résultat du remplacement de  $\text{K}^+$  par  $\text{Na}^+$  au niveau des sites actifs de protéines induisant aussi un changement des structures protéique et enzymatique [44].

### **2.2.3 Le stress nutritionnel**

La salinité n'est pas une simple affaire de concentrations élevées de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Cl}^-$ . Le calcium, le sulfate, les carbonates peuvent être présents, avec le bore ou le sélénium à des concentrations excessives. En même temps, d'autres nutriments, particulièrement le phosphore et l'azote, peuvent ne pas être présents ou disponibles en quantités suffisantes pour permettre des taux de croissance élevés [52]. La présence de sels en excès dans le substrat de culture peut entraîner une limitation de l'alimentation en nutriments indispensables. Ce déséquilibre nutritionnel est une cause possible des réductions de croissance sur sel, lorsque des ions essentiels comme  $\text{I}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{NO}_3^-$  deviennent limitants [53].

### **2.2.4 Le stress oxydatif**

Les espèces réactives d'oxygènes (ROS) sont habituellement générées par l'activité cellulaire normale avec des faibles concentrations, comme la photo respiration et la B-oxydation des acides gras. Dans ces conditions, la plante possède des enzymes et des métabolites antioxydants suffisantes pour faire face à cette faible concentration [54].

De nombreux travaux montrent que des métabolites enzymatiques et non enzymatiques antioxydants telles que les superoxyde-dismutases (SOD), les ascorbate peroxydases (APX), les catalases (CAT), des glutathion-S-transférases (GST) et les glutathion peroxydases (GPX) s'accumulent plus pendant le stress salin [55].

Une conséquence des stress environnementaux, comprenant le stress salin, est l'apparition du stress oxydatif [56], c'est-à-dire l'accumulation d'espèces réactives d'oxygène (ROS) à des concentrations élevées [57], qui endommagent les structures cellulaires [58, 59]. Ces derniers sont à l'origine du dysfonctionnement de l'appareil photosynthétique et les autres troubles métaboliques [60]. La plupart d'entre eux sont des peroxydes d'hydrogène, des radicaux hydroxyles et des anions superoxyde [57].

La tolérance des plantes à la contrainte saline est fortement corrélée à leur capacité de synthèse des antioxydants nécessaire pour faire face au ROS et de maintenir leur concentration à faible niveau dans les cellules lors du stress [61].

Par ailleurs, DEMIRAL et TURKAN (2004), ont montré que les plantes ont développé des systèmes de défense antioxydants enzymatique et non enzymatique contre les radicaux libres en limitant leur génération [62].

### **2.3 Mécanismes de tolérance à la salinité au niveau cellulaire**

Le problème de la salinité est multiple car en plus de la toxicité des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  (dissous dans l'eau d'irrigation ou présents dans la solution du sol) et de la perturbation de la nutrition minérale (suite aux interactions entre les ions), les plantes ont du mal à absorber l'eau du sol du fait de sa pression osmotique élevée. Cela se traduit par un stress hydrique en plus du stress salin, compliquant et altérant ainsi de façon exponentielle leur état physiologique [63]. Les cellules tendent par conséquent à ajuster leur propre potentiel hydrique en rétablissant l'homéostasie ionique cellulaire, que ce soit par la compartimentation vacuolaire des ions toxiques ( $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$ ) absorbés et (ou) leur exclusion hors de la cellule [63]. En revanche, si cela n'est pas suffisant, la plante devra utiliser un autre moyen pour faire face au stress salin, qui consiste à synthétiser et accumuler des solutés organiques osmoprotecteurs, principalement des composés aminés et des sucres. Sur le plan énergétique, cette stratégie osmotique est beaucoup plus coûteuse que la régulation de l'homéostasie ionique [63]. D'autre part, une forte concentration saline dans le sol induit chez la plante la production de formes actives d'oxygène qui provoquent un stress oxydatif dont la réduction des dommages pourrait se faire par le biais de la production d'antioxydants. Ces principales réactions cellulaires élaborées par la plante afin de faire face et de s'adapter au stress salin sont inévitablement précédées par une cascade d'éléments de signalisation et de régulation qui peuvent emprunter différentes voies impliquant notamment celle du calcium, de l'acide abscissique (ABA), des « mitogen-activated protein kinases » (MAPKinases), des protéines « salt overly sensitive » (SOS) et de l'éthylène [63]. Les réponses adaptatives peuvent être regroupées (a) l'homéostasie qui comprend l'homéostasie ionique et l'homéostasie osmotique ou ajustement osmotique; (b) limitation des dégâts du stress et réparation des dommages cellulaires causés par le stress,

ou détoxification et (c) contrôle de la croissance (coordination de la division cellulaire et extension à des niveaux appropriés aux conditions de stress) [64].

## **2.4 Comportement et capacité d'adaptation aux contraintes abiotiques**

### **2.4.1 Comportement biochimique**

*L'Opuntia ficus indica*, est une plante bien adaptée à l'aridité ; elle contribue à la mise en valeur des terres incultes et leur protection contre l'érosion. Les mécanismes de son adaptation aux contraintes abiotiques sont peu connus. La recherche de marqueur biochimique, physiologique et moléculaire est indispensable pour la valorisation des ressources génétiques de l'espèce.

Les peroxydases sont des enzymes qui oxydent un substrat défini en présence du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Elles sont considérées comme des antioxydants enzymatiques. Plusieurs travaux ont montré l'implication de ces enzymes dans plusieurs processus physiologiques, chez les plantes dont la croissance, le développement et la résistance aux contraintes biotiques et abiotiques. L'activité optimale de ces enzymes dépend de trois paramètres principaux : la température, le pH et la force ionique :

- Température : Les peroxydases de l'*O. ficus indica* sont hautement résistantes aux températures élevées, puisqu'elles gardent 40 % de leur activité après 10 minutes d'incubation à 70 °C [65] alors que chez d'autres cactacées comme *Pachycereus pringlei* l'inactivation est totale [66].
- pH : les peroxydases d'*O. ficus indica* présentent un optimal proche de 6.6 [65].
- L'apport ionique : l'apport d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à une concentration supérieure à 2 % provoque une inhibition de l'activité enzymatique [65].

L'étude de la répartition des activités des peroxydases solubles et ioniques au niveau des raquettes et des racines d'*O. ficus indica* en condition de stress salin, montre que les formes ioniques sont moins abondantes dans les racines et presque à égalité dans les raquettes, représentant respectivement 23 et 43 % [65]. Cette large distribution

expliquerait l'intervention de ces enzymes dans plusieurs processus physiologiques, comme la synthèse de la lignine et la résistance aux stress biotiques et abiotiques [67].

L'extraction par solubilisation progressive des peroxydases à partir des raquettes et des racines d'*O. ficus indica* en condition de stress salina permis d'obtenir 3 fractions enzymatiques notées S, I et C correspondant respectivement aux peroxydases solubles et liées aux parois cellulaires de façon ionique ou covalente [65].

#### **2.4.2 Comportement physiologique**

Le genre *Opuntia* a un mécanisme photosynthétique spécialisé connu sous le nom de métabolisme acide de crassulacean [68].

Le succès des plantes CAM dans les régions arides et semi-arides a été attribué à l'ouverture nocturnes des stomates et la compression du CO<sub>2</sub> qui autorise la plante CAM à accomplir une haute efficacité de l'usage d'eau. L'eau potentielle de tissus internes des plantes CAM, reste habituellement haute [69]. Les plantes CAM, fonctionnent donc en réalisant deux réactions de carboxylation très séparées dans le temps, l'une de jour, l'autre de nuit [70].

La plante ferme ses stomates le jour, ne les ouvre que la nuit. La nuit en milieu désertique est assez fraîche, la plante, étant une «plante grasse» le plus souvent, perd donc peu d'eau et peut fixer du CO<sub>2</sub> [70]. Le CO<sub>2</sub> est d'abord fixé comme malate, puis il est décarboxylé et entre dans le parenchyme pour préparer des glucanes. En outre, il y a toujours une réduction de l'acidité pendant le jour, due à l'assimilation du CO<sub>2</sub>. Ce modèle sans prise nette de CO<sub>2</sub> mais avec oscillation continue de jour et de nuit dans l'acidité, est nommé «marche au ralenti» [71]. De plus, cette fixation de CO<sub>2</sub> se fait de la part de la rubisco, sur un sucre phosphaté, avec synthèse d'amidon et d'autres glucanes [70].

Durant la nuit, c'est donc une autre enzyme que la rubisco qui est utilisée : la phosphoénolpyruvate carboxylase ou PEP case, qui a deux avantages :

- D'abord, elle a une très grande affinité pour le CO<sub>2</sub> : dès qu'on a, ne serait-ce que quelques ppm de CO<sub>2</sub>, l'enzyme est saturée et on a un gradient fort avec une fixation rapide.
- Le deuxième avantage est l'obtention d'un produit de carboxylation qui est un acide dicarboxylique : l'acide oxaloacétique, qui peut être transformé en acide malique [70].

NOBEL et HARTSOCK, (1983), rapportent que des essais ont été réalisés chez l'*Opuntia ficus indica* pour montrer l'effet de différentes combinaisons de températures sur le taux net d'assimilation du CO<sub>2</sub>. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec la combinaison de 25 °C durant le jour et 15 °C durant la nuit. En diminuant les températures à 10 °C durant le jour et 0 °C durant la nuit, des taux d'assimilation inférieurs à 67 % ont été enregistrés. En augmentant la température le jour à 35 °C et à 25 °C durant la nuit, le taux d'assimilation de CO<sub>2</sub> a été de 35 %. Avec la température de jour de 45 °C et la température de nuit de 35 °C, le taux d'assimilation de CO<sub>2</sub> est nul [72].

### **2.4.3 Comportement écologique**

Les espèces du genre *Opuntia* ont développé des adaptations phénologiques, physiologiques et structurales; favorables à leur développement dans les environnements arides et semi-arides, où l'eau est le facteur principal, limitant le développement de la plupart des autres espèces d'*Opuntia* [24].

Il s'agit d'une espèce de plantes xérophytes, qui stockent dans leurs tissus des réserves de suc, pour faire face aux longues périodes de sécheresse. La sécheresse est un attribut normal des terres arides des climats arides et semi- arides [73].

Les tiges ont développé un épiderme avec la cuticule, la cire et peu de stomates. Les aréoles avec leurs épines, des glochides et des trichomes. Ces dispositifs ont permis une grande conservation de l'eau [74].

L'épiderme, la cuticule, et la cire sont utiles dans la protection contre un fort rayonnement photo-synthétiquement actif [69]. Le suc cellulaire qui est mucilagineux,

contribue à la limitation de la transpiration et permet aux cladodes d'emmagasiner dans leurs tissus parenchymateux plus de 82 % de leur poids en eau.

La forme des raquettes a évolué pour stoker la quantité maximum de l'eau avec la perte minimum [75].

Les stomates sont enfoncés en profondeur et en cas de températures élevées et de forte insolation, ils peuvent rester fermés une grande partie de la journée [24].

Les épines et les glochides ont différentes fonctions. En effet, on pense que les épines favorisent la réduction des pertes en eau [76]. Ces dernières contribuent à diminuer la température journalière, des tissus végétaux et leur présence réduit l'interception de la lumière de la part des raquettes [72].

La principale fonction des glochides est de favoriser la condensation de l'eau à proximité de la surface foliaire [24].

#### **2.4.4 Comportement moléculaire**

L'amélioration des plantes est basée sur une large utilisation de la variabilité génétique naturelle et sur des méthodes d'exploitation rapides et fiables de cette diversité dans les programmes de sélection. Les marqueurs moléculaires permettent à la fois un diagnostic extrêmement fin de la variabilité et la mise en place de stratégies très rapides de création et sélection variétale [77]. Ces marqueurs constitués des acides nucléiques sont utilisés il y a une vingtaine d'années dans le domaine de la connaissance des génomes végétaux et leur application à l'amélioration des plantes [78]. Ils présentent également différents avantages comparés aux marqueurs morphologiques et protéiques; très nombreux, neutres vis à vis de la sélection, couvrent le génome entier, indépendants de la partie de la plante prélevée et de son stade de développement et indépendants des influences environnementales [79]. Il existe plusieurs types de marqueurs moléculaires, mais nous sommes intéressés au RAPD.



## 2.5 Les marqueurs RAPD'' *Random Amplified Polymorphic ADN''*

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet, à partir d'un ADN matrice et de 2 amorces oligonucléotidiques, d'augmenter de manière quasi exponentielle le nombre de fragments limités par des séquences homologues aux amorces dans l'ADN matrice [80]. On obtient alors l'amplification des fragments encadrés par les amorces. Lorsqu'on utilise une seule amorce de petite taille (8 à 12 bases), dont la séquence est choisie au hasard tout en respectant certaines règles quant à sa composition (contenu en GC), on peut constater, après PCR, l'amplification de fragments à partir d'un ADN génomique. Le nombre et les séquences des fragments amplifiés varient selon l'amorce utilisée. L'amplification de l'ADN génomique de deux génotypes différents, avec une même amorce, peut révéler des variations se traduisant par la présence ou l'absence d'un fragment donné selon le génotype [77]. On dispose alors d'un fragment d'ADN polymorphe amplifié au hasard ou RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) [77]. Ce RAPD représente un marqueur anonyme potentiel.

Selon KONATE (2007) [81], les avantages pratiques liés à ces marqueurs sont énormes. Ils ont généralement une transmission mendélienne [82], sont utilisés comme marqueurs d'introgession [83] ou, dans certain cas, pour identifier les cultivars de germplasmes commerciaux et protéger la paternité de plantes [84, 85, 86]. Par ailleurs, Ils ont été utilisés dans la construction des cartes de liaison génétique [87, 88]. Selon KHADARI et *al.*, 2003 ; KHADARI et *al.*, 1994, la technique RAPD non limitée par le nombre d'amorces, permet d'identifier fréquemment le polymorphisme qui existe entre populations d'organismes végétaux ou individus de la même population [83, 89]. En effet, elle a été le moyen de base pour étudier la variabilité génétique des collections de *Brassica* spp. [90], de *Coffea* spp. [91], de *Pistacia vera* [92], d'*Arachis hypogea* [93], *Olea europea* [95, 96], de *Glycine* spp. [95] et de *Camellia sinensis* [96] (Tableau 2.1).

Des marqueurs RAPD liés aux gènes de résistance à certains agents pathogènes ont été identifiés chez plusieurs plantes. En effet, chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.), 18 marqueurs liés à 11 locus impliqués dans la résistance à la cécidomyidé ou "Hessian fly" ont été caractérisés [97]. Chez les cultivars du blé, des marqueurs RAPD liés aux gènes de résistance à la rouille brune (Lr24) et jaune (Yr17) ont été également identifiés et

transformés en marqueurs SCAR ‘‘Sequence Characterized Amplified Region’’ [98, 99]. En plus, elle a pu produire chez certaines espèces dioïques, tels que les cultivars de *Pistacia vera*, des marqueurs liés au sexe [92].

Des marqueurs RAPD liés aux stress salin ont été identifiés chez plusieurs espèces (Tableau 2.2).

**Tableau 2.1:** Technique RAPD utilisée dans l'étude du polymorphisme génétique de différentes espèces des plantes

Espèce	Références	Espèce	Références
Abricot ( <i>Prunus armenaica</i> L.)	[100]	<i>Mammillaria</i> (Cactaceae)	[105]
Olivier ( <i>Olea europaea</i> )	[101]	<i>Opuntia</i> spp. Cactaceae	[106,107,108, 109, 110]
Palmier dattier ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.)	[102]	<i>Opuntia ficus-indica</i>	[111,112,113, 114, 115]
Pistachier vrai ( <i>Pistacia vera</i> )	[92]	<i>Opuntia</i> (Cactaceae)	[116]
Vigne ( <i>Vigna angularis</i> )	[114,103,104]		

**Tableau 2.2:** Marqueur RAPD liés au stress salin de différentes espèces des plantes

Espèces	Références	Espèce	Références
Trèfle( <i>trifolium alexander</i> )	[117]	Maïs ( <i>Zea mais</i> L.)	[122]
Sorgho ( <i>Sorghum bicolor</i> L.)	[118]	Pistachier vrai ( <i>Pistacia vera</i> L.)	[123]
Canne à sucre ( <i>Saccharum officinarum</i> L.)	[119]	Soja ( <i>Glycine max</i> )	[124]
Blé ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	[120]	Mil ( <i>Panicum</i> spp.)	[125]
Riz ( <i>Oryza sativa</i> L.)	[121]	Palmier dattier ( <i>Phoenix dactylifera</i> L.)	[126]

## CHAPITRE 3

### MATERIEL ET METHODES

#### **Partie 1: Etude de l'effet du NaCl sur le comportement morpho-physiologique et biochimique de cinq espèces d'*Opuntia* et la recherche des marqueurs morphologique, physiologique et biochimique lié au stress**

##### **3.1.1 Introduction**

Le présent travail vise l'étude de l'effet de la salinité sur le comportement morphologique, physiologique et biochimique de plantes âgées de deux années de cinq espèces d'*Opuntia* (*Opuntia amyacleae*, *Opuntia ficus indica* Mill. forme *inermis*, *Opuntia robusta* var. *robusta*, *Opuntia engelmannii* var. *longuiformis* et *Opuntia streptacantha*) stressées à divers niveaux de salinité à 0, 200 mM, 400 et 600 mM de NaCl, à travers l'analyse de 10 paramètres morphologiques, quatorze paramètres physiologiques et six paramètres biochimiques dans les différents organes et la recherche de marqueur morphologique, physiologique et biochimique de tolérance dans nos conditions expérimentales.

##### **3.1.2 Matériel végétal**

Après les prospections réalisées sur terrain, nous avons choisi quatre périmètres, aux quatre zones différentes : (Belaiba, wilaya de M'sila) ; (Dokkara, wilaya de Tébessa); (Choucha, wilaya de Laghouat); (El Mesrane; wilaya de Djelfa). Le matériel végétal utilisé dans ce travail est constitué du cladodes de cinq espèces d'*Opuntia*: *Opuntia amyacleae* «Dokkara, wilaya de Tébessa », *Opuntia ficus indica* Mill forme *inermis* « Belaiba, M'sila », *Opuntia robusta* var. *robusta* (El Mesrane; Djelfa), *Opuntia engelmannii* var. *longuiformis* (El Mesrane; Djelfa), *Opuntia streptacantha* Lem. « Choucha, Laghouat ».

### **3.1.3 Méthodes d'étude**

#### **3.1.3.1 Préparations du substrat de culture**

Le substrat de culture utilisé est le sable de dunes ayant subi:

Un tamisage approprié afin de supprimer les différents débris et déchets dans le but d'obtenir un sable fin (0.2 mm),

Un traitement à l'esprit de sel pour éliminer les carbonates, les chlorures, le potassium, le magnésium, le calcium, le sulfate, le bicarbonate et le sodium,

Trois lavages successifs à l'eau ordinaire,

Trois rinçages répétés à l'eau distillée sont appliqués afin d'essayer d'éliminer toute trace de chlore,

Et enfin, un séchage à l'air libre.

#### **3.1.3.2 Plantation des cladodes**

Les cladodes sont plantées dans des sachets de 2 litre de volume, remplis de sable et exposé aux conditions naturelles de culture (figure 3.1). Les cladodes sont arrosées de manière hebdomadaire par l'eau du robinet. Le stress salin n'est appliqué qu'après la deuxième année de la culture.

Le chlorure de sodium (NaCl) a été choisi comme agent de stress. Quatre concentrations de NaCl 0 (témoin), 200 mM et 400 mM et 600 mM ont été utilisées.

#### **3.1.3.3 Préparation des solutions d'irrigation**

Nous avons préparé quatre solutions d'irrigation à partir de l'eau distillée et le NaCl.

1<sup>ère</sup> solution: témoin.

2<sup>ème</sup> solution: 11.7g de NaCl équivalents à 200 mM de NaCl / 1litre d'eau distillée.

3<sup>ème</sup> solution: 23.4 g de NaCl équivalents à 400 mM de NaCl / 1litre d'eau distillée.

4<sup>ème</sup> solution: 35.1 g de NaCl équivalents à 600 mM de NaCl / 1litre d'eau distillée.

### **3.1.4 Dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental a comporté 20 traitements (5 génotypes x 4 niveaux de salinité) avec 15 répétitions randomisées soit 300 plants au total.

Des prélèvements de matériel végétal (cladodes jeunes, cladodes âgées et racines) (figure 3.2) sont effectués à partir de plantules témoins et traitées après 60 jours d'application du stress salin.

### **3.1.5 Analyse morphologique de la diversité génétique en fonction de la salinité**

Cette étude a porté sur les caractères morphologiques suivants (figure 3.3): Racine (nombre, longueur, poids frais), cladodes âgées (longueur, largeur, poids frais), cladodes jeunes (longueur, largeur, poids frais) et rapport poids frais / partie aérienne et poids frais / partie souterraine.

Les paramètres morphologiques mesurés au cours de cette étude ont été choisis en raison de leur fiabilité pour évaluer les effets néfastes de la salinité.

#### **3.1.5.1 Dénombrement des racines**

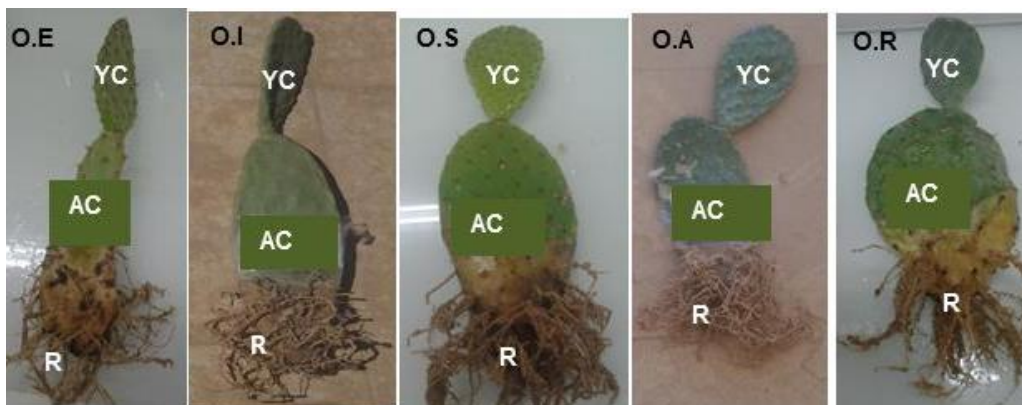
Le nombre de racines a été déterminé par simple dénombrement à l'oeil nu.



**Figure 3.1:** Plantation des boutures (cladodes) dans le substrat



**Figure 3.2:** Dispositif expérimental



**Figure 3.3:** Les différents organes des plantes d'*Opuntia* destinées pour l'analyse morphologique, physiologique et biochimique

(R : racine, AC : cladode agée ; YC : cladode jeune ; OE : *Opuntia engelmannii* ; O.I : *Opuntia ficus indica* ; O.S : *Opuntia streptacantha* ; O.A : *Opuntia amycleae* ; O.R : *Opuntia robusta*)

### **3.1.5.2 Mesure de la croissance en longueur et en largeur**

Les plants sont enlevés en séparant les différents organes : racines, cladodes âgés, cladodes jeunes. Les systèmes racinaires sont lavés soigneusement à l'eau puis essorés rapidement avec du papier filtre. Les longueurs et les largeurs des parties aériennes (cladodes âgés et jeunes) et les longueurs des parties souterraines sont mesurées à l'aide d'une règle graduée.

### **3.1.5.3 Mesure de la croissance pondérale**

La biomasse exprimée en gramme est effectuée par pesée de la matière fraîche (racine, cladode âgé et cladode jeune).

### **3.1.5.4 Rapport poids frais partie souterraine et poids frais partie aérienne (PFS/PFA)**

Le rapport en poids frais des parties aériennes rapportées à celles des racines est déduit à partir des valeurs moyennes des poids frais.

### **3.1.6 Analyse physiologique de la diversité génétique en fonction de la salinité**

#### **3.1.6.1 La teneur relative en eau TRE**

C'est l'un des principaux paramètres qui indique le niveau hydrique de la plante ou encore la turgescence cellulaire. La TRE est mesurée selon la méthode décrite par [127].

La formule est :  $TRE \% = (PF - PS) / (PT - PS) \times 100$

### **3.1.6.2 Dosage de la chlorophylle (dosage de chlorophylle dans les cladodes âgée et cladodes jeune)**

Le dosage de la chlorophylle est faite suivant la méthode de MACKINNEY, (1941). Qui consiste en une macération du végétal dans de l'acétone à 80 %. Le végétal est coupé en petits morceaux et broyé à l'aide d'un mortier dans de l'acétone tout en ajoutant quelques milligrammes de carbonate de calcium. Après le broyage total, la solution obtenue est filtrée et mise dans des boîtes noires (pour éviter l'oxydation de la chlorophylle par la lumière) puis on procède à la lecture des densités optiques des solutions à l'aide d'un spectrophotomètre à deux longueurs d'ondes : 663 et 645 nm, après l'étalonnage de l'appareil avec la solution témoin d'acétone [128].

La détermination des teneurs en chlorophylle est réalisée selon les formules:

$$\text{Chlorophylle «a»} = 12.7 \text{ DO (663)} - 2.598 \text{ DO (645)} \times V/1000$$

$$\text{Chlorophylle «b»} = 22.9 \text{ DO (645)} - 4.68 \text{ DO (663)} \times V/1000$$

$$\text{Chlorophylle «t»} = \text{Ch « a »} + \text{Ch « b »}$$

### **3.1.6.3 Dosage de quelques cations dans la partie aérienne et partie racinaire**

Les analyses de quelques éléments minéraux sont effectuées sur la partie aérienne et la partie racinaire et ont porté sur la détermination des teneurs en sodium, en calcium et en potassium ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Les échantillons sont broyés à l'aide d'un mortier. La fine poudre obtenue est placée dans des piluliers fermés hermétiquement avec des bouchons plasmas.

500 mg de matériel végétal, préalablement séché, sont introduits dans un creuset en porcelaine. Le creuset est placé dans un four dont la température est augmentée progressivement jusqu'à 500 °C et qui est ainsi maintenue pendant 2 heures. Un pallier est effectué aux alentours de 200 °C jusqu'à la fin du dégagement de fumée. Après refroidissement, les cendres sont humectées avec quelques gouttes d'eau distillée puis on ajoute 2 ml d'HCl au 1/2. On évapore à sec sur plaque chauffante. On ajoute une seconde



fois 2 ml d'HCl, on laisse en contact 10 minutes et on filtre dans des fioles jaugées de 50 ml. Après avoir ajusté au trait de jauge puis homogénéisé par agitation manuelle, les solutions sont transvasées dans des godets sur lesquels le numéro de l'échantillon est inscrit.

Cette solution se prête aux dosages par spectrophotomètre à émission de flamme pour les trois éléments minéraux à savoir le sodium, le potassium et le calcium [129].

### **3.1.7 Analyse biochimique de la diversité génétique en fonction de la salinité**

Les paramètres biochimiques consistent à mesurer les quantités des constituants des organes biologiques suivant :

- teneur en proline au niveau de : racines, cladodes âgées et jeunes
- teneur en sucres solubles au niveau : racines, cladodes âgées et jeunes.

#### **3.1.7.1 Dosage de la proline (dosage de proline dans les racines, cladode âgée et cladode jeune)**

La proline est dosée selon la technique utilisée par TROLL et LINDESLY (1955) simplifiée et mise au point par DREIER et GORING (1974) et modifiée par MONNEVEUX et NEMMAR (1986) [130].

Le principe est la quantification de la réaction proline-ninhydrine par mesure spectrophotométrique.

La proline se couple avec la ninhydrine en formant un complexe coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de proline dans l'échantillon.

Un poids de 100 mg de matière fraîche de la partie aérienne et ou racinaire est prélevé de chaque répétition et mis dans des tubes à essai auxquels on rajoute 2 ml de

Méthanol à 40 %. Les tubes couverts (pour éviter la volatilisation de l'alcool) sont portés à l'ébullition au bain-marie à 85 °C pendant 60 min.

Après refroidissement, 1 ml de l'extrait est prélevé de chaque tube et mis dans de nouveaux tubes auxquels, nous ajoutons 1 ml d'acide acétique.

Ensuite, nous avons ajouté, dans chaque tube, 1 ml de mélange contenant 120 ml d'eau distillée, 300 ml d'acide acétique, 80 ml d'acide orthophosphorique ( $H_3PO_4$ , densité 1,7) et 25 mg de ninhydrine.

Le mélange est porté à l'ébullition durant 30 minutes et la solution vire vers le rouge. Après refroidissement des solutions, le chromatophore est extrait avec 5 ml de toluène. Deux phases se séparent après agitation au vortex. On prélève la phase supérieure contenant le chromatophore à laquelle on ajoute 5 mg du sulfate de sodium oxydé  $Na_2SO_4$  à l'aide d'une spatule pour éliminer l'eau qu'elle contient. La lecture de la densité optique des échantillons est faite à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 528 nm, correspondant à son maximum d'absorption. Les valeurs obtenues sont ensuite reportées sur la courbe d'étalonnage réalisée à partir de concentration croissante en proline préparée à partir d'une solution mère de 20  $\mu g/ml$ . Les teneurs sont exprimées en  $\mu g/gMF$ .

### **3.1.7.2 Dosage des sucres solubles (dosage de glucides dans la racine, cladode âgée et cladode jeune)**

Le dosage des sucres solubles est fait au niveau des racines, cladode âgée et cladode jeune des plantes selon la méthode de DUBOIS, (1956) [131]. L'extraction des sucres solubles consiste à mettre 100 mg de matière fraîche dans des tubes à essai puis rajouter 2 ml d'éthanol à 80 %. Le tout est laissé 48 H. Le dosage se fait par évaporation du total de l'alcool en mettant les tubes à essai dans un bain marie à 70°. Après refroidissement, on complète le volume de chaque tube à essai à 20 ml avec de l'eau distillée. Puis nous prélevons 1ml de la solution auquel on a joute 1ml de phénol à 5 % en prenant soin de bien agiter. Après, on ajoute 2 ml d'acide sulfurique concentré dans des tubes déposés préalablement dans un bain de glace. Enfin, le tout est laissé se reposer

pendant 25 min et on procède à la lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 490 nm. Les teneurs en sucres sont déduites dans la courbe d'étalonnage réalisée à l'aide des concentrations croissantes en glucose obtenues à partir d'une solution mère de 100 µg/ml. Les teneurs sont exprimées en µg/g MF.

### **3.1.8 Traitement des données et analyses statistiques**

Les données relatives aux 32 paramètres morpho-physiologiques et biochimiques étudiés sont analysées au moyen des diverses méthodes d'analyses statistiques uni et multivariées.

L'analyse des données est faite à l'aide du logiciel Fast statistics v. 2.0.4. Les variables étudiées d'abord soumises à une analyse de la variance à un critère de classification (one-way ANOVA), permettant de calculer les  $F_{\text{Observé}}$  et  $F_{\text{Théorique}}$ . Si le test de l'ANOVA était significatif ( $F_{\text{Observé}} > F_{\text{Théorique}}$ ), l'étude est complétée par le test de la plus petite amplitude significative (PPAS;  $p < 0,05$ ). Cette dernière analyse est réalisée à l'aide du logiciel Stat Box 6.

## **Partie 2 : Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de tous les paramètres morpho-physiologique et biochimique et évaluation de la tolérance de cinq espèces d'*Opuntia* au stress salin**

### **3.2.1 Comparaison de $F_{\text{Observée}}$**

La comparaison des  $F_{\text{Observé}}$  ont été appliquées sur les trente-deux paramètres morpho-physiologiques et biochimiques étudiés précédemment (Partie 1) dans le but de déterminer le paramètre le plus discriminant sous chaque niveau du stress salin appliquée.

### **3.2.2 Corrélation entre les paramètres**

L'analyse du degré d'association entre les trente-deux paramètres morpho-physiologiques et biochimiques est déterminée à travers le calcul des coefficients de corrélation de Pearson. Ce test donne les coefficients de corrélation entre les différents paramètres sous forme de matrice de corrélation selon le type de Pearson. Ce type d'analyse a été réalisée à l'aide du logiciel XLstat 2014.

### **3.2.3 Analyse multivariée**

#### **3.2.3.1 Analyse en Composantes Principales (ACP)**

Les trente-deux paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques étudiés en absence et en présence de stress salin ont été soumis à une analyse en composantes principales. Cette technique est définie comme méthode de réduction des données pour mettre en évidence les relations entre deux ou plusieurs caractères et pour diviser la variance totale des caractères originaux en un nombre limité de nouveaux variables non corrélés [132]. Elle consiste à rechercher les corrélations existant entre N variables aléatoires parmi un ensemble de K individus en recherchant les directions (ou composantes) de l'espace qui contiennent la plus grande quantité d'informations, la plus grande quantité de variance. Ces directions sont les composantes principales (CP). Ces

derniers constituent les composantes principales qui sont définies par un ensemble de valeurs propres traduisant la proportion de l'information portée par les variables de départ. Les résultats de l'ACP peuvent être visualisés sur un graphique bi ou tri dimensionnel. Généralement, les deux premières composantes principales peuvent éventuellement faire l'objet d'une interprétation particulière et les dernières pouvant généralement être négligées. Les agrégations des individus dans un tel graphique révéleront les groupes morphologiquement (génétiquement) similaires [133].

### **3.2.3.2 Classification Hiérarchique Ascendante**

L'objectif de la classification hiérarchique ascendante (CHA) est de rassembler des objets dans des classes de plus en plus larges, en utilisant certaines mesures de similarité ou de dissimilarité. Le principe de la CHA consiste à créer une nouvelle partition de l'ensemble des données en agrégeant les deux éléments les plus proches (basée sur ces similitudes / dissimilitudes) selon une distance choisie à priori pour élaborer à la fin un dendrogramme basé sur la liaison moyenne entre un ensemble des groupes (Clusters) (UPGMA "unweighed pair-group method using arithmetic averages"). La ressemblance des individus est mesurée par différents indices (similarité, dissimilarité ou distance). Pour des données quantitatives, la distance euclidienne est la plus appropriée.

#### **Méthode de calcul des distances euclidiennes**

Soit deux point  $x$  et  $y$  définie par les vecteurs  $(x_1, \dots, x_n)$  et  $(y_1, \dots, y_n)$  respectivement. La distance euclidienne entre ces deux points s'écrit alors:

$$D = \sqrt{\sum_{i=1}^n |x_i - y_i|^2}$$

Dans notre étude, ACH a été utilisée pour rassembler les différentes espèces d'*Opuntia* étudié selon leurs similarités morphologiques, physiologiques et biochimique sous chaque niveau du stress salin.

**Partie 3 : Analyse de la diversité génétique et des variations épi-génétiques chez différentes espèces d'*Opuntia* par les marqueurs moléculaires RAPD en réponse à la salinité.**

Contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques, physiologiques et biochimiques), les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante. Ces marqueurs moléculaires deviennent aujourd'hui un outil essentiel d'amélioration des plantes et ouvrent de nouvelles perspectives pour le sélectionneur. La recherche de marqueurs moléculaires étroitement liés aux gènes de résistance est une étape importante avant leur exploitation pratique pour accélérer et améliorer l'efficacité des programmes de sélection [134, 135, 136, 137]. Actuellement, une technique basée sur l'amplification en chaîne par polymérisation ou nommée random amplified polymorphism DNA (RAPD) a été développée par WILLIAMS et al (1990) et par WELSH and MCCLELLAND (1990) [138, 139]. Elle offre le moyen d'étudier la variabilité génétique au sein d'un complexe d'espèces [106, 116, 140], dans les populations naturelles d'une même espèce [141] ou pour caractériser les différents génotypes [114, 108, 142]. Le nombre croissant des travaux réalisés à l'aide des marqueurs RAPD laisse à penser qu'ils seraient un moyen adapté à l'étude de la variabilité génétique de l'*Opuntia* soumise au stress salin. Il est très important de signaler que l'*Opuntia*, jusqu'à nos jours, fait partie de plantes largement ignorées et probablement non étudiées sur le plan moléculaire sous l'effet du stress salin. C'est pourquoi, ce présent travail laisse dégager un parfum d'originalité.

**3.3.1 La technique RAPD**

Elle consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de taille courte (10 nucléotides). Une amorce RAPD permet généralement l'amplification d'une dizaine de fragments correspondant à des locus dominants. Les produits d'amplification sont généralement visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le polymorphisme décelé est dû à des mutations soit dans les régions amplifiées soit au niveau des sites de fixation des amorces. Le polymorphisme révélé est un polymorphisme de sites d'hybridation d'amorce. Les amorces constituent donc les

marqueurs. Cette technique est simple, rapide et ne nécessite ni un marquage radioactif ni une connaissance préalable de la séquence nucléotidique. Néanmoins, la RAPD manque de reproductibilité puisqu'elle est très sensible à la concentration de l'ADN et aux conditions d'amplification [138].

### **3.3.1.1 Matériel végétal**

Il s'agit du même matériel végétal précédemment utilisé (partie 1 et 2) pour des analyses morphologiques physiologiques et biochimiques.

### **3.3.1.2 Extraction, purification et quantification de l'ADN génomique**

#### **a. Echantillonnage**

Les échantillons des espèces d'*Opuntia* étudiées sont collectés, le 23/11/2014. Nous avons prélevé, au hasard, des cladodes jeunes sur des plants âgés de deux ans, stressés à différentes concentrations de NaCl (0, 200, 400 et 600 mM) pendant 60 jours. En effet, nous avons prélevé aléatoirement 3 échantillons pour chaque espèce. Les échantillons sont conservés à une température de 4 °C et analysés au Laboratoire de Physiologie Moléculaire des Plantes (LPMP) au Centre de Biotechnologie de Borj-Cédria (CBBC) en Tunisie

#### **b. Broyage**

C'est une technique manuelle qui consiste à broyer rapidement en présence d'azote liquide une quantité du matériel végétal (> 1g) à l'aide d'un mortier et d'un pilon, qui ont subi préalablement un trempage dans de l'azote liquide, afin de minimiser le temps d'exposition du matériel végétal à la température ambiante et par conséquent, éviter la dégradation de l'ADN.

Il est à noter que le matériel de travail doit être stérilisé avec de l'éthanol (70 %) pour chacun des échantillons. Le broya de chaque échantillons est mis dans des tubes Eppendorf de 2 ml puis conservés au congélateur à -80 °C.

### **c. Description du protocole d'extraction de l'ADN**

L'ADN génomique est extrait en suivant la méthode de Doyle et Doyle (1987), à partir de 1 g de matériel végétal additionné de 1 ml du tampon d'extraction CTAB préalablement chauffé à 65 °C (CTAB 2 %, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, PVP 0.1 M) [143].

Dans un tube Falcon (50 ml), le mélange est ensuite vortexé pendant 20 secondes puis mis à incuber dans un Bain-marie à 65 °C durant une heure, avec agitation toutes les dix minutes par retournement des tubes.

Afin d'éliminer les protéines, nous avons effectué deux extractions à l'aide d'un volume égal de chloroforme-alcool iso amylique (25 : 1V/V).

Après centrifugation pendant 10 minutes à 12000 rpm à 4 °C, le surnageant renfermant les acides nucléiques est transféré dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml. La précipitation est réalisée à l'aide d'un volume égal d'isopropanol. En cas d'absence de formation de précipité, le mélange est placé à -20 °C pendant au moins une heure.

Les pelotes d'ADN sont ensuite récupérées par une centrifugation pendant 20 secondes à 12000 rpm à 4 °C. Suite à l'élimination de l'isopropanol, l'ADN est repris dans 1 ml d'éthanol 75 %, puis transféré dans un tube Eppendorf de 1.5 ml afin d'être centrifugé pendant 20 secondes à 4 °C et à 12000 rpm. Une fois que l'alcool est éliminé, le culot d'ADN obtenu est resuspendu dans un volume de 500 µl de tampon TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4). La dissolution du culot doit être totale.

Jusqu'ici les étapes de purification décrites ci-dessus ont servi pour se débarrasser des déchets protéiques et ribonucléiques, mais non complètement. Le reste d'ARN a été



digéré par l'ajout de 5 µl de RNase. L'ensemble est mis à incuber à 37 °C pendant 25 minutes. Après incubation, un volume de 600 µl d'isopropanol est ajouté dans chaque tube. Le mélange est vortexé pendant 15 secondes puis centrifugé pendant 10 minutes à 12000 rpm à 4 °C.

Après centrifugation, le surnageant récupéré est extrait de nouveau par un volume de 500µl d'éthanol 70 %, afin d'éliminer les protéines des préparations des acides nucléiques, par une centrifugation pendant 15 minutes, à 4 °C et à 12000 rpm, le culot adhérent au fond du tube est égoutté puis, mis à sécher à l'air libre et enfin sous vide pendant 10 minutes. La dissolution de l'ADN est faite par l'addition de 50 µl d'eau distillée stérile filtrée. Les extraits d'ADN sont finalement conservés à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

### **3.3.1.3 Quantification d'ADN par électrophorèse**

Les extraits d'ADN obtenus sont mis à migrer en présence d'un ADN de référence (marqueur de taille 100 pb (Promega) dans un gel d'agarose 1 % pendant une heure à 60 Volts. L'ADN est visualisé sous les rayonnements ultraviolets grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium (0.5 µg/ml).

### **3.3.1.4 Préparation du gel**

Dans un Erlen-meyer, 100 ml de tampon d'électrophorèse TAE 1X (0.04 M Tris-Acétate et 0.001 M EDTA) sont préalablement préparés à partir d'une solution stock TAE (50X) (Tableau 3.1) et additionnés de 1 g d'agarose. L'ensemble est mis dans un four à micro-ondes pendant deux à cinq minutes.

**Tableau 3.1 :** Composition de la solution TAE (x50)

Tris-Base	242 g
Acide acétique glacial 100%	57,1 mL
EDTA 0,5M, pH 8	100 mL

Après avoir refroidi la solution d'agarose, 3  $\mu$ l de BET sont rajoutés. L'ensemble est coulé dans le moule du gel avec un peigne déposé en-dessus. Une fois séché, le gel est transféré dans la cuve à électrophorèse préalablement remplie par du tampon TAE X1.

### **3.3.2 Migration électrophorétique**

Les puits du gel sont chargés par les échantillons de l'ADN à quantifier. Ainsi, 5  $\mu$ l d'ADN additionnés de 1  $\mu$ l de tampon de charge (Tableau 3.2) sont mis à migrer simultanément avec le marqueur de taille 100 pb.

Les gels sont photographiés à l'aide d'un système d'imagerie Bio métra (Bio Doc II TM) équipé d'une caméra vidéo CCD.

Outre les informations concernant la quantité d'ADN, la quantification de ce dernier par électrophorèse nous renseigne aussi sur sa qualité (polymérisation, dégradation ...).

**Tableau 3.2 :** Composition du tampon de charge

Bleu de Bromophénol 1%	1 g
EDTA 0.25 M pH 8	4 ml
Glycérol	50 ml

### **3.3.3 Optimisation des conditions de l'amplification PCR**

Dans notre cas, la diversité génétique chez les 5 espèces soumise aux différents niveaux du stress a été conduite à l'aide de un type de marqueur, qu'il s'agit un marqueur dominants type RAPD.

Dans ce chapitre, nous avons :

- Analysé le polymorphisme génétique lié aux marqueurs RAPD;

- Analysé la structuration phylogénétique des différentes espèces d'*Opuntia* stressées aux différents niveaux de NaCl.

### **3.3.4 Sélection des amorces**

Un lot de 11 amorces UBC (Tableau 3.3) est testé sur les génotypes : (*O. ficus indica* Mill f. *inermis*, *O. engelmannii* var. *longuiformis*). Seules les amorces générant des bandes stables et reproductibles et un degré de polymorphisme élevé sont retenues.

**Tableau 3.3:** Liste des amorces utilisées dans les réactions RAPD

N°	Amorce	Séquence de 5' à 3'	N°	Amorce	Séquence de 5' à 3'
1	UBC-226	GGGCCTCTAT	7	UBC-227	CTAGAGGTCC
2	UBC-241	GCCCGACGCG	8	UBC -261	CTGGCGTGAC
3	UBC-231	AGGGAGTTCC	9	UBC-246	TATGGTCCGG
4	UBC-232	CGGTGACATC	10	UBC-248	GAGTAAGCGC
5	UBC-212	GCTGCGTGAC	11	UBC-243	GGGTGAACCG
6	UBC-238	CTGTCCAGCA			

### **3.3.5 Conditions de l'amplification**

Toutes les réactions sont réalisées dans un thermocycleur GeneAmp PCR-system 9700 en suivant le programme suivant : un cycle de dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, suivi de 45 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 5 secondes, une dénaturation surnuméraire à 92 °C pendant 20 secondes, une hybridation de l'amorce à l'ADN à 37 °C pendant 2 minutes, une phase d'élongation à 72 °C pendant une minute et une phase d'extension finale pendant 7 minutes à 72 °C.

### **3.3.6 Visualisation des produits d'amplification**

Les produits des différentes amplifications sont séparés par électrophorèse dans un gel d'agarose 1.6 % dans un tampon TAE 1 fois concentré (Tris- Acétate- EDTA) à raison de 3 V.cm<sup>-1</sup> et pendant deux heures.

Les bandes RAPD sont visualisées grâce à la présence du bromure d'éthidium dans le gel et sous les rayonnements ultraviolets émis par un transilluminateur. Les photos des gels sont prises par le système d'imagerie Biometra (Bio DOC II).

### **3.3.7 Traitements statistiques des données expérimentales**

#### **3.3.7.1 Discrétisation des données du génotypage**

Les bandes amplifiées sont désignées en utilisant le code de l'amorce suivi en indice de sa taille en paires de bases. Seules les bandes polymorphes, intenses et stables sont comptabilisées en leur attribuant 1 pour leur présence et 0 pour leur absence.

L'ensemble des données est répertorié sur Excel en matrice rectangulaire sous forme de tableau : génotype stressée ou non / présence-absence du marqueur (1/0).

#### **3.3.7.2 Paramètres statistiques liés au polymorphisme génétique**

Afin de s'appréhender du degré du polymorphisme généré par les marqueurs RAPD, nous avons calculé le nombre total de bandes générées pour chaque amorce, le nombre de bandes polymorphes, le nombre de profils électrophorétiques, le degré de polymorphisme (DP) ainsi que le pouvoir de résolution des amorces (Rp).

Le degré de polymorphisme (DP) est calculé comme suit :

$$DP = \text{nombre de bandes polymorphes} / \text{nombre total de bandes} \times 100$$

Le pouvoir de résolution des amorces est estimé comme décrit par PREVOST et WILKINSON (1999) [144], en suivant la formule de GILBERT et al (1999) [145] :

$$R_p = \sum I_b$$

Avec :  $I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$

p : proportion des accessions contenant la bande polymorphe I.

### **3.3.7.3 Visualisation de la structuration phylogénétique des espèces d'*Opuntia***

A partir des données du génotypage RAPD réalisé sur les 5 espèces d'*Opuntia* soumises aux différents niveaux du stress salin, nous avons recherché une éventuelle structuration phylogénétique en fonction de leur proximité génétique en utilisant le logiciel Darwin (5.0 version) (<http://darwin.cirad.fr/darwin>).

Pour ce faire, nous avons effectué :

- Une clustérisation arborée sous forme de dendrogramme,
- Une analyse multi-variée type AFC.

#### **3.3.7.3.1 Classification hiérarchique**

Les distances génétiques sont utilisées pour le calcul d'arbres en suivant la méthode UPGMA [146] et le dendrogramme est ensuite construit par le logiciel Darwin.

#### **3.3.7.3.2 Analyse Factorielle de Correspondances**

A partir des distances génétiques calculées, la structuration phylogénétique est visualisée par la projection des coordonnées individuelles des génotypes selon les axes 1 et 2 de l'AFC, présentant les pourcentages les plus élevés de la variation génétique, ce qui a permis l'éclatement des nuages de points et éventuellement la définition de la structuration de la diversité.

## CHAPITRE 4

### RESULTATS ET DISCUSSION

#### **Partie I : Etude de l'effet du NaCl sur le comportement morpho-physiologique et biochimique de cinq espèces d'*Opuntia* et la recherche des marqueurs morphologique, physiologique et biochimique lié au stress**

Ce travail a pour objectif l'évaluation de la variabilité morpho-physiologique et biochimique de 5 espèces d'*Opuntia* en vue d'élucider leur degré de résistance à la salinité. Pour y parvenir, nous avons essayé d'évaluer l'effet du stress salin sur le nombre, la longueur et le poids frais racinaire, la longueur, la largeur et le poids frais des cladodes âgées et jeunes, le rapport du poids frais racinaire / le poids frais aérienne, la teneur en chlorophylle totale, « a » et « b » dans les cladodes âgées et jeunes, la teneur en Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>+2</sup> dans les parties aérienne et racinaire, la teneur relative en eau dans les cladodes âgées et jeunes, la teneur en proline et en sucres solubles au niveau de chaque organe chez les espèces étudiées: *O. ficus indica*, *O. amycleae*, *O. streptacantha*, *O. engelmannii* et ceci en utilisant différentes doses de NaCl dans un premier temps et dans un deuxième temps de sélectionner un marqueur morphologique, physiologique et biochimique ceci dans le but de pratiquer une sélection précoce des plants d'*Opuntia* tolérants à la salinité.

Au niveau de tous les traitements salin (200 mM ; 400 mM et 600 mM NaCl), l'*Opuntia robusta* a été exclu par ce que a été totalement affectée par le premier, le deuxième et le troisième niveau du stress salin (200 mM, 400 Mm et 600 mMNaCl)

Au troisième niveau de stress (600 mM NaCl), l'*Opuntia amycleae* a été exclu par ce que àqqq été totalement touché par le troisième niveau du stress salin (600 mM)

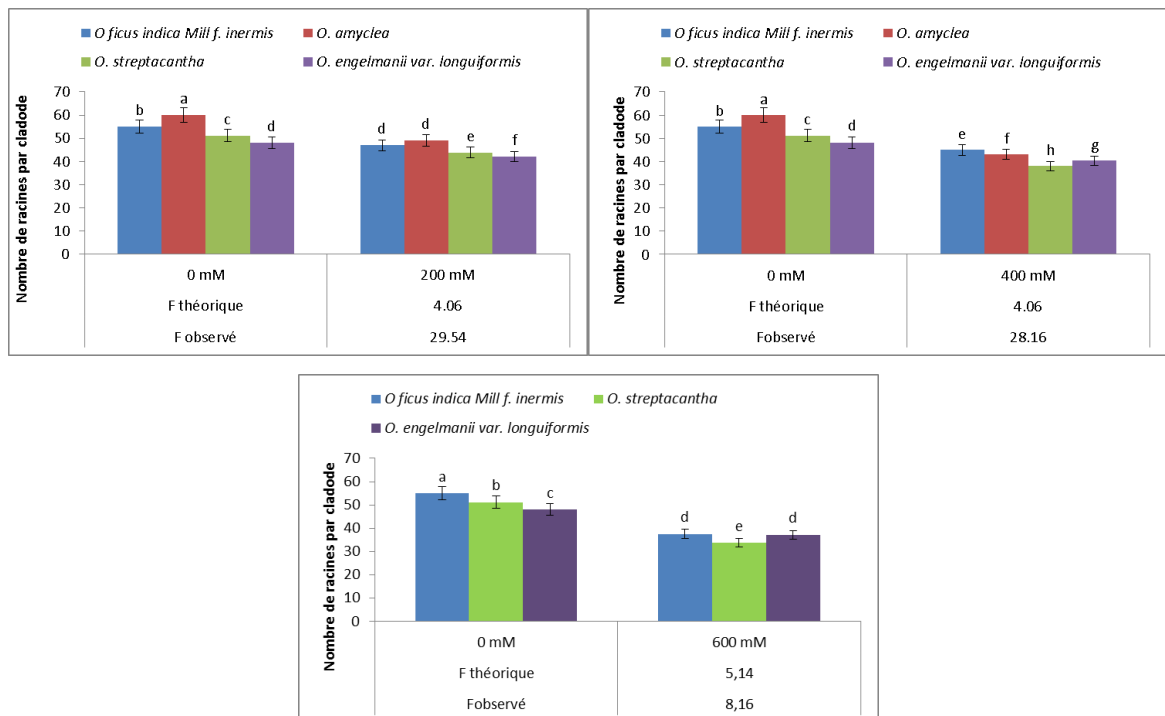
#### **4.1.1 Les paramètres morphologiques**

##### **4.1.1.1 Effet de la contrainte saline sur le nombre de racines**

Le nombre des racines les plus élevées sont observées chez les témoins, avec une valeur maximale de (60 ± 1) enregistrée chez l'*O. amycleae* et une valeur minimale de

( $51.2 \pm 1$ ,  $48 \pm 0.8$ ) enregistrée chez l'*O. streptacantha* et l'*O. engelmannii* respectivement. Par opposition, le nombre des racines les plus faibles sont enregistrés au niveau des trois traitements du stress salin (200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl) chez toutes les espèces étudiées (Tableaux 4.1, 4.2 et 4.3; Figure 4. 1, figure 4.9).

Au niveau de tous les traitements salin (200 mM ; 400 mM et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.1), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur le nombre de racines de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 1, 2, 3, appendice B).



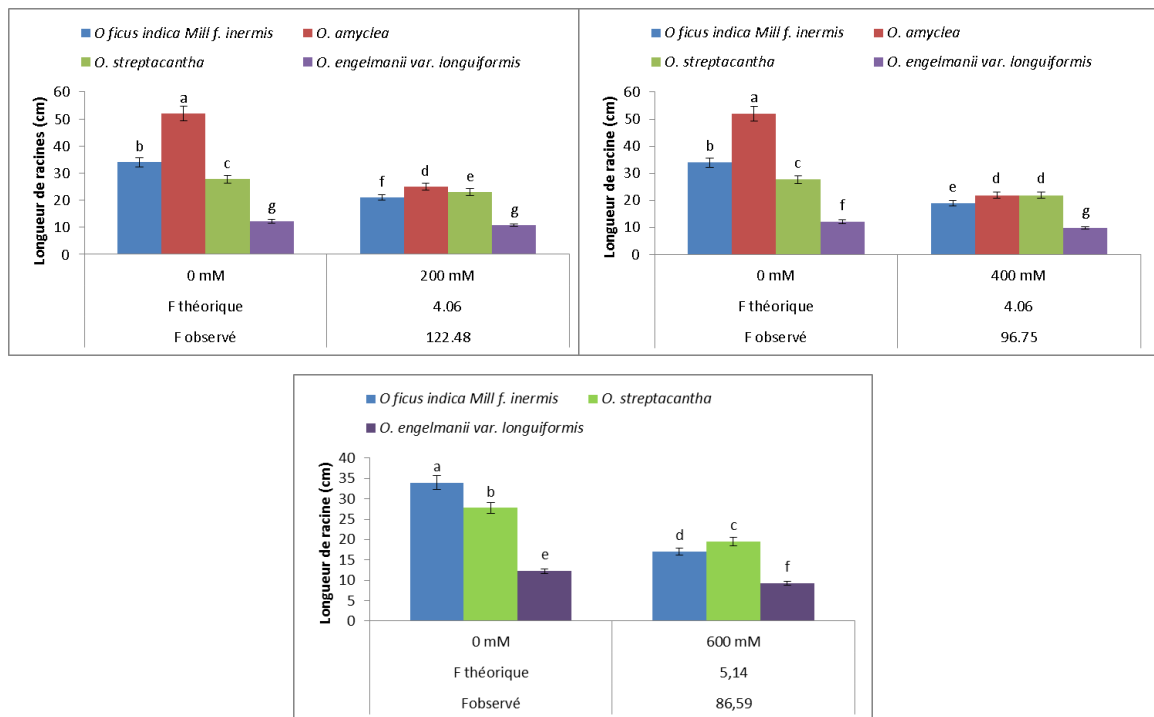
**Figure 4.1:** Variation relative du nombre de racines après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

La comparaison de  $F_{\text{Observé}}$  des nombre de racines après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl) montre que ce paramètre est plus discriminant sous l'effet de stress salin faible 200 mM ( $F_{\text{Observée}} = 29.54$ ; Tableaux 4.1 ; 4.2 et 4.3 ; figure 4.1).

#### 4.1.1.2 Effet de la contrainte saline sur la longueur de racine la plus longue

En l'absence de contrainte saline (témoin), l'*O. amycleae* présente la longueur la plus élevée. Par contre, l'*O. engelmannii* représente la longueur la plus faible par rapport aux autres espèces étudiées (*O. ficus indica* et *O. streptacantha*) qui sont proches entre elles (Tableaux 4.1, 4.2 et 4.3; figure 4.2 ; Figure 4.9).

Au premier niveau de stress 200 mM de NaCl, l'analyse de la variance (Tableau 4.1 ; figure 4.2), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la longueur de racine la plus longue chez : *O. ficus indica*, *O. amycleae* et *O. streptacantha* ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ). Cependant, il n'existe aucune différence significative pour *O. engelmannii* ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$  ; Tableau 1, appendice B).



**Figure 4.2:** Variation relative de la longueur de racine après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

Au deuxième et au troisième niveau de stress (400 mM, 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4.2, 4.3 ; figure 4.2), montre un effet très hautement significatif du



stress salin sur la longueur de racine la plus longue de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 2, 3, appendice B).

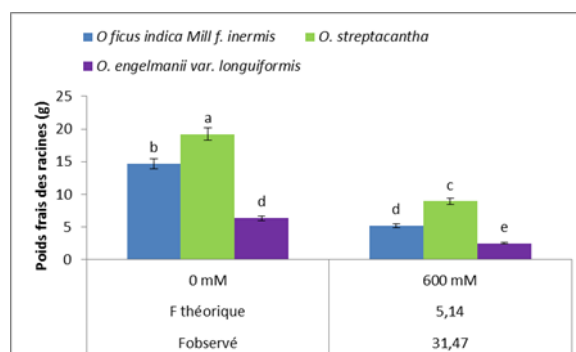
La comparaison de  $F_{\text{Observé}}$  montre que ce caractère est plus discriminant sous le niveau de stress salin faible 200 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 122.48$ ; Tableaux 4.1, 4.2 et 4.3; figure 4.2).

#### 4.1.1.3 Effet de la contrainte saline sur le poids frais des racines

Les résultats notent une diminution des valeurs du poids frais racinaire chez les différentes espèces étudiées. Ainsi, chez les témoins, les poids frais des racines restées plus élevées, comparativement aux poids frais des racines traitées par les différents niveaux de sel (Tableaux 4.1; 4.2; 4.3; Figure 4.3).

La figure 4.3 et les tableaux 4.1, 4.2, révèlent que le premier et le deuxième niveau de stress salin (200 et 400 mM NaCl) n'ont pas induit un impact significatif sur le poids frais des racines chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 1, 2, appendice B).

Sous stress salin sévère (600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4.3; Figure 4.3), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur le poids frais des racines de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableau 3, appendice B).



**Figure 4.3:** Variation relative du poids frais racinaire après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

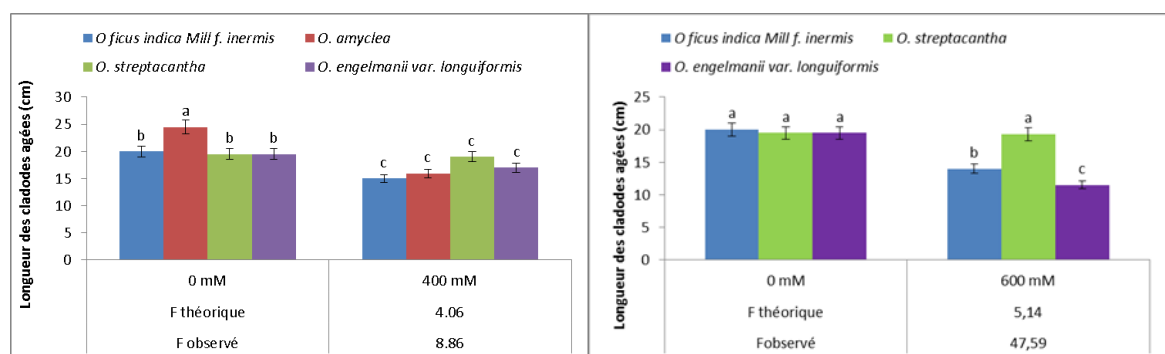
La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress salin sévère 600 mM ( $F_{\text{Observée}} = 31.47$  ; Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; figure 4.3).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que chez l'*O. ficus indica*, l'*O. engelmannii* et l'*O. streptacantha*, l'effet du sel ne se fait sentir qu'à partir de 600 mM NaCl, où elles enregistrent respectivement des réductions de 64.62 % ; 60.62 % ; 53.38 % par rapport au témoin.

#### 4.1.1.4 Effet de la contrainte saline sur la longueur des cladodes âgés

En l'absence de stress salin, l'*O. amycleae* présente le développement de longueur des cladodes âgés le plus important. Par contre, la plus faible longueur est enregistrée pour l'*O. streptacantha* et l'*O. engelmannii* (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; figures 4.4 ; 4.9).

L'analyse de la variance indique que la longueur des cladodes âgés de l'*O. ficus indica*, l'*O. amycleae*, l'*O. streptacantha* et l'*O. engelmannii* en présence de 200 mM NaCl ne présente pas de différence significative ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{théorique}}$  ; Tableau 1, appendice B).



**Figure 4.4:** Variation relative de la de la longueur des cladodes âgés après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

Sous stress salin modéré et sévère (400 mM, 600 mM), l'analyse de la variance (Tableaux 4.2 ; 4.3 ; Figure 4.4), montre un effet très hautement significatif du stress salin

sur la longueur des cladodes âgées chez l'*O. amycteleae* ; l'*O. ficus indica* et l'*O. streptacantha* ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 2, 3, appendice B). Cependant, il n'existe aucune différence significative pour l'*O. engelmannii* ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ).

D'après les résultats obtenus, nous constatons que chez l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, l'*O. amycteleae* et l'*O. streptacantha*, l'effet du sel ne se fait sentir qu'à partir de 400 Mm NaCl.

Nos résultats indiquent que la longueur des cladodes âgées de l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* en présence de 200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl, ne présente pas de différence significative par rapport au témoin ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce caractère est plus discriminant sous le niveau de stress salin sévère (600 mM NaCl) ( $F_{\text{Observée}} = 47.59$  ; figure 4.4).

#### **4.1.1.5 Effet de la contrainte saline sur la largeur des cladodes âgées**

Au niveau de témoin, l'*O. ficus indica* présente le développement de largeur des cladodes âgées le plus important par contre l'*O. streptacantha* et l'*O. engelmannii* enregistrent la largeur la plus petite (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; Figure figure 4.9).

Au niveau de tous les traitements salin (200 mM, 400 mM et 600 Mm), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2 ; 4.3 ; figure 4.9), indiquent que la largeur des cladodes âgée de toutes les espèces étudiées, ne présentent pas de différence significative ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 1, 2, 3, appendice B).

#### **4.1.1.6 Effet de la contrainte saline sur la largeur des cladodes jeunes**

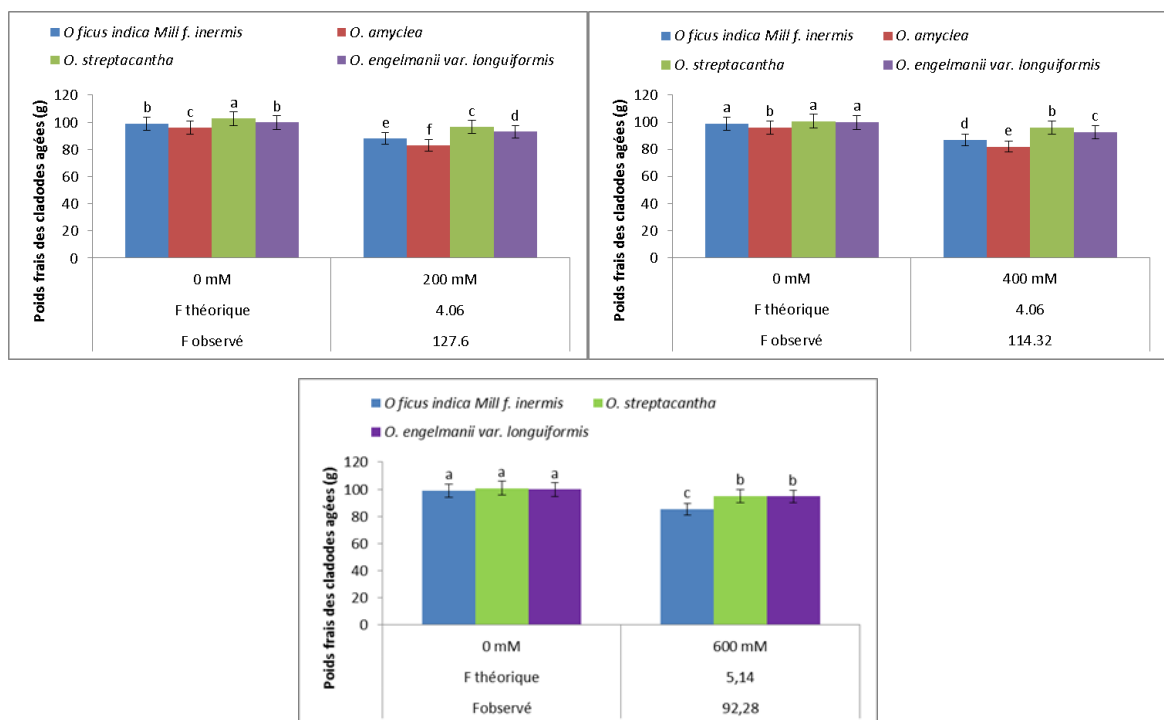
La figure 4.9 et tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3, révèlent qu'au niveau de tous les traitements: témoin, 200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl, la largeur des cladodes jeunes se

manifeste d'une manière indépendante du degré de la contrainte saline chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 1, 2, 3, appendice B).

#### 4.1.1.7 Effet de la contrainte saline sur le poids frais des cladodes âgées

Au niveau du témoin, l'*O. streptacantha* présente le poids frais le plus élevé par contre l'*O. amycleae* élabore moins de matière fraîche du cladode âgée par rapport aux autres espèces qui enregistrent des valeurs un peu voisines (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; Figures 4.5).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM et 600 mM), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; Figure 4.5), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur le poids frais des cladodes âgées de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 1, 2, 3, appendice B).



**Figure 4.5:** Variation relative du poids frais des cladodes âgées après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

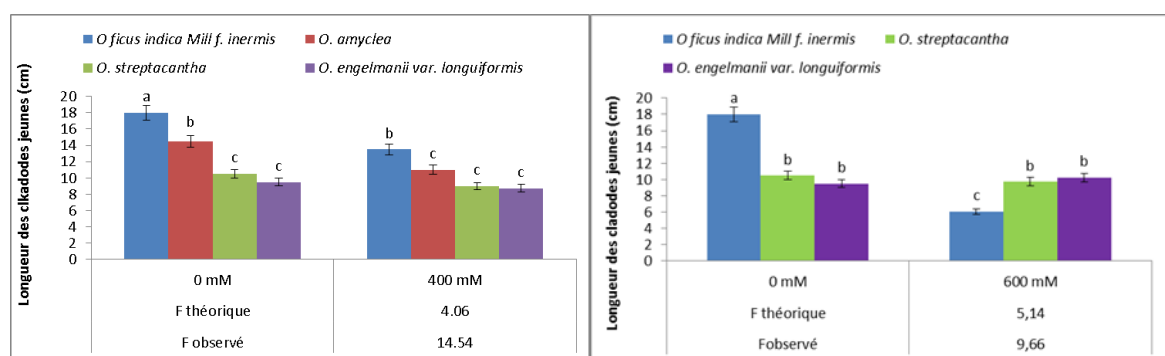
La comparaison de  $F_{\text{Observé}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress salin faible 200 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 127.6$  ; figure 4.5).

#### 4.1.1.8 Effet de la contrainte saline sur la longueur des cladodes jeunes

Au niveau du témoin, l'*O. ficus indica*, présente le développement de longueur des cladodes jeunes le plus important. Par contre, la plus faible longueur est enregistrée pour l'*O. streptacantha* et l'*O. engelmannii* (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; Figure 4.6 et 4.9).

Nos résultats indiquent que la longueur des cladodes jeunes de toutes les espèces étudiées, en présence de 200 Mm NaCl ne présente pas de différence significative ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{théorique}}$  ; Tableau 1, appendice B).

Au niveau de stress salin modéré et sévère (400 mM, 600 mM de NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4.2, 4.3; figure 4.6), montre un effet significatif du stress salin sur la longueur des cladodes jeunes ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableau 2, 3, appendice B) chez l'*O. ficus indica* et l'*O. amyctea*. Un autre résultat intéressant à noter est que sur milieu sévèrement salin l'*O. engelmannii* et l'*O. streptacantha* ont développé des longueurs statistiquement presque identiques à celles enregistrées sur le témoin ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ).



**Figure 4.6:** Variation relative de la longueur des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

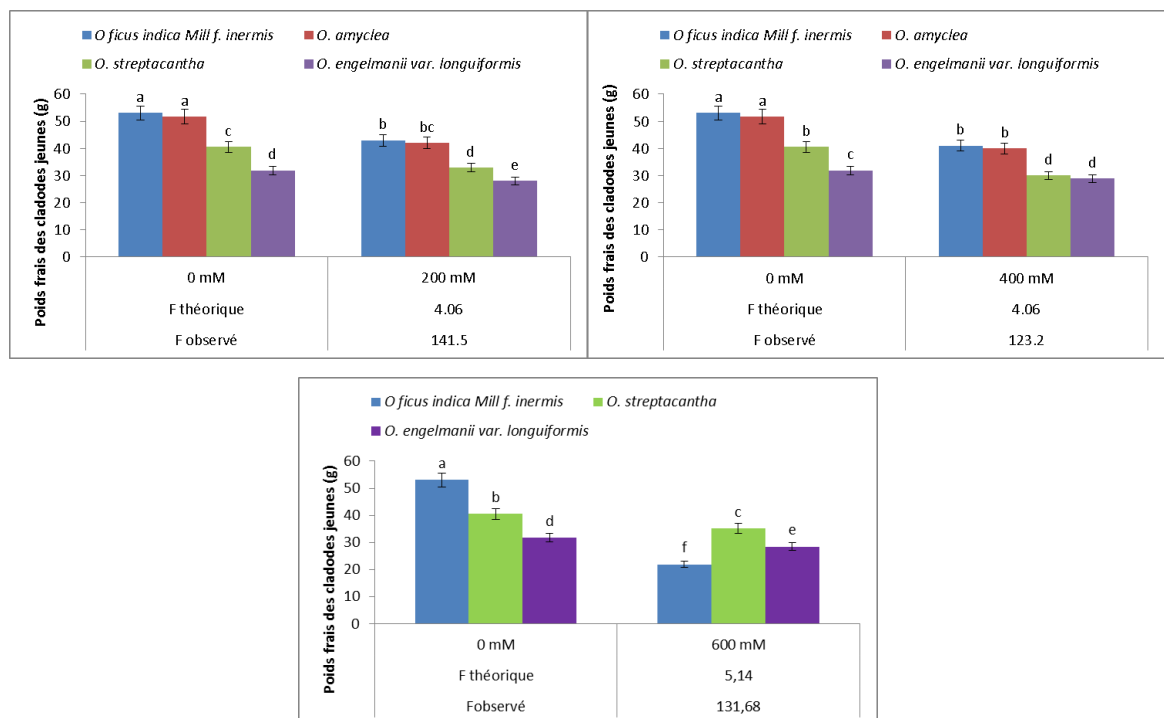
La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce caractère est plus discriminant sous le niveau de stress salin modéré (400 mM NaCl) ( $F_{\text{Observée}} = 14.54$  ; figure 4.6).

#### 4.1.1.9 Effet de la contrainte saline sur le poids frais des cladodes jeunes

En l'absence de stress, l'*O. ficus indica* présente le poids frais le plus important, suivi par l'*O. amyctlea* par contre l'*O. engelmannii* qui représente le poids le plus faible (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; Figure 4.7).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.7), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur le poids frais des cladodes jeunes de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ , Tableaux 1, 2, 3, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress le plus sévère 600 mM ( $F_{\text{Observée}} = 141.5$  ; figure 4.7).



**Figure 4.7:** Variation relative du poids frais des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

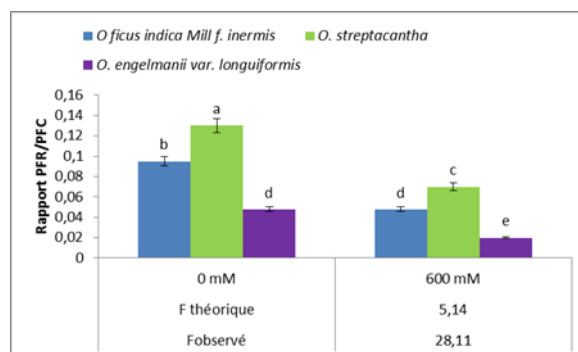
#### 4.1.1.10 Effet de la contrainte saline sur le rapport du poids frais de la partie racinaire/ poids frais de la partie aériennes

En l'absence de stress, l'*O. streptacantha* présente le rapport du poids frais racine / partie aérienne le plus important. Par contre, l'*O. engelmannii* représente le rapport le plus faible par rapport aux autres espèces qui enregistrent des valeurs voisines (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; figure 4.8).

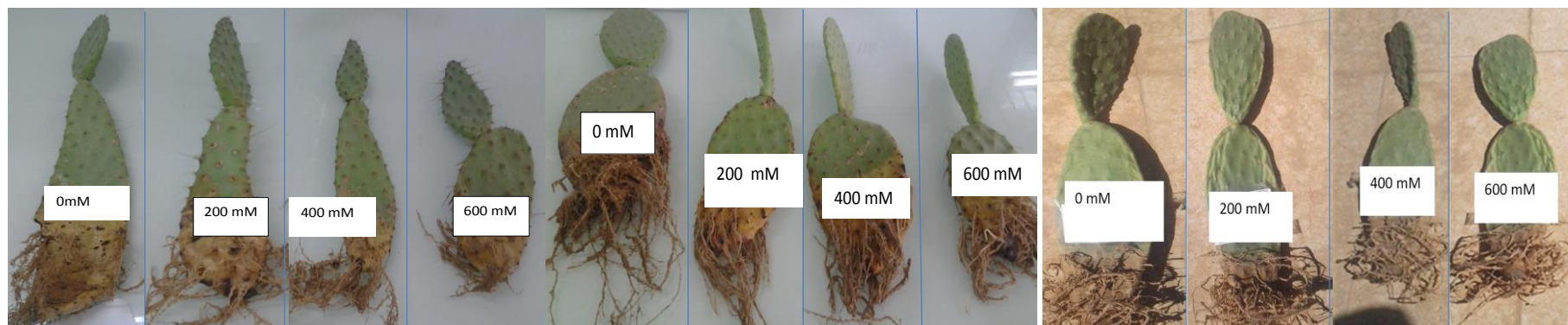
Nos résultats indiquent que le rapport du poids frais de la partie racinaire/ poids frais de la partie aériennes de toutes les espèces étudiées, en présence de 200 mM et 400 mM ne présente pas de différence significative ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{théorique}}$  ; Tableaux 1, 2, appendice B).

Au niveau de stress salin sévère (600 mM) l'analyse de la variance (Tableaux 4.2, 4.3 ; figure 4.8), montre un effet hautement significatif du stress salin sur le rapport du poids frais de la partie racinaire/ poids frais de la partie aérienne chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableau 3, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress le plus sévère 600 mM ( $F_{\text{Observée}} = 28.11$  ; figure 4.8).



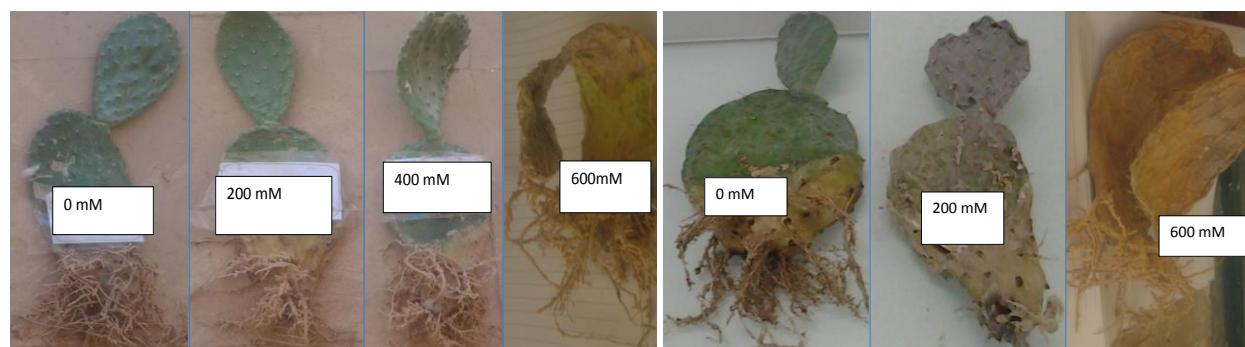
**Figure 4.8:** Variation PFR/PFC après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).



*O. engelmannii* var. *longuiformis*

*O. streptacantha*

*O. ficus indica* Mill f. *inermis*



*O. amyacleae*

*O. robusta* var. *robusta*

**Figure 4.9:** Effet de NaCl sur l'ensemble des paramètres morphologiques

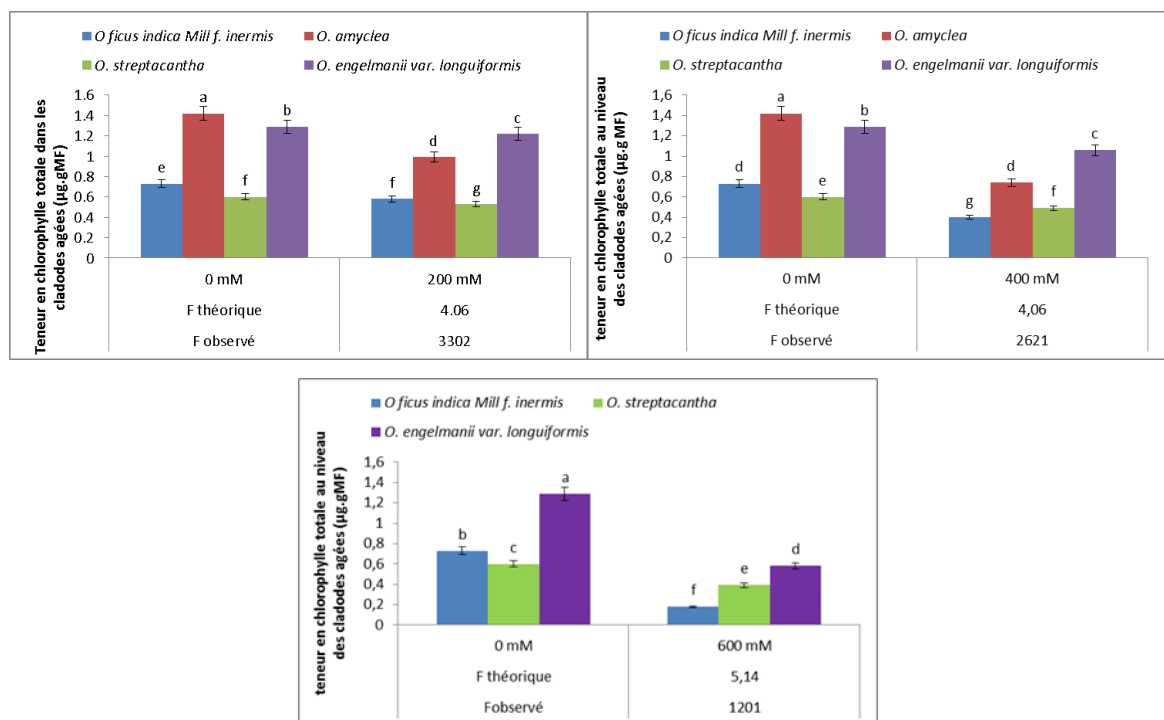


## 4.1.2 Les paramètres physiologiques

### 4.1.2.1 Teneur en chlorophylle totale au niveau des cladodes âgés

Au niveau du témoin, l'*O. amyctea* présente la teneur en chlorophylle totale au niveau des cladodes âgés la plus élevée suivie par l'*O. streptacantha*. Par contre, la teneur la plus faible est observée chez l'*O. engelmannii* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.10).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.12), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes âgés de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).



**Figure 4.10:** Variation relative de la teneur en chlorophylle totale au niveau des cladodes âgés après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

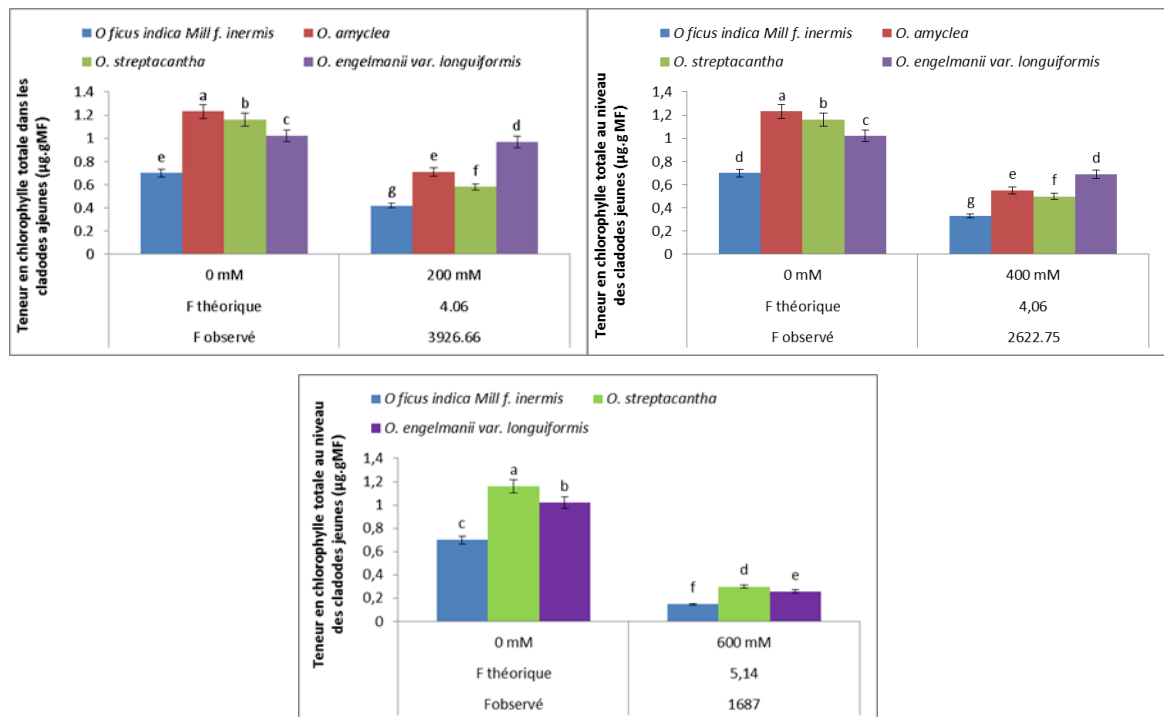
La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress faible 200 mM ( $F_{\text{Observée}} = 3302$  ; figure 4.10).

#### 4.1.2.2 Teneur en chlorophylle totale au niveau des cladodes jeunes

En l'absence de stress, l'*O. amyclea* présente la teneur en chlorophylle totale au niveau des cladodes jeunes la plus élevée. Par contre, la teneur la plus faible est observée chez l'*O. ficus indica* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.11).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.11), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  des teneurs en chlorophylle totale au niveau des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl) montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress faible 200 mM ( $F_{\text{Observée}} = 3926.66$ ; figure 4.11).



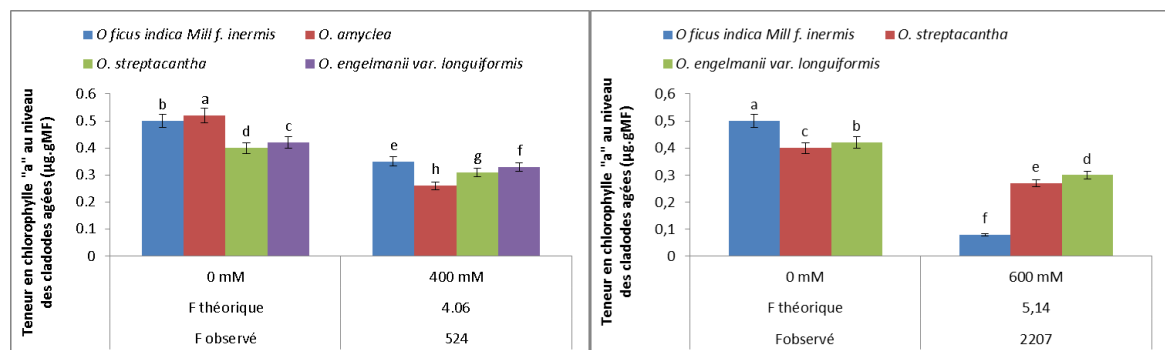
**Figure 4.11:** Variation relative de la teneur en chlorophylle totale au niveau des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

### 4.1.2.3 Teneur en chlorophylle « a » au niveau des cladodes âgés

En l'absence de stress, l'*O. amycleae* présente la teneur en chlorophylle « a » au niveau des cladodes âgés la plus élevée. Par contre la teneur la plus faible est observée chez l'*O. streptacantha* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.12).

Au niveau de stress salin faible (200 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4.1 ; figure 4.12), indique que la teneur en chlorophylle « a » au niveau des cladodes âgés de toutes les espèces étudiées, ne présente pas de différences significative ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ; Tableau 4, appendice B).

Au niveau de traitement salin modéré et sévère (400 mM et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.2, 4.3 ; figure 4.12), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur en chlorophylle « a » au niveau des cladodes âgés de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 5, 6, appendice B).



**Figure 4.12:** Variation relative de la teneur en chlorophylle « a » au niveau des cladodes âgés après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

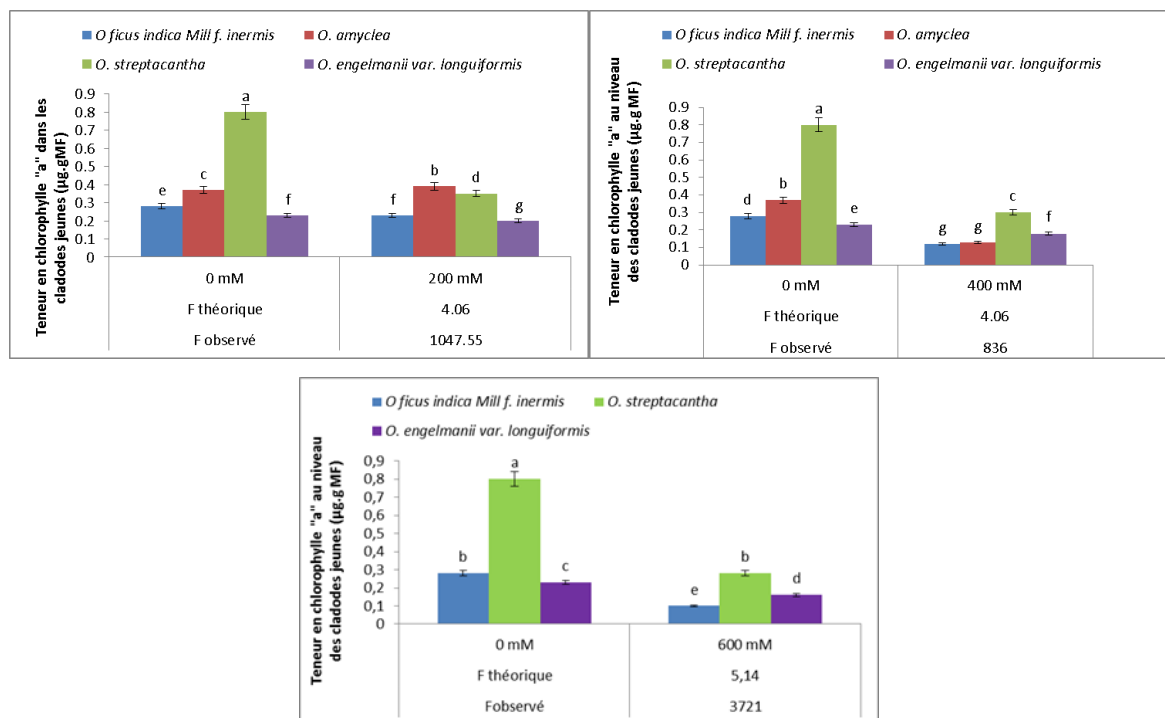
La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  des teneurs en chlorophylle « a » au niveau des cladodes âgés après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl) montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress sévère 600 mM ( $F_{\text{Observée}} = 2207$ ; figure 4.12).

#### 4.1.2.4 Teneur en chlorophylle « a » au niveau des cladodes jeunes

Au niveau de témoin, l'*O. streptacantha* présente la teneur en chlorophylle « a » au niveau des cladodes jeunes la plus élevée. Par contre, la teneur la plus faible est observée chez l'*O. engelmannii* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.13).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.13), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur ce paramètre chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress sévère 600 mM ( $F_{\text{Observée}} = 3721$ ; figure 4.13).

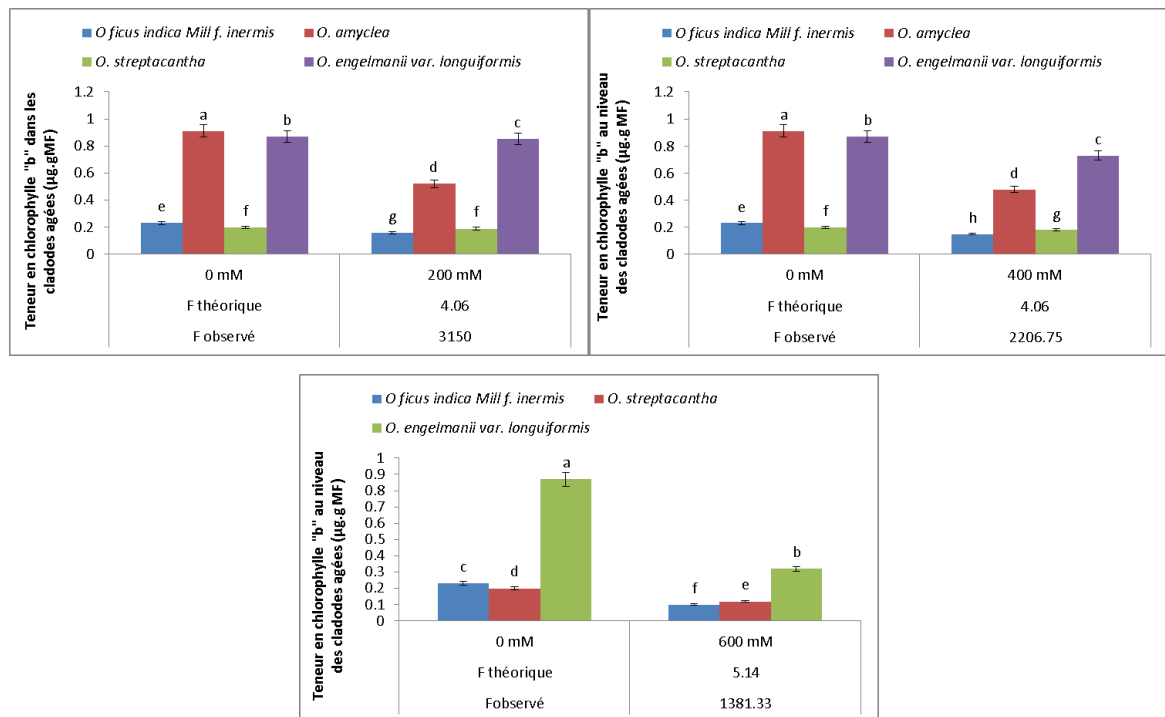


**Figure 4.13:** Variation relative de la teneur en chlorophylle « a » au niveau des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

#### 4.1.2.5 Teneur en chlorophylle « b » au niveau des cladodes âgés

Dans les conditions normales (témoin), l'*O. amyctea* présente la teneur en chlorophylle « b » au niveau des cladodes âgés la plus élevée suivie par l'*O. engelmannii*. Par contre, la teneur la plus faible est observée chez l'*O. ficus indica* et l'*O. streptacantha* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.14).

Au premier niveau de stress 200 mM NaCl, l'analyse de la variance (Tableau 4.1 ; figure 4.14), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur ce paramètre chez l'*O. ficus indica*, l'*O. amyctea* et l'*O. engelmannii* ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableau 4, appendice B). Cependant, ce niveau de stress n'a pas affecté la teneur en chlorophylle « b » au niveau des cladodes âgés de l'*O. streptacantha* ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ).



**Figure 4.14:** Variation relative de la teneur en chlorophylle « b » au niveau des cladodes âgés après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

Au niveau de stress salins modérée et sévère (400 mM, 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4.2, 4.3 ; figure 4.14), montre un effet très hautement significatif

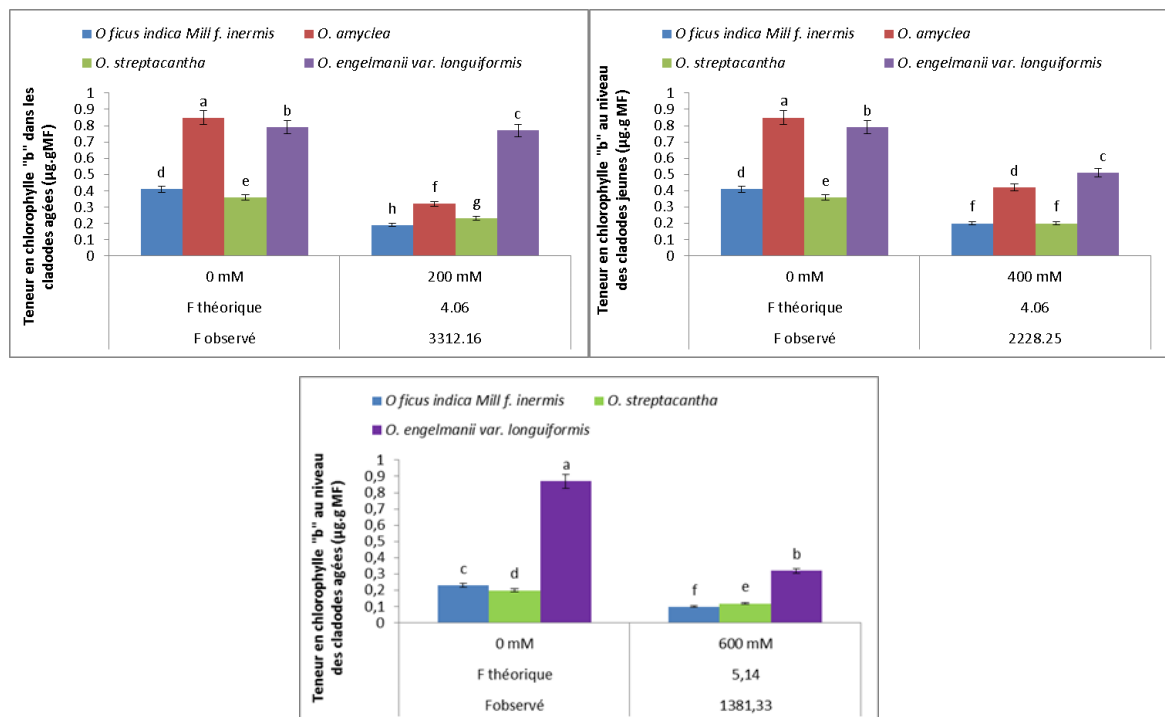
du stress salin sur ce paramètre chez toutes les espèces analysées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress faible 200 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 3150$ ; figure 4.14).

#### 4.1.2.6 Teneur en chlorophylle « b » au niveau des cladodes jeunes

Au niveau de témoin, l'*O. amycleae* présente la teneur en chlorophylle « b » au niveau des cladodes jeunes la plus élevée. Par contre, la teneur la plus faible est observée chez l'*O. streptacantha* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.15).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.15), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur ce paramètre chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).



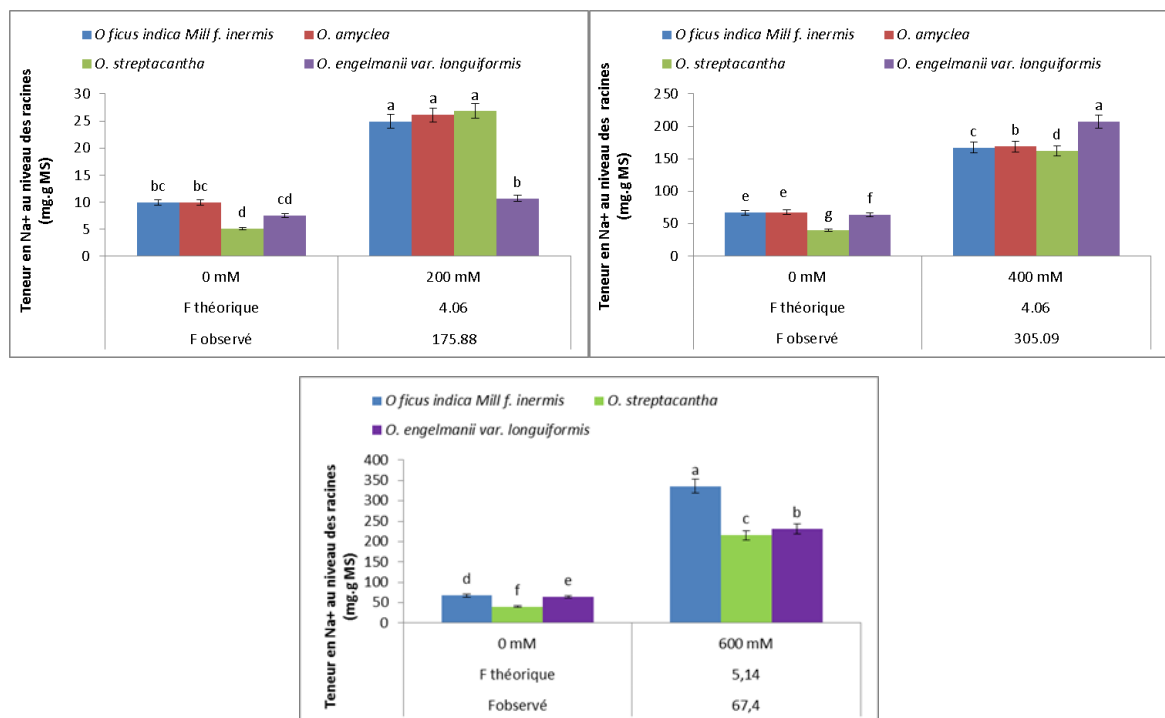
**Figure 4.15:** Variation relative de la teneur en chlorophylle « b » au niveau des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress faible 200 mM ( $F_{\text{Observée}} = 3312.16$ ; figure 4.15).

#### 4.1.2.7 Teneur en $\text{Na}^+$ au niveau des racines

Dans les conditions normales (témoin), l'*O. amyctea* et l'*O. ficus indica* présente les teneurs en  $\text{Na}^+$  au niveau des racines les plus élevées suivi par l'*O. engelmannii*. Par contre, la teneur la plus faible est observée chez l'*O. streptacantha* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.16).

Au niveau de tous les traitements salin faible, modéré et sévère (200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; Figure 4.16), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur en  $\text{Na}^+$  au niveau des racines de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).



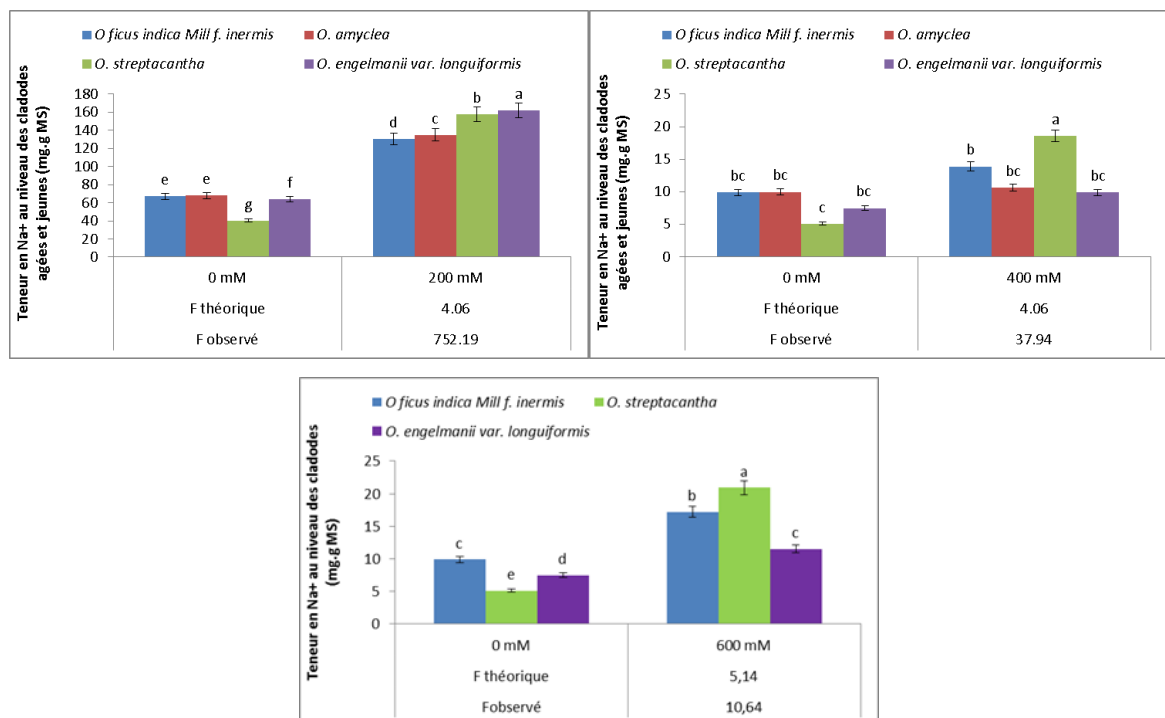
**Figure 4.16:** Variation relative de la teneur en  $\text{Na}^+$  au niveau des racines après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress modéré 400 mM ( $F_{\text{Observée}} = 305.09$ ; figure 4.16).

#### 4.1.2.8 Teneur en $\text{Na}^+$ au niveau des cladodes

Au niveau de témoin, l'*O. amyctea* et l'*O. ficus indica* présente les teneurs en  $\text{Na}^+$  au niveau des cladodes les plus élevées. Par contre, la teneur la plus faible est observée chez l'*O. streptacantha* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.17).

Au niveau de traitements salins faible et sévère (200 mM et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.3 ; figure 4.17), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur en  $\text{Na}^+$  au niveau des cladodes de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 6, appendice B).



**Figure 4.17:** Variation relative de la teneur en  $\text{Na}^+$  au niveau des cladodes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

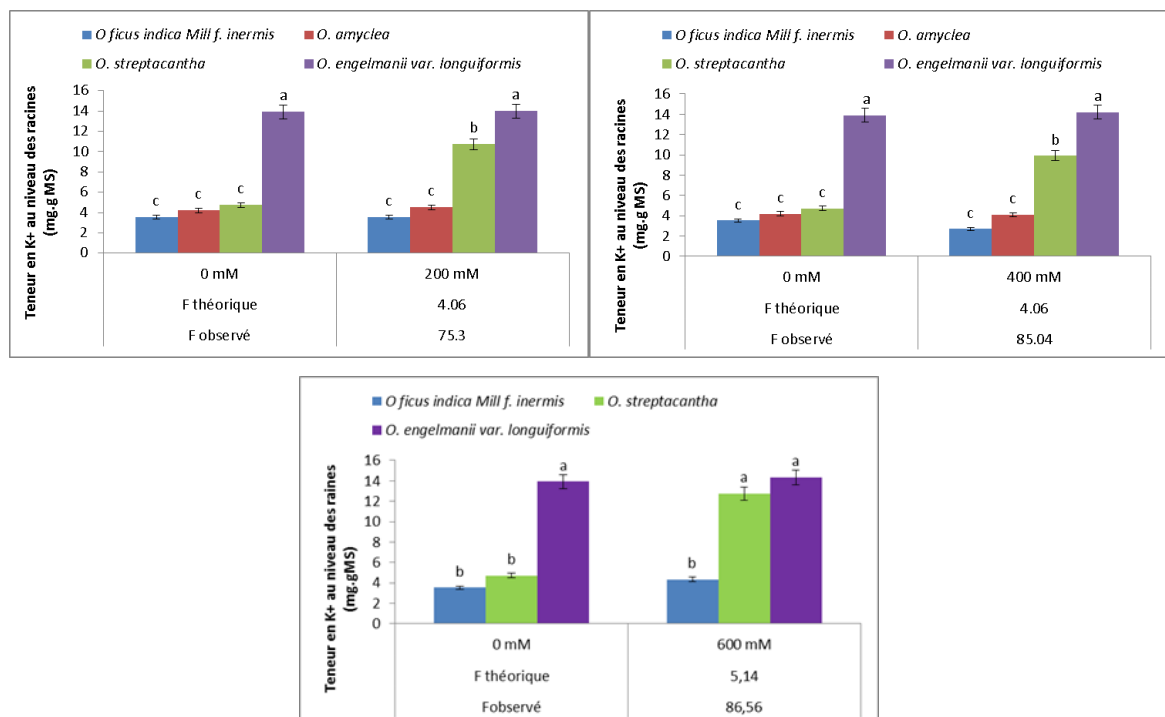


En présence de 400 mM NaCl dans l'eau d'irrigation, l'analyse de la variance (Tableau 4.2 ; figure 4.17), montre un effet très hautement significatif du stress sur la teneur en  $\text{Na}^+$  au niveau des cladodes de l'*O. ficus indica* et l'*O. streptacantha* ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ). Cependant, aucune différence significative n'a été observée par rapport au témoin chez l'*O. amyctea* et l'*O. engelmannii* ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$  ; Tableau 5, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress faible 200 mM ( $F_{\text{Observée}} = 752.19$ ; figure 4.17).

#### 4.1.2.9 Teneur en $\text{K}^+$ au niveau des racines

Au niveau du témoin, l'*O. engelmannii* présente la teneur en  $\text{K}^+$  au niveau des racines la plus élevée. Par contre, les teneurs les plus faibles sont observées chez l'*O. ficus indica*, l'*O. amyctea* et l'*O. streptacantha* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.18).



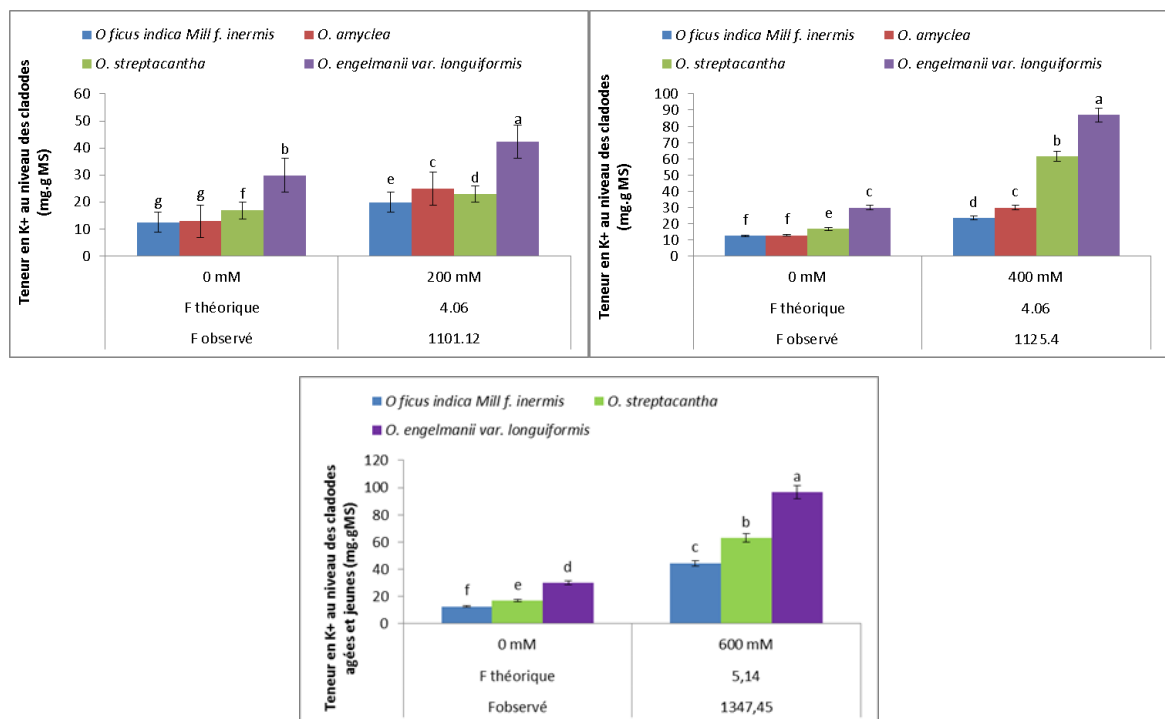
**Figure 4.18:** Variation relative de la teneur en  $\text{K}^+$  au niveau des racines après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.18), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur en  $K^+$  au niveau des racines de l'*O. streptacantha* ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B). Cependant, aucune différence significative n'a été observée par rapport au témoin chez l'*O. ficus indica* et l'*O. engelmannii* ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress sévère 600 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 86.56$  ; figure 4.18).

#### 4.1.2.10 Teneur en $K^+$ au niveau des cladodes âgés et jeunes

En l'absence de stress, l'*O. engelmannii* présente la teneur en  $Ca^{2+}$  au niveau des cladodes la plus élevée. Par contre, les teneurs les plus faibles sont observées chez l'*O. ficus indica* et l'*O. amyctea* (Tableau 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.19).



**Figure 4.19:** Variation relative de la teneur en  $K^+$  au niveau des cladodes âgés et jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

Au niveau de stress salins faible, modérée et sévère (200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.19), montre un effet très hautement significatif du stress sur la teneur en  $K^+$  au niveau des cladodes chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress sévère 600 mM ( $F_{\text{Observée}} = 1347.45$  ; figure 4.19).

#### **4.1.2.11 Teneur en $Ca^{2+}$ au niveau des racines**

Dans les conditions normales (témoin), l'*O. streptacantha* présente la teneur en  $Ca^{2+}$  au niveau des racines, la plus élevée suivie par l'*O. engelmannii*. Par contre, les teneurs les plus faibles sont observées chez l'*O. ficus indica* et l'*O. amycleae* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3).

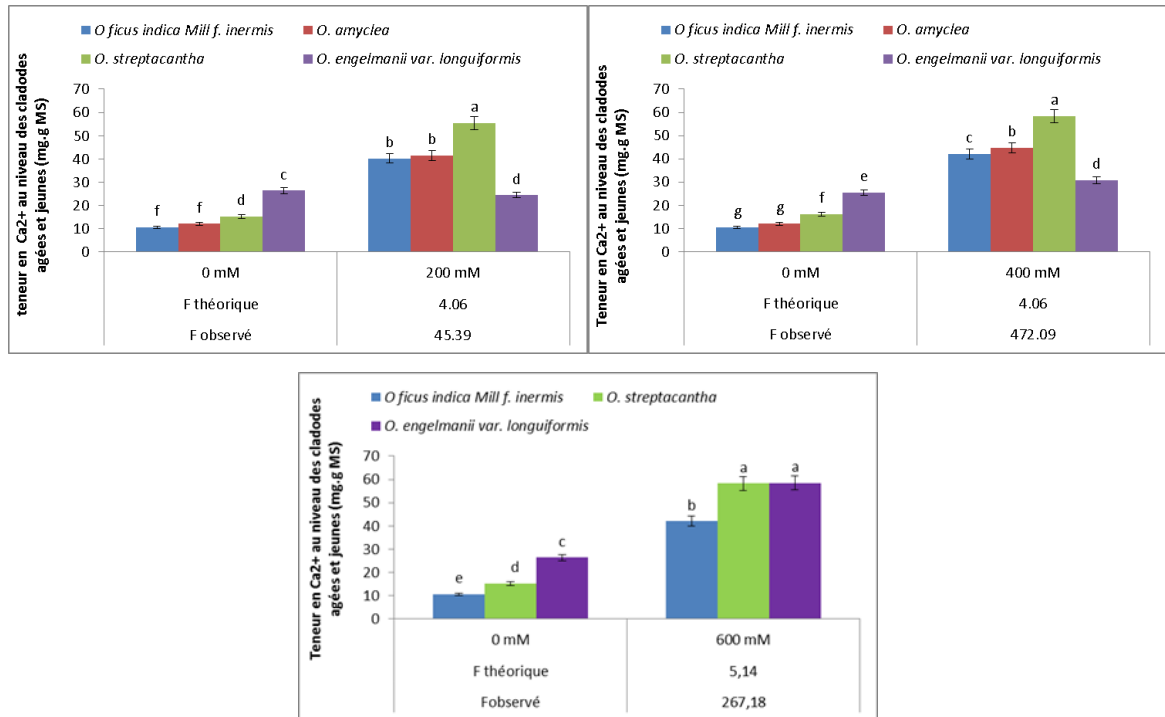
Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4. 1, 4.2, 4.3), indiquent que la teneur en  $Ca^{+2}$  au niveau des racines de toutes les espèces étudiées, ne présentent pas de différence significative ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

#### **4.1.2.12 Teneur en $Ca^{2+}$ au niveau des cladodes âgées et jeunes**

En l'absence de stress, l'*O. engelmannii* var. *longuifomis* présente la teneur en  $Ca^{2+}$  au niveau des cladodes la plus élevée. Par contre, la teneur la plus faible est observée chez l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* (Tableau 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.20).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3, figure 4.20), montre un effet très hautement significatif du stress sur la teneur en  $Ca^{2+}$  au niveau des cladodes de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  des teneurs en  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des cladodes en fonction de la salinité après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl) montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress modéré 400 mM ( $F_{\text{Observée}} = 472.09$  ; figure 4.20).



**Figure 4.20:** Variation relative de la teneur en  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des cladodes âgées et jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

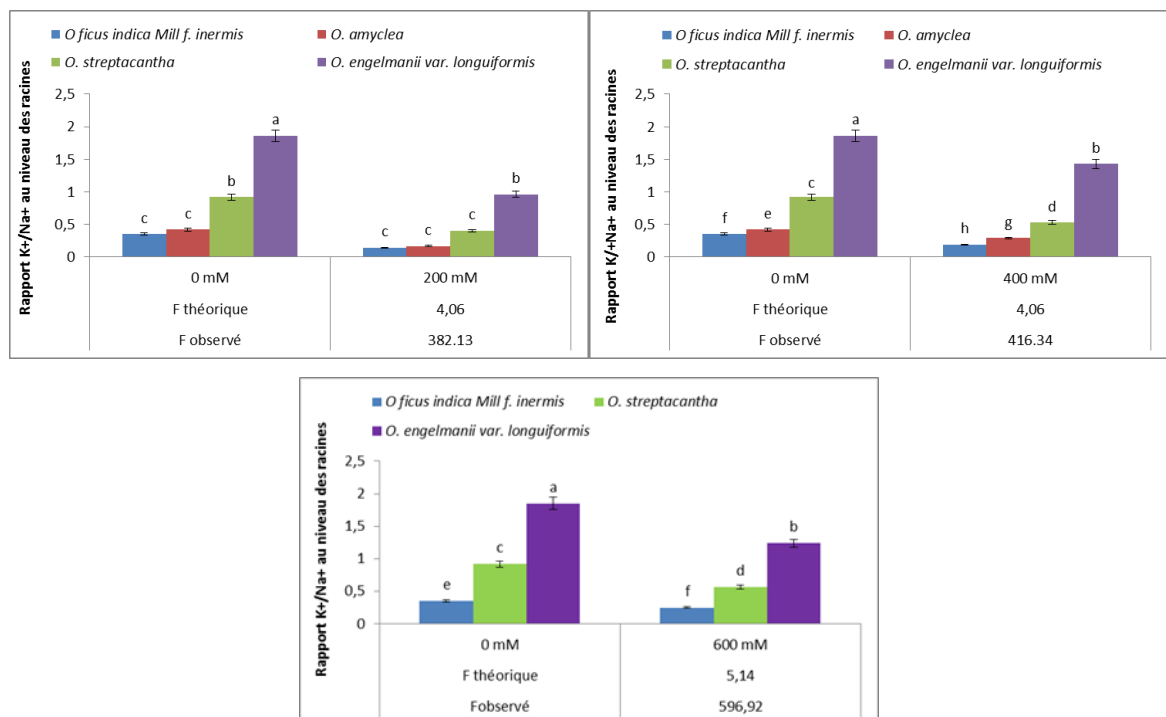
#### 4.1.2.13 Rapport de sélectivité $\text{K}^+/\text{Na}^+$ au niveau des racines

Dans les conditions normales (témoin), le rapport  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  au niveau des racines le plus important est enregistré chez l'*O. engelmannii* suivi par l'*O. streptacantha*. Par contre, les plus faibles rapports sont observés chez l'*O. ficus indica* et l'*O. amyctea* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.21).

Au niveau de stress salins faible (Tableau 4.1; figure 4.21), l'analyse de la variance montre un effet significatif du stress sur ce paramètre de l'*O. engelmannii* et l'*O. streptacantha* ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableau 4, appendice B). Cependant, ce niveau de

stress n'a pas affecté la teneur en ce paramètre de l'*O. ficus indica* et l'*O. amycleae* ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ).

Au niveau de stress salins modéré et sévère (400 mM, 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.2, 4.3 ; figure 4.21), montre un effet très hautement significatif du stress sur le rapport  $K^+/Na^+$  au niveau des racines chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$  ; Tableaux 5, 6, appendice B).



**Figure 4.21:** Variation relative du rapport de sélectivité  $K^+/Na^+$  au niveau des racines après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

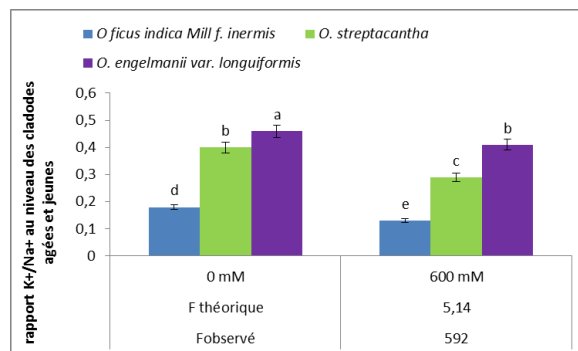
La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  du rapport de sélectivité  $K^+/Na^+$  au niveau des racines après 60 jours de stress salins (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl) montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress sévère 600 mM ( $F_{\text{Observée}} = 596.92$  ; figure 4.21).

#### 4.1.2.14 Rapport de sélectivité $K^+/Na^+$ au niveau des cladodes âgées et jeunes

En l'absence de stress, le rapport de sélectivité  $K^+/Na^+$  au niveau des cladodes, le plus important est enregistré chez l'*O. engelmannii* et l'*O. streptacantha*. Par contre, les plus faibles rapports sont observés chez l'*O. ficus indica* et l'*O. amycleae* (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.22).

Au niveau de stress salin faible et modéré (200 mM et 400 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4.1, 4.2), indique que le rapport  $K^+/Na^+$  au niveau des cladodes de toutes les espèces étudiées, ne présente pas de différence significative ( $F_{\text{Observée}} < F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, appendice B).

Au niveau de stress salin sévère (600 mM), l'analyse de la variance (Tableau 4.3; figure 4.22), montre un effet très hautement significatif du stress sur le rapport  $K^+/Na^+$  au niveau des cladodes de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableau 6, appendice B).



**Figure 4.22:** Variation relative du rapport de sélectivité  $K^+/Na^+$  au niveau des cladodes âgées et jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

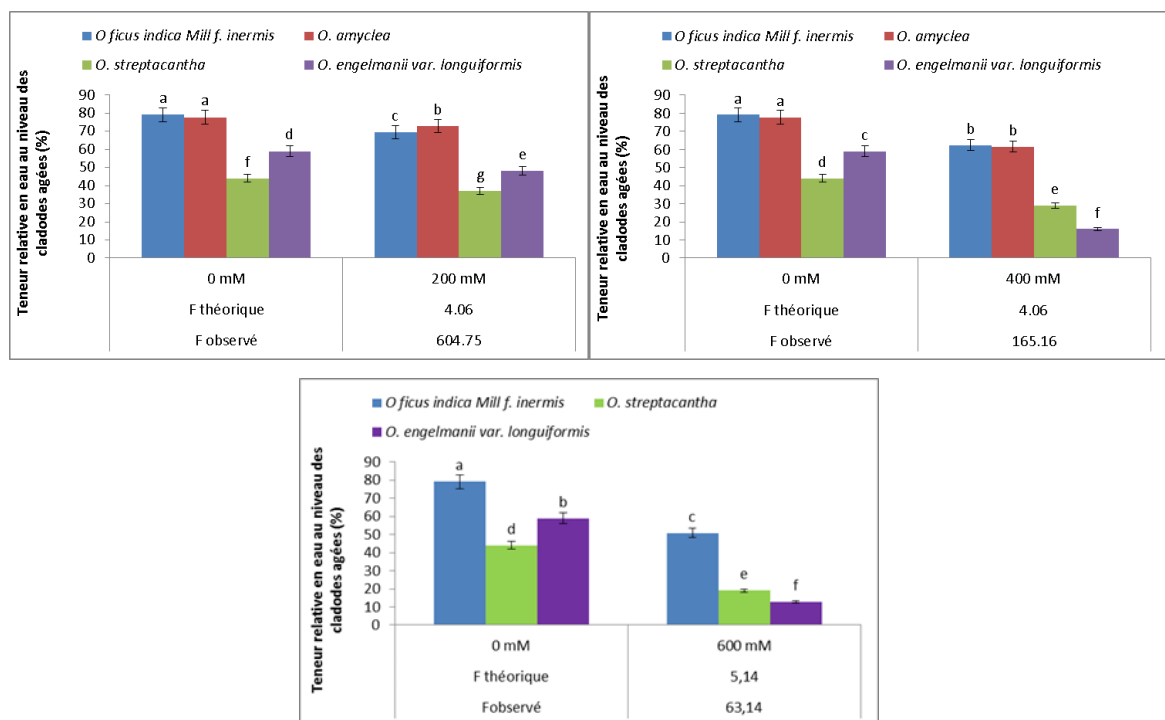
La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress sévère 600 mM ( $F_{\text{Observée}} = 592$ ; figure 4.22).

#### 4.1.2.15 Teneur relative en eau au niveau des cladodes âgés

Dans les conditions normales (témoin), la teneur relative en eau au niveau des cladodes âgés la plus élevée est enregistrée chez l'*O. ficus indica* et l'*O. amyclea*. Par contre, la plus faible teneur est observée chez l'*O. streptacantha* (Tableau 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.23).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM et 600 Mm NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3, figure 4.23), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur relative en eau au niveau des cladodes âgées de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  de la teneur en eau (%) au niveau des cladodes âgées après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl) montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress faible 200 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 604.75$ ; figure, 4.23).



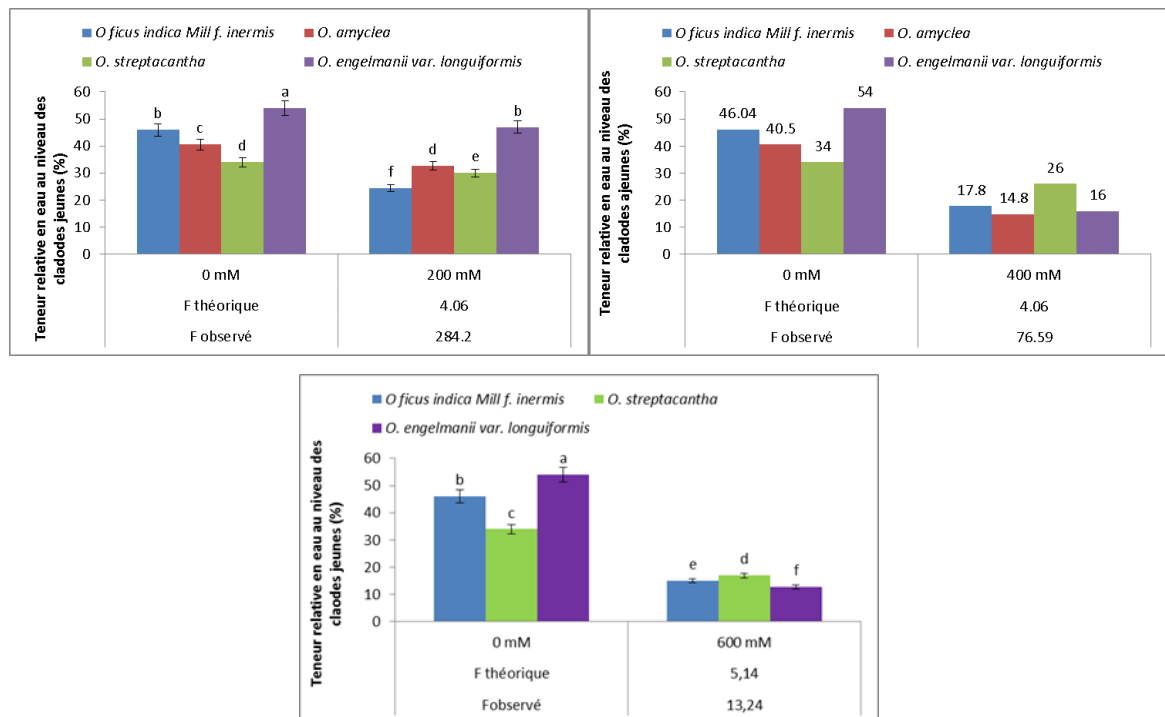
**Figure 4.23:** Variation relative de la teneur relative en eau (%) au niveau des cladodes âgées après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl).

#### 4.1.2.16 Teneur relative en eau au niveau des cladodes jeunes

En l'absence de stress, la teneur en eau au niveau des cladodes jeunes la plus élevée est enregistrée chez l'*O. engelmannii*. Par contre, la plus faible teneur est observée chez l'*O. streptacantha* (Tableau 4.1, 4.2, 4.3; figure 4.24).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM et 600 mM), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3, figure 4.24), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur relative en eau au niveau des cladodes jeunes de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  des teneurs relative en eau (%) au niveau des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl) montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress faible 200 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 284.2$  ; figure 4.24).



**Figure 4.24:** Variation relative de la teneur relative en eau (%) au niveau des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)



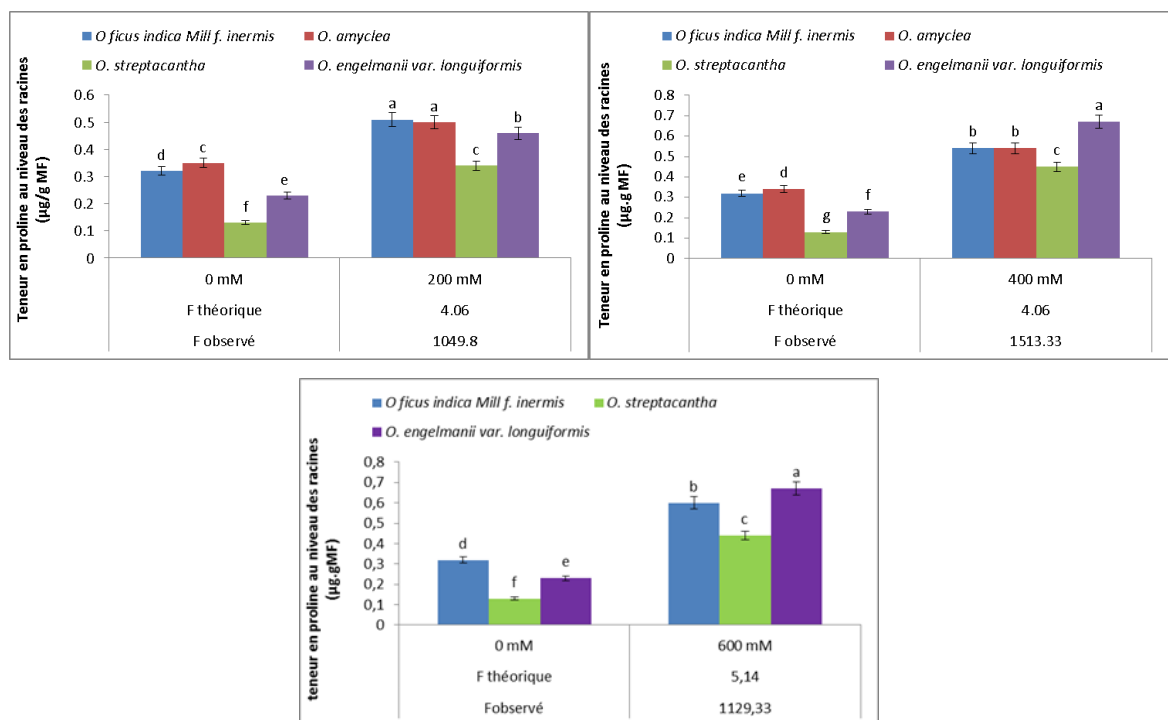
### 4.1.3 Les paramètres biochimiques « teneur en proline et en sucre soluble dans les différents organes »

#### 4.1.3.1 Teneur en proline au niveau des racines

Dans les conditions normales (témoin), l'*O. amyctea* présente la teneur en proline dans les cladodes âgés la plus élevée suivie par l'*O. ficus indica* et l'*O. engelmannii*. Par contre, la teneur la plus faible est enregistrée chez l'*O. streptacantha* (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; figure 4.25).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3, figure 4.25), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur en proline au niveau des racines de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress salin modéré 400 mM ( $F_{\text{Observée}} = 1513.33$ ; figure 4.25).



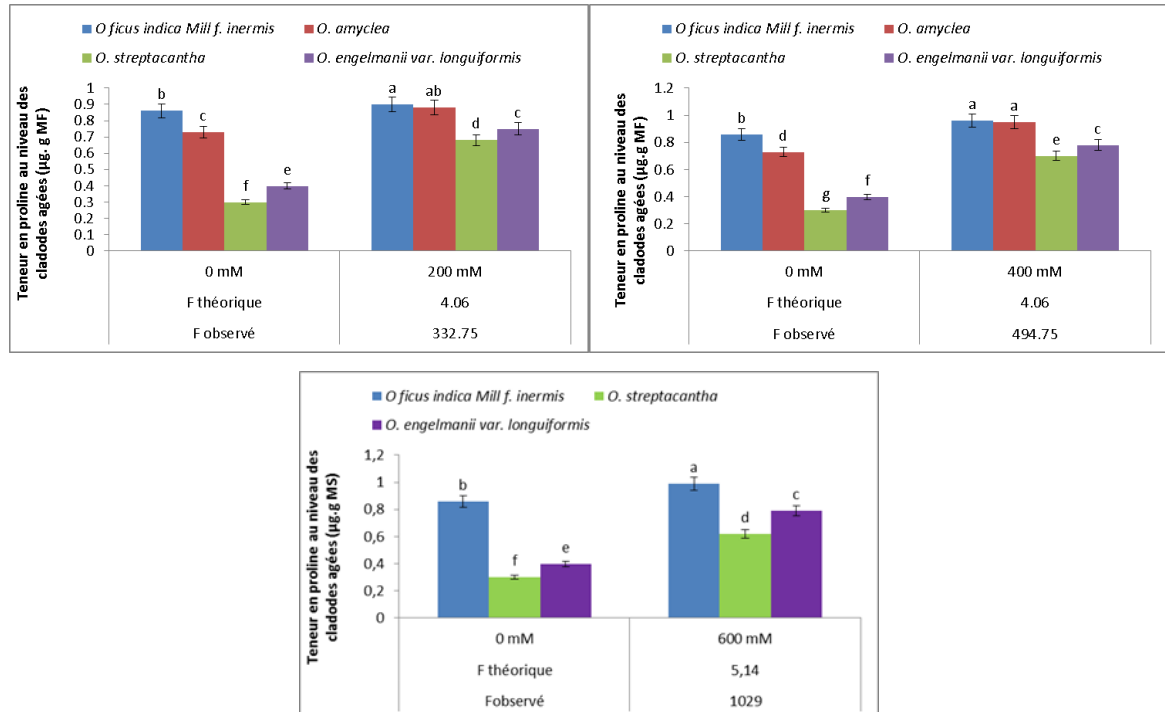
**Figure 4.25:** Variation relative de la teneur en proline au niveau des racines après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

#### 4.1.3.2 Teneur en proline au niveau des cladodes âgés

En l'absence de stress, l'*O. ficus indica* présente la teneur en proline au niveau des cladodes âgés la plus élevée suivie par l'*O. amycleae* par contre la teneur la plus faible est enregistrée chez l'*O. streptacantha* (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; Figure 4.26).

L'analyse de la variance (tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.26), montre que la présence de 200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl dans l'eau d'irrigation induit une augmentation très hautement significative des teneurs en proline au niveau des cladodes âgés chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress salin sévère 600 Mm NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 1029$  ; figure 4.26).



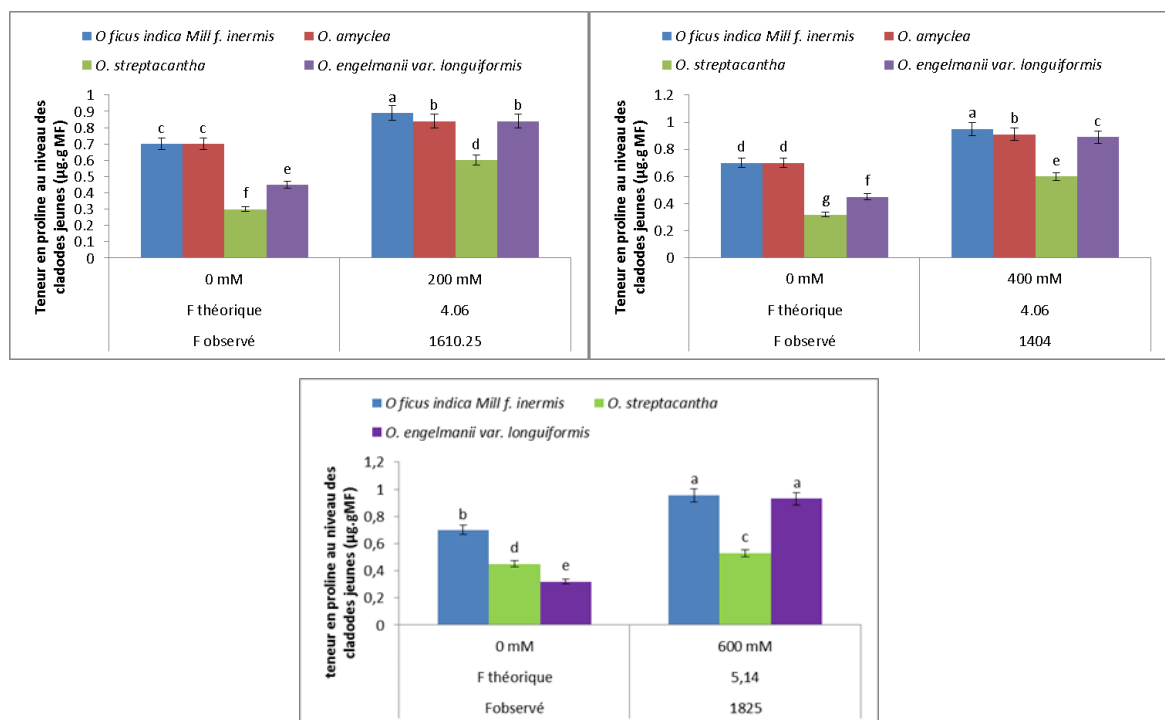
**Figure 4.26:** Variation relative de la teneur en proline au niveau des cladodes âgés après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

### 4.1.3.3 Teneur en proline au niveau des cladodes jeunes

En l'absence de contrainte saline, les teneurs de proline les plus élevées sont enregistrées chez l'*O. ficus indica* et *O. amyclea*. La teneur la plus faible est observée enregistrée chez l'*O. streptacantha* (tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.27).

Au niveau de tous les traitements salins faible, modérée et sévère (200 mM, 400 mM et 600 Mm NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.27), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur les teneurs en proline au niveau des cladodes jeunes chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  de la teneur en proline au niveau des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl) montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress sévère 600 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 1825$  ; figure 4.27).



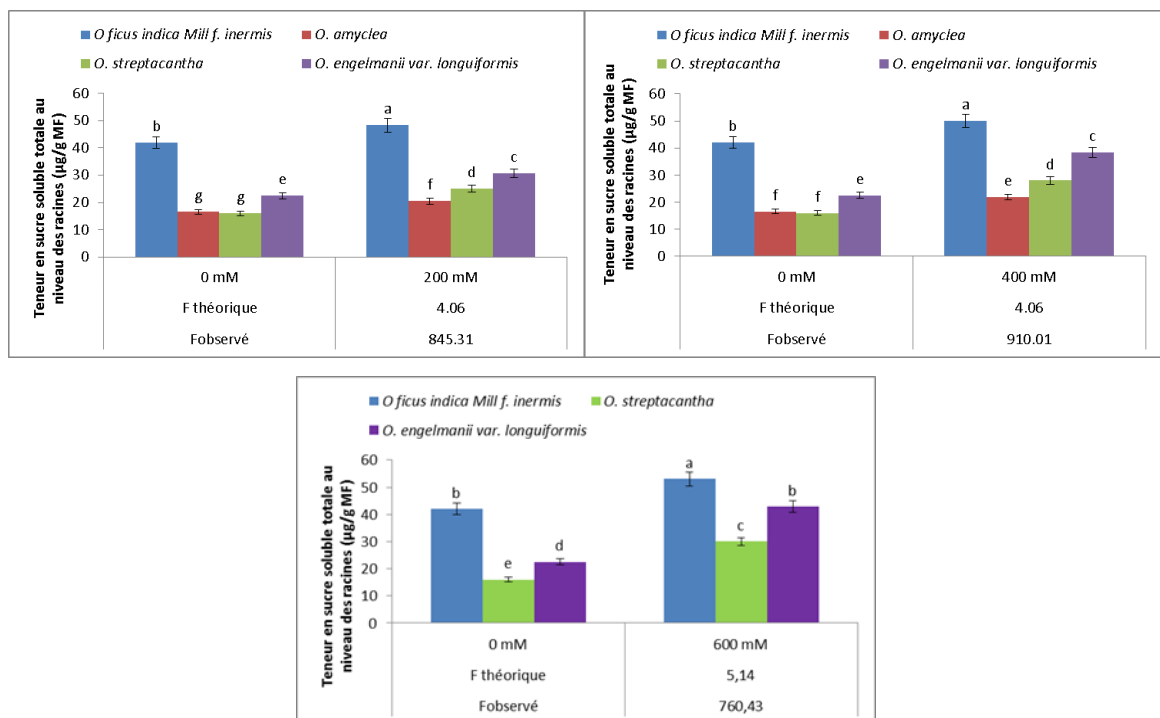
**Figure 4.27:** Variation relative de la teneur en proline au niveau des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

#### 4.1.3.4 Teneur en sucres solubles totale au niveau des racines

Dans les conditions normales (témoin), l'*O. ficus indica* présente la teneur en sucres solubles totale au niveau des racines la plus élevée. Par contre, les teneurs les plus faibles sont enregistrées chez l'*O. streptacantha* et l'*O. amycleae* (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; Figure 4.28).

Au niveau du stress salins faible, modéré et sévère (200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableaux 4.2, 4.3 ; figure 4.28), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur l'accumulation des teneurs en sucres solubles chez toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress modéré 400 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 910.01$ ; figure 4.28).



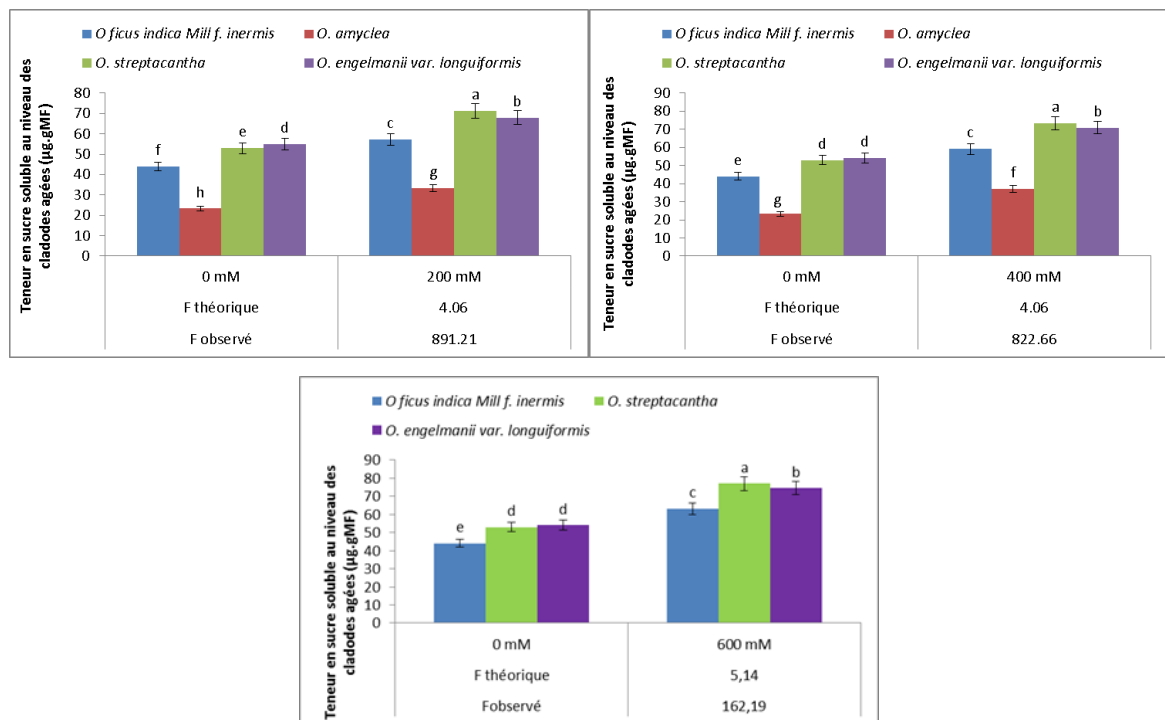
**Figure 4.28:** Variation relative de la teneur en sucres solubles totale au niveau des racines après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

#### 4.1.3.5 Teneur en sucres solubles totale au niveau des cladodes âgés

Dans les conditions normales (témoin), l'*O. engelmannii* et l'*O. streptacantha* présente les teneurs en sucres solubles totale au niveau des cladodes âgés les plus élevées. Par contre, la teneur la plus faible est enregistrée chez l'*O. amyctea* (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; Figure 4.29).

Au premier et au deuxième niveau de stress (200 mM, 400 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4.1 ; figure 4.29), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur l'accumulation des teneurs en sucres solubles dans les cladodes âgés ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, appendice B) chez toutes les espèces étudiées.

Au niveau de stress salin sévère (600 mM NaCl), l'analyse de la variance (Tableau 4.2 ; figure 4.29), montre un effet hautement significatif du stress salin sur l'accumulation des teneurs en sucres solubles au niveau des cladodes âgés de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableau 6, appendice B).



**Figure 4.29:** Variation relative de la teneur en sucres solubles totale au niveau des cladodes âgés après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

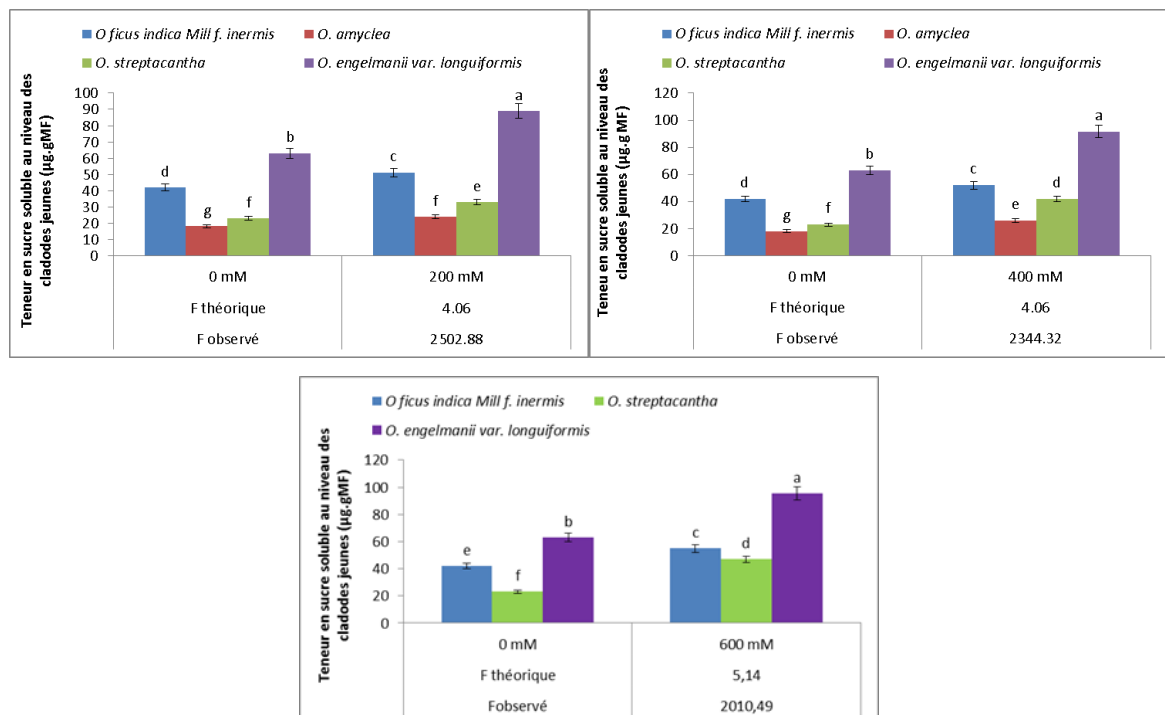
La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress faible 200 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 891.21$  ; figure 4.29).

#### 4.1.3.6 Teneur en sucres solubles totale au niveau des cladodes jeunes

En l'absence de stress, l'*O. engelmannii* présente la teneur en sucres solubles totale au niveau des racines la plus élevée. Par contre, la teneur la plus faible est enregistrée chez l'*O. amyctea* (Tableaux 4.1 ; 4.2 ; 4.3 ; Figure 4.30).

Au niveau de tous les traitements salins (200 mM, 400 mM et 600 mM), l'analyse de la variance (Tableaux 4.1, 4.2, 4.3 ; figure 4.30), montre un effet très hautement significatif du stress salin sur la teneur en sucres solubles totale au niveau des cladodes jeunes de toutes les espèces étudiées ( $F_{\text{Observée}} > F_{\text{Théorique}}$ ; Tableaux 4, 5, 6, appendice B).

La comparaison de  $F_{\text{Observée}}$  montre que ce paramètre est plus discriminant sous le niveau de stress faible 200 mM NaCl ( $F_{\text{Observée}} = 2502.88$  ; figure 4.30).



**Figure 4.30:** Variation relative de la teneur en sucres solubles totale au niveau des cladodes jeunes après 60 jours de stress salin (200 mM, 400 mM, 600 mM NaCl)

## **4.1.4 Discussion**

### **4.1.4.1 Les paramètres morphologiques**

Le stress salin exerce chez les espèces d'*Opuntia* étudiées un effet dépressif sur la plupart des paramètres morphologiques étudiés. Le degré de sensibilité ou de tolérance dépend de l'espèce et de l'intensité du stress. De ces résultats, il ressort que pour les dix paramètres morphologiques étudiés, le poids frais des cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant quel que soit le niveau du stress salin appliqué (200 mM, 400 mM et 600 mM). L'apparition d'interaction très hautement significative entre traitement salin et l'espèce pour le poids frais des cladodes jeunes, montre bien l'intérêt de ce caractère dans la sélection des espèces tolérantes à la salinité.

Des résultats similaires montrant un effet du stress salin sur les caractères morphologiques ont été mis en évidence pour quelques espèces du genre *Opuntia* [147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154]. Toutefois les racines sont moins affectées que les cladodes âgées et jeunes. Cette différence de sensibilité entre les organes d'absorption et les organes photosynthétiques, en conditions de salinité, pourrait résulter d'une synthèse accrue d'acides aminés [155] et d'agents osmotiques [156], mais aussi provenir d'une modification par le sel de l'allocation des assimilats à partir des feuilles sources. ZHU (2001), suggère que la réduction de croissance des parties aériennes est une capacité adaptative nécessaire à la survie des plantes exposées à un stress abiotique. En effet, le retard de développement permet à la plante d'accumuler de l'énergie et des ressources pour faire face au stress avant que le déséquilibre entre l'extérieur et l'intérieur de l'organisme n'augmente jusqu'à un seuil où les dommages sont irréversibles [63].

### **4.1.4.2 Les paramètres physiologiques**

#### **4.1.4.2.1 Les teneurs en chlorophylle totale, « a » et « b » dans les différents organes**

Sous l'effet du stress salin, nous notons une réduction de la teneur en chlorophylles « a », « b » et totale chez toutes les espèces étudiées. La diminution des teneurs en

chlorophylle sous l'effet du sel a été citée dans la littérature par plusieurs auteurs chez différentes espèces végétales, notamment chez *Paspalum vaginatum* (L.) [156], sur le maïs [157], *Atriplex halimus* (L.) [158], *Phaseolus vulgaris* L.) [159]. La comparaison des 4 espèces d'*Opuntia* étudiées indique que l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, l'*O. amyacleae* et l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* sont distingués par des valeurs élevées des chlorophylles « b » dans les cladodes jeunes que des chlorophylle « a ». Ces résultats montrent aussi que les cladodes âgées présentent des teneurs relativement élevées en chlorophylle totale, contrairement aux cladodes jeunes, aussi bien dans les conditions témoins que dans les conditions de salinité. Alors que l'*O. streptacantha* est distinguée par des valeurs élevées des chlorophylles « a » dans les cladodes jeunes que des chlorophylles « b » et les cladodes âgées présentent des teneurs relativement faibles en chlorophylle totale, contrairement aux cladodes jeunes malgré l'absence de grandes variations dans les teneurs obtenues. De ces résultats, il ressort que sous stress salin faible, la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant, sous stress salin modéré, les teneurs en chlorophylle totale dans les cladodes âgées et jeunes sont les paramètres les plus discriminants. Sous stress salin sévère (600 mM), la teneur en chlorophylle « a » dans les cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant suivi par la teneur en chlorophylle « a » dans les cladodes âgées.

L'apparition d'interaction très hautement significative entre traitement salin et l'espèce pour la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes, la teneur en chlorophylle « a » dans les cladodes jeunes et âgées montrent bien l'intérêt de ces critères dans la sélection des espèces tolérantes à la salinité.

#### **4.1.4.2.2 Les teneurs en éléments minéraux ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , rapport $\text{K}^+/\text{Na}^+$ ) dans les différents organes**

Les résultats montrent que les teneurs en  $\text{Na}^+$  se concentrent plus dans les cladodes âgées et jeunes que dans les racines aussi bien chez les plantes témoins que celles traitées aux différents niveaux de NaCl. Les teneurs en  $\text{Na}^+$  enregistrées dans les cladodes âgées et jeunes sont plus élevées lorsque les plantes sont traitées à 600 mM par rapport à celles des témoins.



Un comportement de type « *include* » est donc affiché et adopté par les quatre espèces étudiées. Cette stratégie se traduit par de très fortes teneurs en sodium enregistrées au niveau de la partie aérienne et particulièrement les cladodes âgés et jeunes, est une stratégie de tolérance qui implique nécessairement l'intervention d'un mécanisme de compartimentation vacuolaire du sodium [160]. Ce dernier est assuré par un antiport vacuolaire de type NHX [161, 162] et dont un ADNc a été récemment identifié et caractérisé chez la vigne cultivée (*Vitis vinifera*) [163,164].

Le potassium ( $K^+$ ) se compartimente préférentiellement dans les cladodes âgés et jeunes à des teneurs significativement élevées lorsque la salinité du milieu augmente contrairement aux racines, considérées comme des organes de transition.

La plante adsorbe et véhicule le maximum de potassium vers les feuilles, ce qui satisfait les besoins osmotiques. Il semble que c'est surtout au niveau des feuilles que la plante rétablit l'équilibre de son potentiel osmotique via l'ion potassium et atténue ainsi le stress osmotique engendré par NaCl. La capacité de la plante à pomper le potassium de la solution nutritive, puis de le véhiculer vers les feuilles, représente une stratégie d'adaptation au stress salin via la régulation osmotique par l'ion potassium [160].

Les génotypes tolérants seraient capables d'accumuler de grandes quantités de potassium, particulièrement dans les parties aériennes [165]. L'efficacité d'absorption et d'utilisation du potassium, qui agit comme osmoticum, est donc capitale dans l'adaptation au stress salin [160].

Le  $Ca^{+2}$  s'accumule dans le sens racines cladodes âgés et jeunes des plantes avec une charge calcique très importante dans les cladodes âgés et jeunes sous stress salin sévère alors qu'il n'est présent qu'à l'état de traces dans les racines.

L'accumulation de calcium constatée au niveau des tissus foliaires serait probablement liée à son rôle dans les mécanismes de signalisation et d'adaptation au stress, mais aussi dans la protection des membranes et structures cellulaires [166].

Les résultats du rapport de sélectivité  $K^+/Na^+$ , ont montré qu'en l'absence de sel, ce rapport est plus élevée dans les deux organes. En revanche, ce rapport est diminué dans les deux organes de toutes les espèces d'*Opuntia* étudiées suite l'augmentation de la salinité, indiquant ainsi que la teneur en  $Na^+$  surpasse toujours celle du  $K^+$ , suite à une forte compétition entre ces deux cations [167].

Parmi les paramètres de la nutrition minérale étudié, le plus discriminant est la teneur en potassium dans les cladodes âgées et jeunes sous stress salin faible, modérée et sévère. Le dosage de cet élément est considéré comme un critère de sélection de la tolérance au stress.

Le comportement de tolérance à la salinité est donc, d'après notre étude concernant les variations des teneurs en éléments minéraux ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ , rapport  $K^+/Na^+$ ) dans les différents organes, intimement lié à son aptitude à accumuler le sodium au niveau de la partie aérienne, et plus spécifiquement au niveau des cladodes âgées et jeunes (comportement dit *incluser* vis-à-vis du sodium), et à sa capacité de transférer et d'accumuler le potassium au niveau des cladodes âgées et jeunes pour réaliser l'ajustement osmotique, mais aussi, en premier lieu, à faire intervenir les mécanismes de signalisation de stress et de protection cellulaire via l'augmentation des teneurs en calcium au niveau des cladodes âgées et jeunes.

#### **4.1.4.2.3 Les teneurs relatives en eau dans les différents organes**

Les résultats montrent que, chez toutes les espèces étudiées, les cladodes âgées présentent des teneurs relativement élevées en eau contrairement aux cladodes jeunes. Dans les deux types de cladodes, la teneur relative en eau tend à diminuer avec l'augmentation de niveau de NaCl. Ce résultat qui paraît évident est confirmé par de nombreuses études [168, 169]. De même les précédents travaux démontrent que la salinité affecte ces paramètres qui diminuent pour éviter les pertes d'eau. En effet, l'absorption d'eau est maintenue à un niveau suffisant pour éviter la déshydratation des tissus de la plante, pour établir le phénomène de succulence et pouvoir diluer le plus d'osmolytes possibles [168].

De ces résultats, il ressorte que pour les teneurs relatives en eau dans les différents organes, la teneur en eau au niveau des cladodes âgées est le paramètre le plus discriminant quel que soit le niveau du stress salin appliqué (200 mM, 400 mM et 600 mM). En effet ce paramètre est considéré comme un critère de sélection de la tolérance au stress.

#### **4.1.4.3 Les paramètres biochimiques**

Les résultats obtenus montrent que, la proline augmente de teneur dans tous les organes (cladodes âgées, cladodes jeunes et racines) de la plante en fonction de l'augmentation de la salinité. Ces résultats montrent aussi que les cladodes âgées et jeunes sont plus riches en proline que les racines, aussi bien dans les conditions témoins que dans les conditions de salinité.

Chez toutes les espèces, les résultats montrent aussi l'évolution de la teneur en sucres solubles dans les différents organes avec l'augmentation de la salinité du milieu. L'accumulation de ces composés carbonyliques est beaucoup plus importante dans les cladodes âgées et jeunes que dans les racines.

Des résultats obtenus, nous pouvons constater que parmi les composés azotés et les composés carbonyliques étudiés, la teneur en sucres solubles totale au niveau des cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant sous stress salin faible, modéré et sévère. En effet ce paramètre est considéré comme un critère de sélection de la tolérance au stress.

Nos résultats rejoignent ceux obtenues par d'autres auteurs sur des espèces différentes. En effet, BEN KHALED et al., (2003), rapportent que l'exposition des plantules de trèfle d'Alexandrie à 2, 4, 6 et 8 g.l<sup>-1</sup> de NaCl, a induit une accumulation de sucres solubles dans les feuilles [170]. MOHSEN et al., (2013), on notent sous l'effet de 100 mM et 150 mM NaCl, une accumulation des sucres solubles totale chez *Vicia faba*, cette augmentation est observée aussi bien dans les feuilles que dans les racines [171].

Dans le modeste travail de thèse, les résultats de cette partie , représentent une partie clé pour la suite des travaux qui ont pour but d'identifier et sélectionner le paramètre le plus discriminant sous chaque niveau de NaCl, montré la variabilité de réponse des différentes espèces d'*Opuntia* étudiées sous chaque niveau de stress et l'étude de développement d'éventuelles variations épigénétiques en utilisant la technique RAPD en présence de différentes concentrations.

**Tableau 4.1 :** Caractères morpho-physiologique et biochimiques de quatre espèces d'*Opuntia* après 60 jours de stress salin (0 et 200 mM NaCl). Les valeurs de la même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %. ns effet non significatif.

Paramètres	<i>O. ficus indica</i> Mill. f. <i>inermis</i> (O.I)		<i>O. amycleae</i> (O.A)		<i>O. streptacantha</i> (O.S)		<i>O. engelmannii</i> (O.E)		(One-way ANOVA)					
									Toutes les espèces sous stress salin		O.I	O.A	O.S	O.E
	Témoin	200 mM	Témoin	200 mM	Témoin	200 mM	Témoin	200 mM	F <sub>O</sub>	F <sub>T</sub>	X salinité			
											F <sub>O</sub> > F <sub>T</sub>			
<b>N R</b>	55±1b	47±0.9d	60±1a	49±0.53d	51.2±1c	43.9±0.7e	48±0.8d	42.1±0.9f	29.54	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>L R</b>	34±1b	21±0.9f	52±0.9a	25±1d	27.7±2c	23±0.8e	12.2±1.6g	10.8±0.7g	122.48	4.06	oui	oui	oui	non
<b>PFR</b>	14.7±2ns	11.3±1ns	15±1.5ns	12.4±1ns	19.2±2ns	16.9±1ns	6.35±1ns	3.6±0.5ns	3.09	4.06	non	non	non	non
<b>L Ca</b>	20±1ns	16±2ns	24.5±1.2ns	20±1ns	19.5±2ns	15±1ns	19.5±2ns	18±1ns	3.97	4.06	non	non	non	non
<b>LA Ca</b>	11±2ns	9.5±1ns	9.7±1.2ns	8.6±2ns	8.5±1ns	7±0.5ns	8.7±1ns	7.7±2ns	3.04	4.06	non	non	non	non
<b>PF Ca</b>	99±0.9b	88±0.8e	96±1c	83±1f	102.8±1a	96.66±1c	99.8±0.9b	93±0.9d	127.60	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>L Cj</b>	18±1ns	13.33±2ns	14.5±2ns	12±2ns	10.5±1ns	9.5±2ns	10.1±1ns	10±1ns	3.31	4.06	non	non	non	non
<b>LA Cj</b>	6.6±1ns	5.63±1ns	6.5±2ns	5.5±1ns	7±1.2ns	5.5±1ns	6.6±1ns	5.7±1ns	1.66	4.06	non	non	non	non
<b>PF Cj</b>	53±1a	43±0.9b	51.7±1.2a	42±1bc	40.54±0.9c	32.9±1d	31.9±0.9d	28±1e	141.50	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>PFR/PFC</b>	0.09±0.001ns	0.08±0.001ns	0.1±0.001ns	0.09±0.001ns	0.13±0.01ns	0.13±0.01ns	0.04±0.001ns	0.030±0.001ns	1.97	4.06	non	non	non	non
<b>P R</b>	0.32±0.02d	0.51±0.01a	0.35±0.02c	0.5±0.01a	0.13±0.01f	0.34±0.01c	0.23±0.01e	0.46±0.02b	1049.8	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>P Ca</b>	0.86±0.3b	0.9±0.2a	0.73±0.3c	0.88±0.2ab	0.3±0.01f	0.68±0.2d	0.4±0.1e	0.75±0.2c	332.75	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>P Cj</b>	0.7±0.02c	0.89±0.02a	0.7±0.01c	0.84±0.03b	0.3±0.01f	0.6±0.02d	0.45±0.01e	0.84±0.02b	1610.2	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>S R</b>	42±1b	48.3±0.9a	16.6±1.2g	20.5±0.9f	16±1g	25±1d	22.5±0.8e	30.7±1.5c	910.01	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>S Ca</b>	44±1f	57.3±2c	23.3±1h	33.2±1g	53±2e	71.3±2a	55±3d	68±1b	891.21	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>S Cj</b>	42±2d	51.3±2c	18.4±2g	24.1±2f	23±2f	33.1±1e	63±2b	88.9±2a	2502.8	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ch t Ca</b>	0.73±0.01e	0.58±0.02f	1.42±0.02a	0.99±0.02d	0.6±0.01f	0.53±0.01g	1.29±0.01b	1.22±0.01c	3302.0	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ch t Cj</b>	0.7±0.02e	0.42±0.01g	1.23±0.01a	0.71±0.01e	1.16±0.02b	0.58±0.01f	1.02±0.02c	0.97±0.01d	3926.6	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ch a Ca</b>	0.5±0.01ns	0.42±0.01ns	0.52±0.02ns	0.47±0.01ns	0.4±0.01ns	0.33±0.01ns	0.42±0.02ns	0.36±0.01ns	4.03	4.06	non	non	non	non
<b>Ch a Cj</b>	0.28±0.01e	0.23±0.01f	0.37±0.02c	0.39±0.02b	0.8±0.01a	0.35±0.01d	0.23±0.02f	0.2±0.01g	1047.5	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ch b Ca</b>	0.23±0.01e	0.16±0.0g	0.91±0.03a	0.52±0.01d	0.2±0.01f	0.19±0.01f	0.87±0.02b	0.85±0.03c	3150.0	4.06	oui	oui	non	oui

<b>Ch b Cj</b>	0.41±0.02d	0.19±0.01h	0.85±0.03a	0.32±0.02f	0.36±0.01e	0.23±0.02g	0.79±0.02b	0.77±0.02c	3312.1	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>TRE C</b>	79.1±3a	69.5±3c	77.7±2a	72.7±2b	44±2f	37±1g	59±2d	48±3e	604.75	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>TRE C</b>	46±2b	24.4±0.8f	40.5±1c	32.7±3d	34±1d	30±0.9e	54±3a	47±3b	284.20	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Na<sup>+</sup> C</b>	9.9±2bc	24.9±2a	10±1bc	26.1±3a	5.1±1d	26.8±2a	7.5±1cd	10.7±1b	752.19	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Na<sup>+</sup> R</b>	67.2±1e	130.4±2d	68±1e	135±1c	40.4±1g	157.6±2b	63.9±1f	162.6±4a	175.88	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>K<sup>+</sup> C</b>	12.6±1g	20±2e	13±1g	25±2c	16.9±1f	23±1d	29.9±1b	71.3±2a	1101.1	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>K<sup>+</sup> R</b>	3.53±1c	3.53±1c	4.2±0.5c	4.5±1c	4.73±0.9c	10.73±1b	13.913±1a	13.98±2a	75.30	4.06	non	non	oui	non
<b>Ca<sup>2+</sup> C</b>	10.6±2f	40.2±1b	12.1±1f	41.5±2b	15.3±2e	55.467±2a	26.5±1c	24.5±2d	45.39	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ca<sup>2+</sup> R</b>	2.4±1ns	2.5 ±0.7ns	3.15±1.2ns	3.18±1ns	3.6±1.3ns	3.5±2ns	2.8±1.4ns	2.6±2ns	4.02	4.06	non	non	non	non
<b>K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> C</b>	0.18±0.01ns	0.15±0.01ns	0.19±0.01ns	0.18±0.01ns	0.41±0.01ns	0.39±0.01ns	0.46±0.02ns	0.43±0.04ns	3.4	4.06	non	non	non	non
<b>K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R</b>	0.35±0.01c	0.14±0.01c	0.42±0.01c	0.17±0.01c	0.92±0.3b	0.4±0.01c	1.86±0.2a	0.967±0.01b	382.13	4.06	non	non	oui	oui

**Tableau 4.2 :** Caractères morpho-physiologique et biochimiques de quatre espèces d'*Opuntia* après 60 jours de stress salin (0 et 400 mM NaCl). Les valeurs de la même ligne suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %. ns effet non significatif

Paramètres	<i>O. ficus indica</i> Mill.f. <i>inermis</i> (O.I)		<i>O. amycleae</i> (O.A)		<i>O. streptacantha</i> (O.S)		<i>O. engelmannii</i> (O.E)		(One-way ANOVA)					
	Témoin	400 mM	Témoin	400 mM	Témoin	400 mM	Témoin	400 mM	Toutes les espèces sous stress salin		O.I	O.A	O.S	O.E
									F <sub>0</sub>	F <sub>T</sub>	X salinité			
											F <sub>0</sub> > F <sub>T</sub>			
<b>NR</b>	55±0.9b	45±2e	60±1a	43±1f	51.2±3c	38±2h	48±2.5d	40.3±3g	28.16	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>LR</b>	34±1.5b	19±1e	52±3a	22±2d	27.7±2c	22±1d	12.25±1f	10±1g	96.75	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>PFR</b>	14.7±1.2ns	7.7±1ns	15±1ns	9.2±0.5ns	19.2±1ns	13±2ns	6.3±1.5ns	1.55±1ns	3.15	4.06	non	non	non	non
<b>L Ca</b>	20±2b	15±1c	24.5±2a	15.95±1c	19.5±1.5b	17±2c	19.5±0.5b	19±1b	8.86	4.06	oui	oui	oui	non
<b>LA Ca</b>	11±1ns	9±2ns	9.7±1ns	8±0.5ns	8.5±1ns	6.5±1ns	8.7±1ns	7.3±1.5ns	3.38	4.06	non	non	non	non
<b>PF Ca</b>	99±3a	87±1d	96±2b	82±1e	100.8±3a	96±1.5b	99.8±2a	92.6±3c	114.32	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>L Cj</b>	18±2a	13.5±1b	14.5±1b	11±0.5c	10.5±0.5c	9±1c	9.5±1c	8.75±1c	14.54	4.06	oui	oui	non	non
<b>LA Cj</b>	6.6±1ns	5.8±1ns	6.5±1ns	5.3±1ns	7±1.5ns	7.1±1ns	6.6±1.5ns	4.7±1ns	1.66	4.06	non	non	non	non
<b>PF Cj</b>	53±3a	41±2b	51.7±3a	40±2b	40.5±2b	30±1d	31.9±1c	28.9±1d	123.20	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>PFR/PFC</b>	0.09±0.01ns	0.06±0.02ns	0.073±0.02ns	0.08±0.02ns	0.13±0.01ns	0.09±0.01ns	0.04±0.01ns	0.013±0.01ns	3.9	4.06	non	non	non	non
<b>PR</b>	0.32±0.1e	0.54±0.1b	0.34±0.1d	0.54±0.01b	0.13±0.01g	0.45±0.1c	0.23±0.1f	0.67±0.1a	1513.33	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>PCa</b>	0.86±0.2b	0.96±0.1a	0.73±0.2d	0.95±0.1a	0.3±0.1g	0.7±0.2e	0.4±0.1f	0.78±0.2c	494.75	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>PCj</b>	0.7±0.1d	0.95±0.2a	0.7±0.1d	0.91±0.2b	0.32±0.1g	0.6±0.1e	0.45±0.1f	0.89±0.3c	1404.00	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>SR</b>	42±0.9b	50±1a	16.6±1f	21.9±0.9e	16±0.9f	28±1d	22.5±1.3e	38.3±1.5c	910.01	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>SCa</b>	44±1e	59.2±3c	23.3±1g	37±1f	53±1d	73.2±3a	54±2d	70.9±2b	822.66	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>SCj</b>	42±2d	52±1c	18.4±1g	26±1e	23±1f	42.2±2d	63±2b	91.7±3a	2344.32	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ch t Ca</b>	0.73±0.01d	0.4±0.0g	1.42±0.01a	0.74±0.01d	0.6±0.01e	0.49±0.01f	1.29±1b	1.06±0.1c	2621.00	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ch t Cj</b>	0.7±0.01d	0.33±0.01g	1.23±0.1a	0.55±0.01e	1.16±0.1b	0.5±0.01f	1.02±0.1c	0.69±0.01d	2622.75	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ch a Ca</b>	0.5±0.1b	0.35±0.1e	0.52±0.01a	0.26±0.01h	0.4±0.1d	0.31±0.01g	0.42±0.2c	0.33±0.1f	524.00	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ch a Cj</b>	0.28±0.01d	0.12±0.01g	0.37±0.1b	0.13±0.01g	0.8±0.2a	0.3±0.1c	0.23±0.1e	0.18±0.01f	836.00	4.06	oui	oui	oui	oui

<b>Ch b Ca</b>	0.23±0.1e	0.15±0.01h	0.91±0.1a	0.48±0.1d	0.2±0.01f	0.18±0.1g	0.87±0.1b	0.73±0.1c	2206.75	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ch b Cj</b>	0.41±0.1d	0.2±0.01f	0.85±0.2a	0.42±.1d	0.36±.01e	0.2±0.01f	0.79±0.1b	0.51±0.1c	2228.25	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>TRE C</b>	79.1±2a	62.4±2b	77.7±3a	61.5±1.7b	44±1d	29±2e	59±1.2c	16.1±1.5f	165.16	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>TRE C</b>	46.04±1.5b	17.8±1.3e	40.5±2c	14.8±1.3g	34±1.2d	26±2e	54±2a	16±2g	76.59	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Na<sup>+</sup> C</b>	9.9±2bc	13.9±2b	10±1bc	10.6±1bc	5.11±1c	18.6±1.5a	7.5±1.2bc	9.9±2bc	37.94	4.06	oui	non	oui	non
<b>Na<sup>+</sup> R</b>	67.2±1e	167.3±2c	68±1e	169±3b	40.4±2g	162.3±3d	63.9±2f	207±1a	305.09	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>K<sup>+</sup> C</b>	12.6±1g	19±2e	13±1g	23.6±2c	16.9±1f	21.5±1d	29.9±1b	68.3±2a	1125.40	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>K<sup>+</sup> R</b>	3.53±1c	2.7±1c	4.2±1.2c	4.1±1c	4.73±1c	9.9±2b	13.9±1.5a	14.2±2a	85.04	4.06	non	non	oui	non
<b>Ca<sup>2+</sup> C</b>	10.6±2g	42.02±1c	12.11±2g	44.7±1b	16.3±2.3f	58.4±2.6a	25.5±1.2e	30.7±2.5d	472.09	4.06	oui	oui	oui	oui
<b>Ca<sup>2+</sup> R</b>	2.4±0.5ns	2.6±1ns	3.15±1ns	3.2±1.2ns	3.6±2ns	3.9±2.3ns	2.8±1ns	3±1.5ns	3.11	4.06	non	non	non	non
<b>K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> C</b>	0.18±0.01ns	0.14±0.01ns	0.19±0.01ns	0.17±0.01ns	0.41±0.02ns	0.37±0.01ns	0.46±0.02ns	0.42±0.02ns	2.75	4.06	non	non	non	non
<b>K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R</b>	0.35±0.01f	0.19±0.01h	0.42±0.02e	0.29±0.01g	0.92±0.02c	0.53±0.02d	1.85±0.3a	1.0±0.1b	416.34	4.06	oui	oui	oui	oui



**Tableau 4.3 :** Caractères morpho-physiologique et biochimiques de quatre espèces d'*Opuntia* après 60 jours de stress salin (0 et 600 mM NaCl). Les valeurs de la même ligne suivées de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5 %. ns effet non significatif

Paramètres	<i>O. ficus indica</i> Mill. f. <i>inermis</i> (O.I)		<i>O. streptacantha</i> (O.S)		<i>O. engelmannii</i> (O.E)		(One-way ANOVA)				
							Toutes les espèces sous stress salin		O.I x salinité	O.S x salinité	O.E x salinité
	Témoin	600 mM	Témoin	600 mM	Témoin	600 mM	F <sub>O</sub>	F <sub>T</sub>	F <sub>O</sub> > F <sub>T</sub>		
<b>N R</b>	55±2a	37.6±1d	51.1±2b	33.8±2e	48±2.3c	37.2±1d	8.16	5.14	oui	oui	oui
<b>L R</b>	34±3a	17±2d	27.75±2.1b	19.5±2c	12.25±2.1e	9.2±2f	86.59	5.14	oui	oui	oui
<b>PFR</b>	14.7±2b	5.2±1d	19.2±1.6a	8.95±1.2c	6.35±1d	2.5±0.4e	31.47	5.14	oui	oui	oui
<b>L Ca</b>	20±2a	14±1b	19.5±1.2a	11.5±1.2c	19.5±1a	19.3±1a	47.59	5.14	oui	oui	non
<b>LA Ca</b>	11±2ns	8.5±2ns	8.5±1ns	7.8±0.5ns	8.7±1.2ns	6±1ns	2.49	5.14	non	non	non
<b>PF Ca</b>	99±2a	85.3±2c	100.8±1.3a	95.1±1b	99.8±2a	94.7±2b	92.28	5.14	oui	oui	oui
<b>L Cj</b>	18±1.5a	6.0±1c	10.5±1b	9.75±1b	9.5±1.2b	10.25±1.3b	9.66	5.14	oui	non	non
<b>LA Cj</b>	6.6±1ns	4±1ns	7±1ns	4.5±1.2ns	6.6±0.5ns	6±2ns	0.89	5.14	non	non	non
<b>PF Cj</b>	53±3a	22±1f	40.5±1.9b	35.25±2c	31.9±1d	28.5±2e	131.68	5.14	oui	oui	oui
<b>PFR/PFC</b>	0.095±0.002b	0.048±0.001d	0.13±0.001a	0.07±0.02c	0.048±0.003d	0.02±0.001e	28.11	5.14	oui	oui	oui
<b>P R</b>	0.32±0.1d	0.6±0.1b	0.13±	0.44±0.2c	0.23±0.1e	0.67±0.1a	1129.33	5.14	oui	oui	oui
<b>P Ca</b>	0.86±0.1b	0.99±0.1a	0.3±0.01f	0.62±0.01d	0.4±0.1e	0.79±0.1c	1029.00	5.14	oui	oui	oui
<b>P Cj</b>	0.7±0.1b	0.957±0.2a	0.45±0.1d	0.53±0.1c	0.32±0.1e	0.93±0.1a	1825.00	5.14	oui	oui	oui
<b>S R</b>	42.9±0.9b	53±1a	16±0.9e	30±0.8c	22.5±1d	42±1b	760.43	5.14	oui	oui	oui
<b>S Ca</b>	44±2e	63.2±2c	53±3d	77±2a	54±3d	74.5±2.5b	162.19	5.14	oui	oui	oui
<b>S Cj</b>	42±1e	55±2c	23±2f	47±1.2d	63±2b	95.3±2.3a	2010.49	5.14	oui	oui	oui
<b>Ch t Ca</b>	0.73±.1b	0.18±0.1f	0.6±0.1c	0.39±0.1e	1.29±0.1a	0.58±0.1d	1201.00	5.14	oui	oui	oui
<b>Ch t Cj</b>	0.7±0.2c	0.15±0.1f	1.16±0.1a	0.3±0.1d	1.02±0.1b	0.26±0.1e	1687.00	5.14	oui	oui	oui
<b>Ch a Ca</b>	0.5±0.01a	0.08±0.01f	0.4±0.01c	0.27±0.01e	0.42±0.02b	0.3±0.01d	2207.00	5.14	oui	oui	oui

<b>Ch a Cj</b>	0.28±0.1b	0.1±0.01e	0.8±0.2a	0.28±0.01b	0.23±0.1c	0.16±0.01d	3721.00	5.14	oui	oui	oui
<b>Ch b Ca</b>	0.23±0.01c	0.1±0.01f	0.2±0.01d	0.12±0.01e	0.87±0.2a	0.32±0.1b	1381.33	5.14	oui	oui	oui
<b>Ch b Cj</b>	0.41±0.1b	0.05±0.1c	0.36±0.1b	0.13±0.1c	0.733±0.1a	0.1±0.01c	448.00	5.14	oui	oui	oui
<b>TRE C</b>	79.1±2.3a	50.8±2c	44±2d	19±1e	59±2b	12.8±1.3f	63.14	5.14	oui	oui	oui
<b>TRE C</b>	46.04±3b	15±2e	34±2.3c	17±1d	54±1a	12.8±1f	13.24	5.14	oui	oui	oui
<b>Na<sup>+</sup> C</b>	9.9±2c	17.2±2.3b	5.11±1.2e	20.91±1.9a	7.5±1d	11.5±2c	10.64	5.14	oui	oui	oui
<b>Na<sup>+</sup> R</b>	67.2±2d	336±1.8a	40.4±2.3f	215±3c	63.9±3e	231.2±2.9b	67.40	5.14	oui	oui	oui
<b>K<sup>+</sup> C</b>	12.6±1.2f	44.32±2c	16.9±1e	63±1b	29.9±2d	96.52±2a	1347.45	5.14	oui	oui	oui
<b>K<sup>+</sup> R</b>	3.53±1b	4.33±1b	4.73±1b	12.73±2a	13.92±1a	14.33±1a	86.56	5.14	non	oui	non
<b>Ca<sup>2+</sup> C</b>	10.6±1.2e	42±2b	15.3±1d	58.26±1.3a	26.43±2c	58.43±1a	267.18	5.14	oui	oui	oui
<b>Ca<sup>2+</sup> R</b>	2.4±1ns	3.22±1ns	3.6±1.3ns	4.8±2ns	2.8±2ns	3.2±1.2ns	3.97	5.14	non	non	non
<b>K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> C</b>	0.18±0.1d	0.13±0.01e	0.4±0.1b	0.29±0.01c	0.46±0.2a	0.41±0.1b	592.00	5.14	oui	oui	oui
<b>K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R</b>	0.35±0.1e	0.25±0.01f	0.92±0.01c	0.57±0.1d	1.85±1a	1.24±0.b	596.92	5.14	oui	oui	oui

**Partie 2 : Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de tous les paramètres morpho-physiologique et biochimique et évaluation de la tolérance de cinq espèces d'*Opuntia* au stress salin**

**4.2.1 Comparaison de F Observée**

**4.2.1.1 Stress 200 mM NaCl**

Sous stress salin faible (200 mM), l'analyse de la variance révèle l'existence de différence significative entre les différentes espèces (Tableau 4.1 ; tableaux 1, 4, 7, appendice B). NR, LR, PFCa, PFCj, PR, PCa, PCj, SR, SCa, SCj, ChtCj, ChaCj, ChbCj, ChtCa, ChbCa, rapport  $K^+/Na^+R$ , TRECa, TRECj,  $Na^+C$ ,  $K^+C$ ,  $Ca^{2+}C$  et le rapport  $K^+/Na^+$  au niveau de racines sont significativement affectées par le stress salin (ANOVA à une seule voie, Tableau 4.1). Cependant, ce niveau de stress n'a pas affecté les paramètres suivants : PFR, LCa, LaCa, LCj, LaCj, rapport PFR/PFC, ChaCa,  $Ca^{+2}R$  et le rapport  $K^+/Na^+$  au niveau des cladodes (Tableau 4.1).

La comparaison des  $F_{\text{Observée}}$  de 32 paramètres étudiés (morpho-physiologiques et biochimiques) sous stress salin faible, montre que la teneur en chlorophylle totale au niveau des cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant, suivi par la teneur en chlorophylle « *b* » dans les cladodes jeunes (Tableau 4.1).

Le nombre de racines reflète aussi l'effet d'interaction G x S mais le  $F_{\text{Observée}}$  était relativement faible.

Le sel provoque une diminution très hautement significative des teneurs en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes chez toutes les espèces étudiées. Les réductions enregistrées respectivement chez l'*O. streptacantha*, l'*O. amyckae*, l'*O. ficus indica* et l'*O. engelmannii* sont de 50 %, 42.27 %, 40 % et 4.90 % par rapport aux témoins respectifs. En effet, l'*O. engelmannii* s'est montrée la moins affectée par le sel.

L'effet du sel s'est traduit également par une baisse significative des teneurs en chlorophylle « b » dans les cladodes jeunes chez les quatre espèces. L'*O. engelmannii* semble être moins affecté par le sel, elle enregistre une réduction de l'ordre de 2.53%, suivie de l'*O. streptacantha* qui a enregistré une réduction de 36.11 %. Par contre, l'*O. ficus indica* et l'*O. amycteleae* accusent les grandes baisses des teneurs 53.65 %, 62.35 % respectivement.

#### **4.2.1.2 Stress 400 mM NaCl**

Sous stress salin modéré (400 mM NaCl), l'analyse de la variance révèle l'existence de différence significative entre les différentes espèces (Tableau 4.2 ; tableaux 2, 5, 8, appendice B). NR, LR, LCa, LCj, PFCa, PFCj, PR, PCa PCj, SR, SCa, SCj, ChtCj, ChaCj, ChbCj, ChtCa, ChaCa, ChbCa, TRECa, TRECj, Na<sup>+</sup>C, K<sup>+</sup>C, Ca<sup>2+</sup>C et K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R sont significativement affectée par le stress salin (ANOVA à une seule voie, Tableau 4.2). Cependant, ce niveau de stress n'a pas affecté les paramètres suivants : PFR, LaCa, LaCj, PFR/PFC, Ca<sup>2+</sup>R et K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>C (Tableau 4.2).

La comparaison des F<sub>Observée</sub> de 32 paramètres étudiés (morpho-physiologiques et biochimiques) sous stress salin modérée, montre que la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant suivi par la teneur en chlorophylle totale dans les cladode âgées (Tableau 4.2).

La longueur des cladodes jeunes et âgées reflètent aussi l'effet d'interaction G x S mais le F<sub>Observée</sub> était relativement faible.

Le sel provoque une diminution très hautement significative des teneurs en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes (Tableau 4.2) chez toutes les espèces étudiées. Les réductions enregistrées respectivement chez l'*O. streptacantha*, l'*O. amycteleae*, l'*O. ficus indica* et l'*O. engelmannii* sont de 56.89 %, 55.28 %, 52.85 % et 32.35 % par rapport aux témoins respectifs. En effet, l'*O. engelmannii* s'est montrée la moins affectée par le sel.

L'application de stress salin (400 mM) affecte également la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes âgées. Cet effet varie d'une espèce à l'autre. En effet, l'*O. amycteleae* et l'*O. ficus indica* montrent respectivement des réductions de 47.88 % et 45.20 %. L'*O. engelmannii* s'avère être la moins affectée, elle enregistre une réduction de 17.82 % suivie par l'*O. streptacantha* avec une réduction de 18.33 %.

#### **4.2.1.3 Stress 600 mM NaCl**

Sous stress sévère (600 mM NaCl), l'analyse de la variance révèle l'existence de différence significative entre les différentes espèces (Tableau 4.3, tableaux 3, 6, 9, appendice B). ChaCa, ChaCj, Na<sup>+</sup>R, ChbCa, PFR,PFCa, PFCj,SR, SCa, SCj, ChrCj, ChrCa, Ca<sup>2+</sup>C, PR, PCj, K<sup>+</sup> R, K<sup>+</sup>C, PFR/PFC, TRECa, TRECj, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> C, LCa, LCj, LR et NR sont significativement affectés par le stress salin (ANOVA à une seule voie, Tableau 4.3).

La comparaison des F<sub>Observée</sub> de 32 paramètres étudiés (morpho-physiologiques et biochimiques) sous stress salin sévère, montre que la teneur en chlorophylle « a » dans les cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant suivi par la teneur en chlorophylle « a » dans les cladodes âgées (Tableau 4.3).

La longueur des cladodes jeunes reflète aussi l'effet d'interaction G x S mais le F<sub>Observée</sub> était relativement faible. Cet impact était dû à des effets entre groupes chez l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*. Ce niveau de stress n'a pas affecté la largeur des cladodes âgées et jeunes et la teneur en Ca<sup>++</sup> dans les racines (Tableau 4.3).

L'effet du sel s'est traduit par une baisse significative des teneurs en chlorophylle « a » dans les cladodes âgées chez les quatre espèces. L'*O. engelmannii* semble être moins affecté par le sel. Elle enregistre une réduction de l'ordre de 28.57 % et est suivi par l'*O. streptacantha* qui a enregistré une réduction de 32.5 %. Par contre, l'*O. ficus indica* accuse une grande baisse de teneurs 84 %.

La teneur en chlorophylle « a » des cladodes jeunes a été également affectée par la salinité chez toutes les espèces étudiées (Tableau 4.3). L'*Opuntia streptacantha*, l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* et l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* ont montré une diminution très hautement significative par rapport à leur témoin et ont présentées des pourcentages de réduction de 65 %, 64.28 % et 30.43 % respectivement.

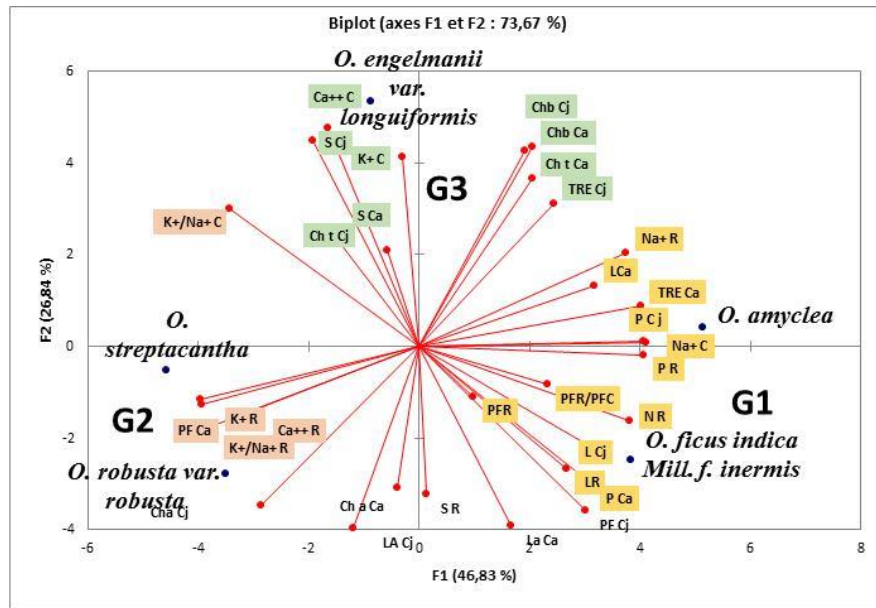
#### **4.2.2 Analyse en composantes principales (ACP)**

##### **4.2.2.1 Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de tous les paramètres morpho-physiologique et biochimique sous régime d'eau non saline (Témoin = 0 mM NaCl)**

L'ACP présentée dans la figure 4.31 et tableau 4.4, donne une estimation de la variabilité représentée par chaque axe. En se limitant aux deux premiers axes, l'analyse en composantes principales montre que les deux axes (ACP1 et ACP2) représentent 73.669 % de la variabilité totale.

La première composante principale (ACP1) représente 46.825% de la variabilité totale. Cette composante se définit du côté positive et négatif par : N R, L R, L Cj, L Ca, PF R, LA Ca, P R, P Ca, P Cj, TRE Ca, Na<sup>+</sup> C, Na<sup>+</sup> R, PFR/PFC, PF Ca, K<sup>+</sup> R, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R, Ca<sup>+2</sup> R, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> C. La teneur en Na<sup>+</sup> dans les cladodes, la teneur en proline dans les racines et dans les cladodes jeunes et la teneur relative en eau dans les cladodes âgées semble représenter les composants les plus importants générés par cette ACP.

L'axe 2 (ACP2) représente 26.843 % de la variabilité totale, il est influencé par TRE Cj, S Ca, S Cj, Chl t Ca, Chl t Cj, Ch b Ca, Chl b Cj, K<sup>+</sup> C, Ca<sup>+2</sup> C. La teneur en Ca<sup>2+</sup> C, K<sup>+</sup> C, Ch b Ca et Ch b Cj semble représenter les composants les plus importants générés par cette ACP (Figure 4. 31). En tenant compte de la signification des axes, nous avons analysé la répartition des espèces dans le plan engendré par les deux axes ACP1 et ACP2.



**Figure 4.31 :** Analyse en composantes principales, superposition des variables et les espèces sur les deux axes ACP1 et ACP2.

**Tableau 4.4 :** Valeurs propres

Paramètres	F1	F2	Paramètre	F1	F2
Valeur propre	14.984	8.590	Valeur propre	14.984	8.590
Variabilité (%)	46.825	26.843	Variabilité (%)	46.825	26.843
% cumulé	46.825	73.669	% cumulé	46.825	73.669
N R	0,238	-0,102	Chl t Ca	0,127	0,228
L R	0,166	-0,166	Chl t Cj	-0,036	0,132
PFR	0,061	-0,068	Ch a Cg	-0,025	-0,192
L Ca	0,198	0,083	Ch a Cj	-0,179	-0,215
LA Ca	0,104	-0,243	Chl bCa	0,127	0,271
PF Ca	-0,209	-0,095	Chl bCj	0,119	0,267
L Cj	0,212	-0,148	TRE Ca	0,250	0,054
LA Cj	-0,074	-0,247	TRE Cj	0,152	0,195
PF Cj	0,187	-0,224	Na <sup>+</sup> C	0,256	0,006
PFR/PFC	0,145	-0,052	Na <sup>+</sup> R	0,234	0,127
P R	0,254	-0,011	K <sup>+</sup> C	-0,120	0,279
P Ca	0,194	-0,187	K <sup>+</sup> R	-0,246	-0,080
P Cj	0,254	0,007	Ca <sup>2+</sup> C	-0,103	0,297
S R	0,008	-0,201	Ca <sup>2+</sup> R	-0,247	-0,072
S Ca	-0,102	0,159	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> C	-0,215	0,187
S Cj	-0,020	0,258	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> R	-0,238	-0,110

La distribution des individus montre l'existence de trois groupes des espèces. Le premier groupe est formé par : l'*O. ficus indica* et l'*O. amycteleae* ; le second par l'*O. streptacantha* et l'*O. robusta*. Alors que l'*O. engelmannii* forme le troisième groupe.

Le premier groupe est diamétralement opposé au deuxième groupe par rapport à l'axe de la composante principale (ACP1).

#### **4.2.2.2 Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de tous les paramètres morpho-physiologiques et biochimiques sous régime d'eau faiblement saline (200 mM NaCl)**

##### **4.2.2.2.1 Étude des variables**

L'analyse en composantes principales montre que les deux axes (ACP1 et ACP2) représentent 88.84 % de la variabilité totale. En effet, le premier axe décrit 49.71 % de la variation (figure 4.32, tableau 4.2). Cette composante se définit du côté positif et négatif par L Ca, S R, S Ca, Ch t Ca, Ch t Cj, Ch b Cj, Ch b Ca, Ch a Cj, TRE Cj, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> C, L R, PF R, PFR/PFC, Na<sup>+</sup> C, K<sup>+</sup> C, Ca<sup>+2</sup>C (Tableau 4.5).

La deuxième composante décrit 39.12 % de la variation. Elle se définit par le nombre de racines (NR), PF Cj, LA Cj, P R, P Ca, P Cj, Ch a Ca, TRE Ca, Na<sup>+</sup> R, L Cj. Ces variables sont positivement corrélées à l'axe (Tableau 4.5). Par contre, le poids frais des cladodes âgées (PFCa), LA Ca, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R, Ca<sup>+2</sup> R, K<sup>+</sup> R, SCj sont corrélées négativement à l'axe 2. L'ACP confirme que la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes et la teneur en chlorophylle « b » au niveau des cladodes jeunes sont les paramètres les plus discriminants.

Cette analyse a montré que les paramètres PFCa, S R, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R, K<sup>+</sup> R, Ca<sup>+2</sup> R, L Cj, P Cj, P R, P Ca, TRE Ca, NR, Na<sup>+</sup> R se trouvent corrélés au deuxième axe, alors que les paramètres TRE Cj, S Ca, Ch t Ca, Ch t Cj, Ch b Cj, Ch b Ca, K<sup>+</sup> C, Ca<sup>+2</sup>C se trouvent corrélés au premier axe inversement à ce qui a été noté au niveau du témoin (0 mM). La



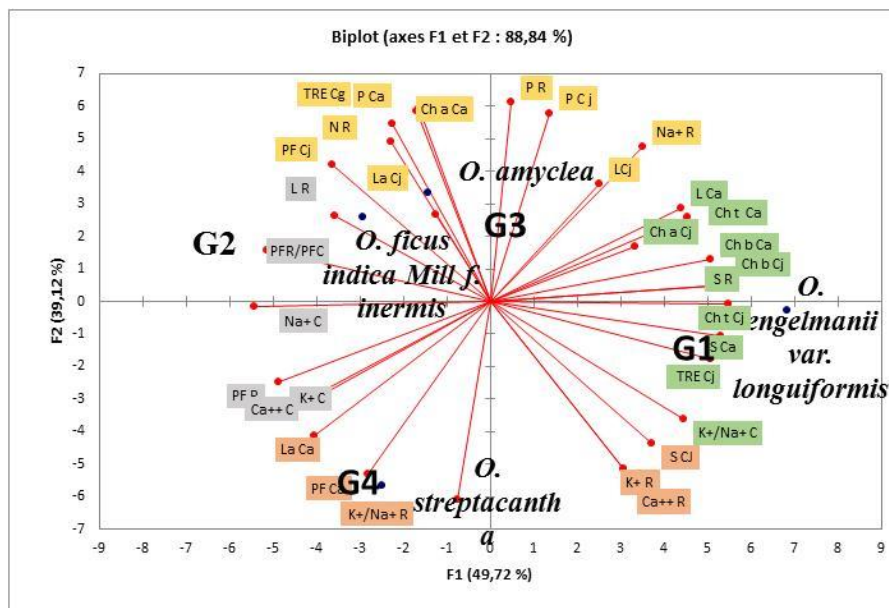
distribution des espèces dans le plan suivant les deux axes n'a pas gardé le même regroupement

#### 4.2.2.2 Etude des espèces

La distribution de 5 espèces sur le plan formé par les deux axes de l'ACP n'a pas gardé le même regroupement par rapport au témoin. Celle-ci est démontrée par la dispersion en nuage de points représentant les espèces (figure 4.32).

Axe 1 : du côté positif l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* a été favorisé par le premier niveau de stress (200 mM) et opposé à l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*.

Axe 2 : l'*O. amycleae* est régressée du niveau le plus élevé en absence de stress se trouve du côté positif de l'axe 2 et opposé à l'*O. streptacantha*.



**Figure 4.32:** Analyse en composantes principales, Superposition des variables et les espèces sur les deux axes ACP1 et ACP2.

**Tableau 4.5 : Vecteurs propres**

Paramètres	F1	F2	Paramètres	F1	F2
Valeur propre	15.910	12.519	Valeur propre	15.910	12.519
Variabilité (%)	49.719	39.122	Variabilité (%)	49.719	39.122
% cumulé	49.719	88.841	% cumulé	49.719	88.841
NR	-0,104	0,223	Chl <i>t</i> Ca	0,206	0,119
LR	-0,162	0,119	Chl <i>t</i> Cj	0,249	0,023
PFR	-0,222	-0,113	Ch <i>a</i> Cg	-0,103	0,249
LCa	0,200	0,131	Ch <i>a</i> Cj	0,151	0,077
LA Ca	-0,184	-0,187	Chl <i>b</i> Ca	0,231	0,058
PF Ca	-0,128	-0,242	Chl <i>b</i> Cj	0,249	0,023
LCj	0,114	0,164	TRE Ca	-0,075	0,269
LA Cj	-0,057	0,122	TRE Cj	0,231	-0,080
PF Cj	-0,166	0,192	Na <sup>+</sup> C	-0,247	-0,008
PFR/PFC	-0,233	0,071	Na <sup>+</sup> R	0,160	0,216
PR	0,022	0,279	K <sup>+</sup> C	-0,209	-0,149
PCa	-0,078	0,267	K <sup>+</sup> R	0,140	-0,233
PCj	0,063	0,263	Ca <sup>2+</sup> C	-0,206	-0,152
SR	0,247	-0,003	Ca <sup>2+</sup> R	0,140	-0,233
SCa	0,242	-0,048	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> C	0,203	-0,164
SCj	0,169	-0,198	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> R	-0,034	-0,278

#### **4.2.2.3 Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de tous les paramètres morpho-physiologiques et biochimiques sous régime d'eau modérément saline (400 mM NaCl)**

##### **4.2.2.3.1 Étude des variables**

Les deux axes de l'ACP décrivent 89.83 % de la variation totale (Tableau 4.6). Le premier axe exprime un important pourcentage de variation (49.29 %). Il est positivement et négativement corrélé au PF R, LA Ca, LA Cj, PF Cj, PF Ca, P Ca, P Cj, S Ca, Ch *t* Ca, Ch *t* Cj, Ch *b* Ca, Ch *b* Cj, Ch *a* Ca, TRE Cj, Na<sup>+</sup> C, K<sup>+</sup>R, Ca<sup>2+</sup> R, et K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R (figure 4.33, tableau 4.6). La deuxième composante décrit 40.53 % de la variation. Elle se définit par NR, LR, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> C, Ca<sup>2+</sup> C, K<sup>+</sup>C, TRE Ca, Ch *a* Cj, PFR/PFC, L Cj, L Ca, S Cj, S R, P R, N<sup>+</sup> R. Ces variables sont positivement et négativement corrélées à l'axe. L'ACP confirme que la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes, suivi par la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes âgées sont les paramètres les plus discriminants.

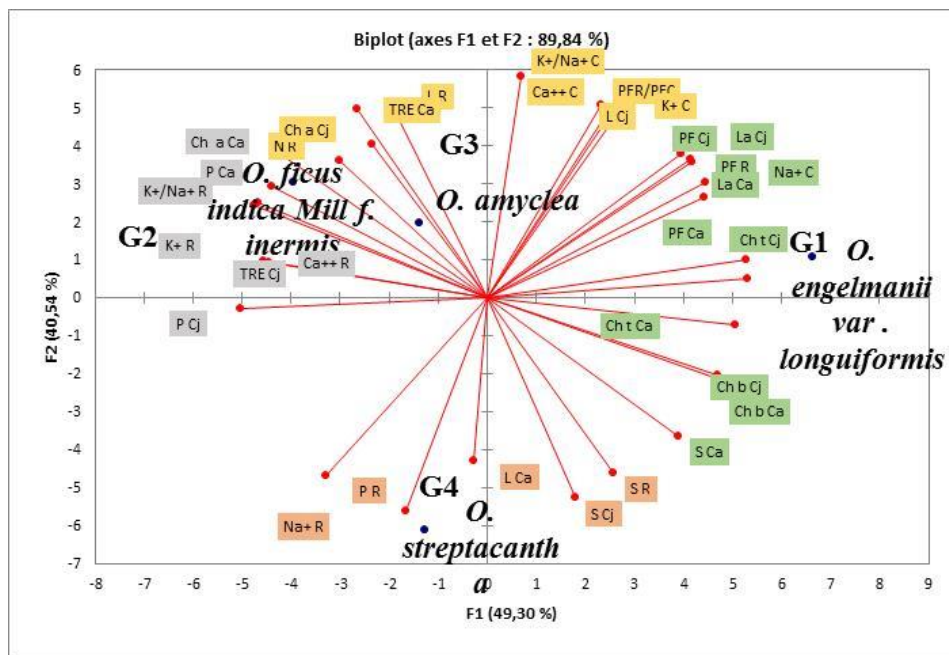
Cette analyse a montré que les paramètres TRE Cj , S Ca, Ch t Ca, Ch t Cj, Ch b Ca, Ch b Cj, se trouvent corrélés au premier axe, alors que les paramètres NR, LR , K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> C, P R, L Cj, PFR/PFC, Na<sup>+</sup> R, TRE Ca, L Ca se trouve corrélé au deuxième axe inversement à ce qui a été noté au niveau du témoin (0 mM). La distribution des espèces dans le plan suivant les deux axes n'a pas gardé le même regroupement.

#### 4.2.2.3.2 Etude des espèces

La projection de 4 espèces sur le plan formé par les deux axes de l'ACP montre une variabilité au sein des espèces évaluées vis-à-vis du deuxième niveau du stress salin (400 mM NaCl). Celle-ci est démontrée par la dispersion en nuage de points représentant les espèces (figure 4.33).

Axe 1 : du côté positif l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* a été favorisé par le deuxième niveau de stress (400 mM NaCl). Opposées à l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*.

Axe 2 : l'*O. amyctea* est régressée du niveau le plus élevé en absence de stress se trouve du côté positif de l'axe 2 opposées à l'*O. streptacantha*.



**Figure 4.33 :** Analyse en composantes principales, Superposition des variables et les espèces sur les deux axes ACP1 et ACP2

**Tableau 4.6 : Valeurs propres**

Paramètres	F1	F2	Paramètres	F1	F2
Valeur propre	15.7	12.9	Valeur propre	15.7	12.9
Variabilité (%)	49.2	40.5	Variabilité (%)	49.2	40.5
% cumulé	49.2	89.8	% cumulé	49.2	89.8
N R	-0,141	0,169	Chl <i>t</i> Ca	0,240	0,118
L R	-0,088	0,231	Chl <i>t</i> Cj	0,238	0,114
PFR	0,209	0,144	Ch <i>a</i> Cg	-0,195	0,175
L Ca	-0,014	-0,202	Ch <i>a</i> Cj	-0,110	0,190
LA Ca	0,208	0,125	Chl <i>b</i> Ca	0,221	0,046
PF Ca	0,249	0,025	Chl <i>b</i> Cj	0,222	0,044
L Cj	0,118	0,235	TRE Ca	-0,124	0,233
LA Cj	0,196	0,169	TRE Cj	-0,219	0,047
PF Cj	0,186	0,179	Na <sup>+</sup> C	0,195	0,172
PFR/PFC	0,110	0,238	Na <sup>+</sup> R	-0,078	-0,263
P R	-0,154	-0,219	K <sup>+</sup> C	0,129	0,238
P Ca	-0,207	0,137	K <sup>+</sup> R	-0,209	-0,100
P Cj	-0,236	-0,012	Ca <sup>2+</sup> C	0,125	0,240
S R	0,121	-0,217	Ca <sup>2+</sup> R	-0,215	-0,096
S Ca	0,184	-0,171	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> C	0,032	0,275
S Cj	0,084	-0,248	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> R	-0,223	-0,034

#### **4.2.2.4 Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de tous les paramètres morpho-physiologiques et biochimiques sous régime d'eau fortement saline (600 mM NaCl)**

##### **4.2.2.4.1 Étude des variables**

Les deux axes de l'ACP décrivent 100 % de la variation totale (Tableau 4.7). Le premier axe exprime un important pourcentage de variation (59.46%). Il est positivement corrélé au LA Ca, S Cj, PCj, S Ca, Ch *t* Ca, Ch *t* Cj, Ch *a* Ca, Ch *b* Ca, Ch *a* Cj, TRE Cj, Ca<sup>2+</sup> C, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> C et K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> R (figure 4.34, tableau 4.7). La deuxième composante décrit 40.53 % de la variation. Elle se définit par L R, L Ca, L Cj, LA Cj, PFCj, PF R, PFR/PFC, S R, Ch *b* Cj, TRE Ca, Na<sup>+</sup>R, K<sup>+</sup>C, Ca<sup>2+</sup> C. Cette variables sont positivement et négativement corrélée à l'axe 2. L'ACP confirme que la teneur en chlorophylle « a » dans les cladodes jeunes et âgées sont les paramètres les plus discriminants.

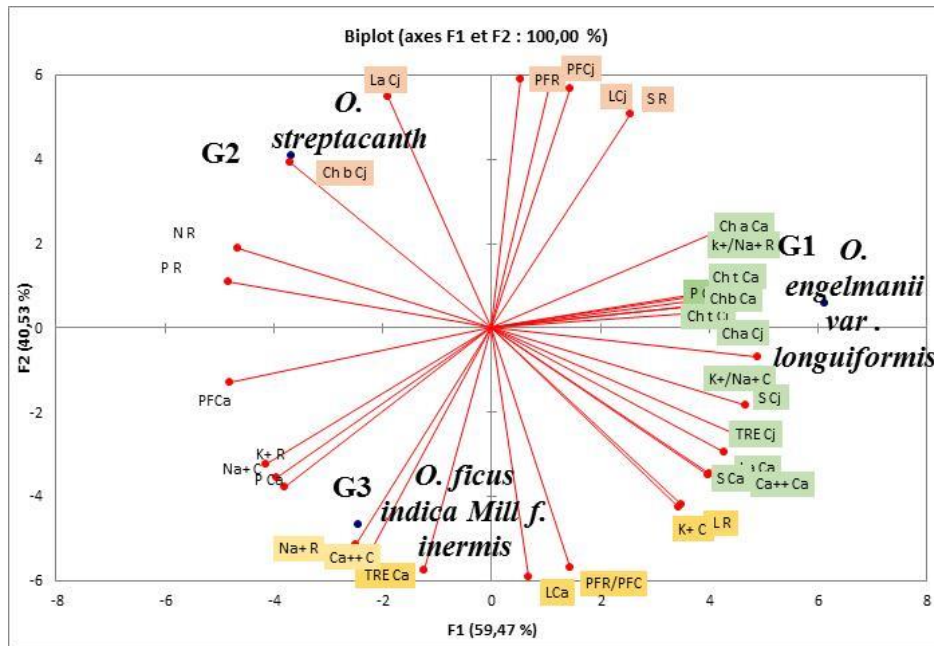
Cette analyse a montré que les paramètres S Ca, S Cj, Ch t Ca, Ch t Cj, TRE Cj, Ch b Ca, Ca<sup>2+</sup> C, se trouvent corrélés au premier axe, alors que les paramètres L R, L Ca, L Cj, LA Ca, PFR, PFR/PFC, TRE Ca, Na<sup>+</sup> R se trouvent corrélés au deuxième axe inversement à ce qui a été noté au niveau du témoin (0 mM). La distribution des espèces dans le plan suivant les deux axes n'a pas gardé le même regroupement.

**4.2.2.4.2 Etude des espèces**

La projection de 3 espèces sur le plan formé par les deux axes de l'ACP montre une variabilité au sein des espèces évaluées vis-à-vis du troisième niveau du stress salin (600 mM). Celle-ci est démontrée par la dispersion en nuage de points représentant les espèces (figure 4.34).

Axe 1 : du côté positif l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* a été favorisée par le dernier niveau de stress (600 mM).

Axe 2: l'*O. streptacantha* se trouve du côté positif de l'axe 2 opposées à l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*.



**Figure 4.34 :** Analyse en composantes principales, superposition des variables et les espèces sur les deux axes ACP1 et ACP2.

**Tableau 4.7 : Valeurs propres**

<b>Paramètres</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>	<b>Paramètres</b>	<b>F1</b>	<b>F2</b>
Valeur propre	19.030	12.970	Valeur propre	19.030	12.970
Variabilité (%)	59.469	40.531	Variabilité (%)	59.469	40.531
% cumulé	59.469	100.000	% cumulé	59.469	100.000
N R	-0,217	0,089	Chl t Ca	0,226	0,046
L R (cm)	0,160	-0,198	Chl t Cj	0,228	0,032
PFR (g)	0,025	0,276	Ch a Cg	0,226	0,048
L Ca (cm)	0,032	-0,275	Clh a Cj	0,228	0,032
LA Ca (cm)	0,199	-0,137	Chl bCa	0,227	0,039
PF Ca (g)	-0,224	-0,060	Chl bCj	-0,172	0,183
L Cj	0,067	0,265	TRE Ca	-0,058	-0,269
LA Cj	-0,088	0,256	TRE Cj	0,208	-0,117
PF Cj	0,050	0,271	Na <sup>+</sup> C	-0,184	-0,165
PFR/PFC	0,067	-0,266	Na <sup>+</sup> R	-0,116	-0,239
P R	-0,225	0,051	K <sup>+</sup> C	0,163	-0,195
P Ca	-0,177	-0,176	K <sup>+</sup> R	-0,193	-0,150
P Cj	0,229	0,022	Ca <sup>2+</sup> C	0,186	-0,162
S R	0,119	0,237	Ca <sup>2+</sup> R	-0,103	-0,248
S Ca	0,187	-0,161	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> C	0,228	-0,031
S Cj	0,218	-0,086	K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup> R	0,208	0,116

En vue d'avoir une vision globale, nous sommes passée à une autre analyse synthétique pour discerner les différentes espèces pour toutes les variables retenues.

### 4.2.3 Evaluation de la tolérance de cinq espèces d'*Opuntia* au stress salin

#### 4.2.3.1 Classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) sans stress « Témoin »

La matrice des distances obtenues à l'issue de l'analyse canonique discriminante (Tableau 4.8) a montré que ces distances pouvaient varier de 45.94 à 123.39, ce qui témoignerait d'une forte diversité phénotypique au sein de la collection étudiée. La distance la plus faible a été enregistrée entre l'*O. ficus indica* et l'*O. amycleae*, alors que la plus élevée a été observée entre l'*O. streptacantha* et l'*O. amycleae*. L'*O. ficus indica* et l'*O. amycleae* présenteraient donc le maximum de similitudes morphologiques, l'*O. streptacantha* et l'*O. amycleae*, le maximum de divergences.

L'analyse du dendrogramme des espèces (Figure 4.35) nous permet de distinguer trois grands groupes (G1, G2 et G3).

Ainsi, en prenant en considération toutes les valeurs de trente-deux paramètres, nous relevons trois différents groupes en absence de l'agent de stress (NaCl).

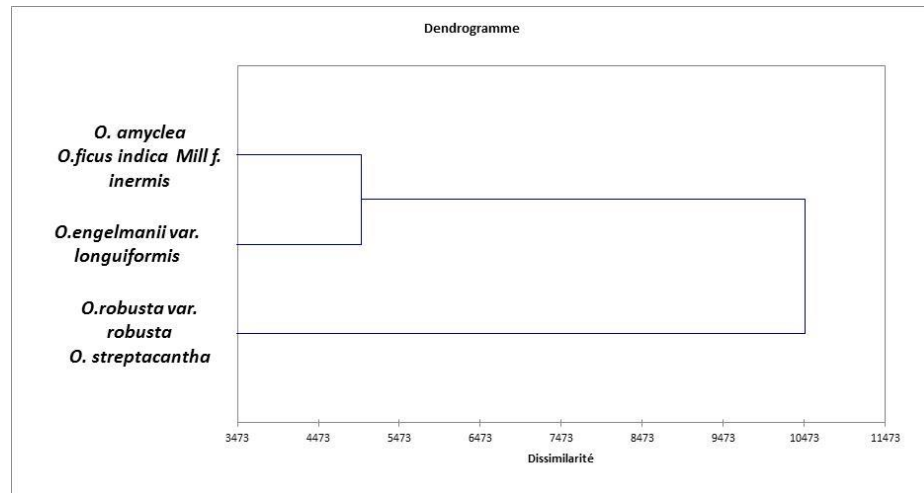
**Groupe 1:** Il est constitué par 2 espèces : *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* et *O. amyclea*. Ces deux espèces sont proches génétiquement.

**Groupe 2:** Constitué par l'*O. engelmannii* var. *longuiformis*.

**Groupe 3:** Comprend deux espèces (*O. streptacantha* et *O. robusta* var. *robusta*).

**Tableau 4.8 :** Matrice de proximité (Distance euclidienne)

	<i>O. ficus indica</i> Mill. f. <i>inermis</i> (I)	<i>O.</i> <i>amyacleae</i> (A)	<i>O.</i> <i>streptacantha</i> (S)	<i>O.robusta</i> var. <i>robusta</i> (R)	<i>O. engelmannii</i> var. <i>longuiformis</i> (E)
(I)	0				
(A)	45.948	0			
(S)	121.681	125.908	0		
(R)	85.286	92.009	62.404	0	
(E)	74.286	102.639	123.398	93.555	0



**Figure 4.35 :** Classification hiérarchique ascendante (CHA) des 5 espèces d'*Opuntia* suivant le critère d'agrégation des moyennes pondérées (UPGMA) sans effet du stress salin (Témoin)

#### **4.2.3.2 Classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) sous stress faible (200 mM NaCl)**

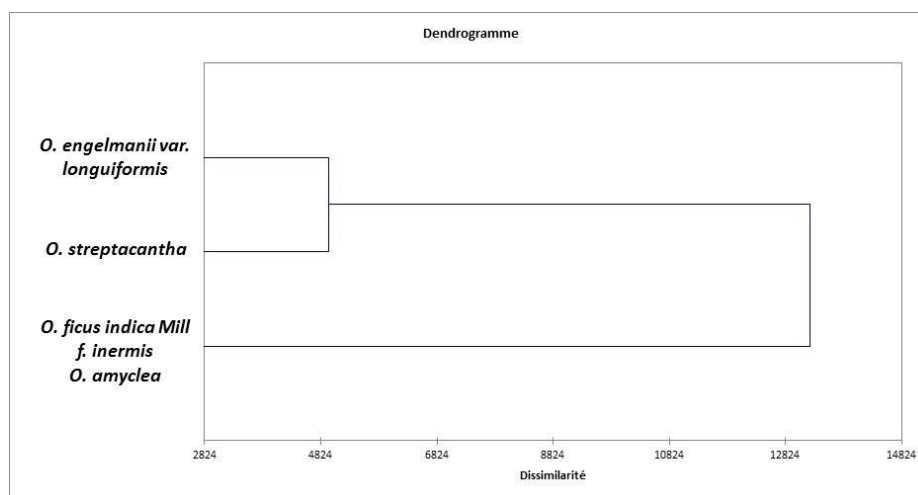
La matrice des distances obtenues à l'issue de l'analyse canonique discriminante (Tableau 4.9) a montré que ces distances pouvaient varier de 36.99 à 160.44, ce qui témoignerait d'une forte diversité phénotypique au sein de la collection étudiée vis à vis du premier niveau du stress salin (200 mM NaCl). La distance la plus faible a été enregistrée entre l'*O. ficus indica* et l'*O. amycleae* alors que la plus élevée a été observée entre l'*O. engelmannii* et l'*O. streptacantha*.

La synthèse des informations issues de la matrice de proximité (Distance euclidienne) a permis de construire un dendrogramme qui a été obtenu par la méthode UPGMA (Unweighed Pair-Group Method with arithmétique Average par (Figure 4.36). Trois groupes principaux se distinguent: le premier groupe est composé d'*O. engelmannii* var. *longuiformis* qui est très résistante au premier niveau du stress (200 mM) ; le second groupe est composé d'*Opuntia streptacantha* qui est résistante au premier niveau du stress. Le troisième groupe constitue les espèces moyennement résistantes au premier niveau du stress salin (200 mM): *O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, *O. amycleae*.



**Tableau 4.9 :** Matrice de proximité (Distance euclidienne)

	<i>O. ficus indica</i> Mill. f. <i>inermis</i> (I)	<i>O. amyctae</i> (A)	<i>O. streptacantha</i> (S)	<i>O. engelmannii</i> var. <i>longuiformis</i> (E)
(I)	0			
(A)	36.994	0		
(S)	120.968	135.050	0	
(E)	85.069	91.329	160.447	0



**Figure 4.36 :** Classification hiérarchique ascendante (CHA) des 4 espèces d'*Opuntia* suivant le critère d'agrégation des moyennes pondérées (UPGMA) sous stress faible (200 mM NaCl).

#### **4.2.3.3 Classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) sous stress modérée (400 mM NaCl)**

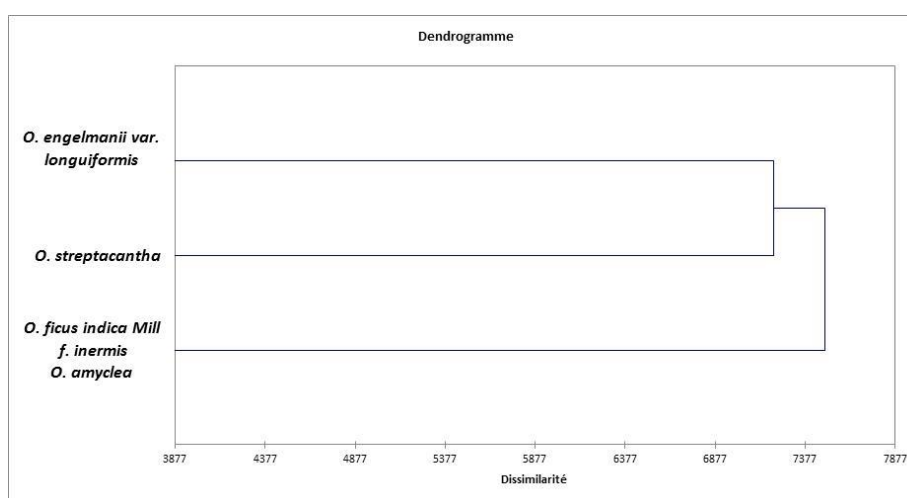
La matrice des distances obtenues à l'issue de l'analyse canonique discriminante (Tableau 4.10) a montré que ces distances pouvaient varier de 33.19 à 120.42, ce qui témoignerait d'une forte diversité phénotypique au sein de la collection étudiée vis à vis du deuxième niveau du stress salin (400 mM NaCl). La distance la plus faible est enregistrée entre l'*O. ficus indica* et l'*O. amyctae* alors que la plus élevée est observée entre l'*O. engelmannii* et l'*O. streptacantha*.

La synthèse des informations issues de la matrice de proximité (Distance euclidienne) a permis de construire un dendrogramme (Figure 4.37). Trois groupes

principaux se distinguent : le premier est composé d'*Opuntia engelmannii* qui est l'espèce la plus tolérante au deuxième niveau du stress salin (400 mM) ; le second est constitué d'*Opuntia streptacantha* qui est résistante au deuxième niveau du stress. Le dernier regroupe l'*O. ficus indica* et l'*O. amycleae* qui sont moyennement résistantes au deuxième niveau du stress (400 mM).

**Tableau 4.10** : Matrice de proximité (Distance euclidienne) :

	<i>O. ficus indica</i> Mill. f. <i>inermis</i> (I)	<i>O. amycleae</i> (A)	<i>O. streptacantha</i> (S)	<i>O. engelmannii</i> var. <i>longuiformis</i> (E)
(I)	0			
(A)	33.190	0		
(S)	101.548	108.854	0	
(E)	108.045	107.379	120.420	0



**Figure 4.37** : Classification hiérarchique ascendante (CHA) des 4 espèces d'*Opuntia* suivant le critère d'agrégation des moyennes pondérées (UPGMA) sous l'effet du troisième niveau du salin (400 mM).

#### **4.2.3.4 Classification ascendante hiérarchique (C.A.H.) sous stress sévère (600 mM)**

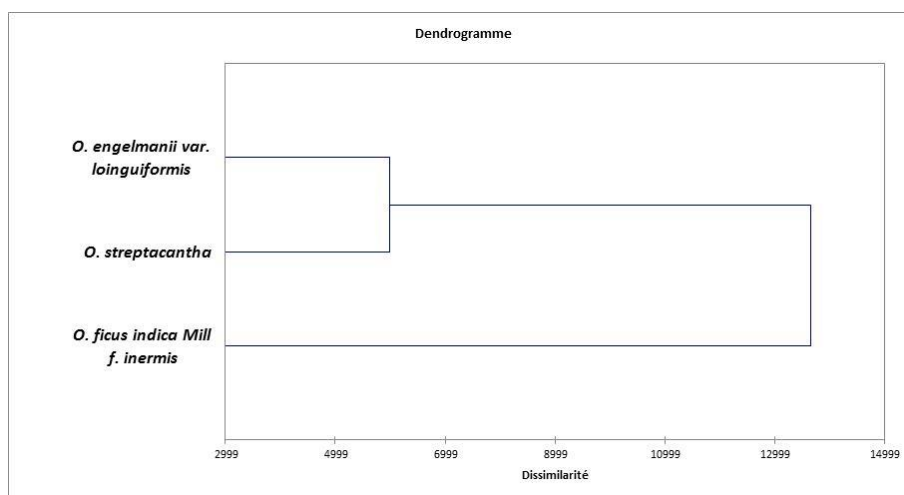
La matrice des distances obtenues à l'issue de l'analyse canonique discriminante (Tableau 4.11) a montré que ces distances pouvaient varier de 109.52 à 157.97, ce qui témoignerait d'une forte diversité phénotypique au sein de la collection étudiée vis à vis du

troisième niveau du stress salin (600 mM de NaCl). La distance la plus faible est enregistrée entre l'*O. engelmannii* et *O. streptacantha* alors que la plus élevée est observée entre l'*O. streptacantha* et l'*O. ficus indica*.

La synthèse des informations issues de la matrice de proximité a permis de construire un dendrogramme (Figure 4.38). Trois groupes principaux se distinguent: le premier comprend, l'espèce la plus tolérante au troisième niveau du stress salin (600 mM): *O. engelmannii*, le second est composé d'*O. streptacantha* qui est tolérante au troisième niveau du stress. Le dernier groupe est composé d'*O. ficus indica* qui est moyennement tolérante au troisième niveau du stress (600 mM). Cette topologie confirmerait la divergence d'*Opuntia ficus indica* avec les deux autres espèces de la collection.

**Tableau 4.11** : Matrice de proximité (Distance euclidienne)

	<i>O. ficus indica</i> Mill. f. <i>inermis</i> (I)	<i>O. streptacantha</i> (S)	<i>O. engelmannii</i> var. <i>longuiformis</i> (E)
(I)	0		
(S)	157.973	0	
(E)	148.425	109.527	0



**Figure 4.38** : Classification hiérarchique ascendante (CHA) des 3 espèces d'*Opuntia* suivant le critère d'agrégation des moyennes pondérées (UPGMA) sous l'effet du troisième niveau de stress salin (600 mM).

#### 4.2.4 Discussion

L'étude de la réponse des plantes à la salinité, nécessite d'analyser la variabilité des caractères les plus discriminants pour la tolérance au sel. En effet, certains paramètres discriminent nettement entre le comportement des espèces d'*Opuntia* étudiées, sous stress sévère (600 mM NaCl), d'autres le sont sous stress faible (200 mM NaCl) ou sous stress modéré (400 mM NaCl). Les résultats obtenus pour l'ensemble des paramètres analysés montrent que les espèces d'*Opuntia* étudiées réagissent différemment et ne présentent pas le même degré de tolérance ou de sensibilité au chlorure de sodium.

Sous stress salin faible (200 mM NaCl), les résultats montrent que la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant suivi par la teneur en chlorophylle « *b* » au niveau des cladodes jeunes. En effet, c'est l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* qui semble être la moins affectée par le sel. Elle enregistre des réductions de l'ordre de 4.9 % et 2.35 % respectivement pour la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes et la teneur en chlorophylle « *b* » dans les cladodes jeunes.

Des corrélations significative et négative entre la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes et la teneur en sucres solubles totale dans les cladodes jeunes ( $r^2 = -0.968$ ) et dans les cladodes âgées ( $r^2 = -0.948$ ) montrent que l'augmentation de cette dernière correspond à une diminution de la teneur en chlorophylle. Ces corrélations confirment l'étroite relation qui existe entre la diminution de la teneur en chlorophylle et l'accumulation des sucres solubles totale chez les plants stressés à 200 mM NaCl.

Sous stress salin modéré (400 mM NaCl), les résultats montrent que les teneurs en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant suivi par la teneur en chlorophylle totale des cladodes âgées. En effet, c'est l'espèce *O. engelmannii* var. *longuiformis* qui semble être la moins affectée par le sel, avec une réduction de 4.9 %. Une forte corrélation négative a été révélée pour la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes avec la teneur en sucres solubles totale dans les cladodes jeunes ( $r^2 = -0.971$ ). Ainsi une forte corrélation positive a été révélée entre la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes jeune et la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes âgées

( $r^2 = 0.999$ ). Ces corrélations montrent que les teneurs en chlorophylle totale dans les cladodes jeunes et âgées, traduisant l'étroite relation qui existe entre ces deux paramètres.

Sous stress sévère (600 mM NaCl), l'analyse de la variance révèle l'existence de différence significative entre les différentes espèces. Les résultats montrent que les teneurs en chlorophylle « a » dans les cladodes jeunes est le paramètre le plus discriminant suivi par la teneur en chlorophylle « a » des cladodes âgées. En effet, c'est l'espèce *O. engelmannii* qui semble être la moins affecté par le sel, avec une réduction de 28.57 % suivie par l'*Opuntia streptacantha* avec une réduction de 32.5 %.

Une forte corrélation positive a été révélée pour ce paramètre avec la teneur en chlorophylle totale dans les cladodes âgées ( $r^2 = 1$ ). Par contre, de forte corrélation négative a été révélée pour ce paramètre et la teneur en proline dans les cladodes jeunes ( $r^2 = -0.999$ ). Ces corrélations montrent que l'abaissement de la teneur en chlorophylle « a » dans les cladodes jeunes chez les espèces stressées par le niveau de chlorure de sodium le plus sévère est associé à une accumulation concomitante de proline dans les cladodes jeunes.

La diminution des teneurs en chlorophylle totale, « a » et « b » sous l'effet du stress salin a été rapportée dans la littérature par plusieurs auteurs chez différentes espèces végétales, notamment chez l'*Opuntia ficus indica* [153], *Echinopsis calochlora* [147], *Vigna subterranean* (L.) [172], *Atriplex halimus* (L.) [158].

Les résultats de notre travail montre que les paramètres les plus discriminants sont d'ordre physiologique et biochimique qui sont les teneurs en chlorophylle (totale et « a »), les teneurs en sucres solubles totale dans les cladodes jeunes et âgées et la teneur en proline au niveau des cladodes jeunes. Les paramètres physiologiques, est plus importante vu leur importance autant que marqueurs physiologiques de sélection et leur utilisation dans le criblage des génotypes adaptés aux conditions du milieu. A l'échelle cellulaire, l'effet du stress salin sur les fonctions physiologiques et métaboliques des plantes d'*Opuntia* se traduit par une baisse significative de la teneur en chlorophylle, chez l'ensemble des espèces étudiées. Cette baisse est d'autant plus importante que l'intensité du stress est plus accentuée. Les réductions des teneurs en chlorophylle totale et « a » observées chez nos

espèces stressées pourraient être dues à l'effet inhibiteur des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sur la structure des chloroplastes et par conséquent sur la synthèse des différents pigments [173]. YEO et al., (1990), ajoute que ces réductions pourraient être dues à l'instabilité du complexe protéique, du fait que la salinité affecte les forces de liaisons du complexe protéines-pigment [174]. Ces réductions en chlorophylle de nos espèces, peuvent trouver également son explication dans l'augmentation de l'activité de chlorophyllase [175] et/ou dans la détérioration de la membrane thylacoïdale, lié à un changement de la composition ionique de l'espace stromatique [176, 173]. La présence de sel dans le milieu peut également augmenter le taux de production de l'éthylène inhibant ainsi la biosynthèse de pigments chlorophylliens [177]. En effet, en présence de forte concentration de sel, des symptômes de jaunissement, de chlorose et de nécrose allant jusqu'à la mort des cladodes âgés et jeunes ont été observées chez l'*O. robusta* sous stress faible, modérée et sévère et l'*O. amyoclea* sous stress sévère. Ce jaunissement résulte des dommages causés sur des pigments chlorophylliens entraînant la diminution des teneurs en pigments [178].

Des précédents résultats, nous avons constaté que parallèlement à la diminution des teneurs de pigment chlorophyllien total, « *a* » et « *b* » des augmentations des teneurs en sucres solubles et de proline dans les différents organes (racines, cladode âgée et jeune), a été remarquée sous l'effet du stress salin. Ceci est confirmé par des corrélations négatives et significatives obtenues chez les espèces étudiées. Ces résultats suggèrent l'existence d'une connexion entre les voies de synthèse de pigment chlorophyllien et ces composés organiques « sucres solubles, proline ». Une compétition entre la synthèse de pigment chlorophyllien et la proline sur leurs précurseurs communs, le glutamate, peut être à l'origine de cette évolution [179].

Il semble aussi exister une certaine proportionnalité entre les teneurs en proline accumulées et celles des sucres solubles. L'espèce d'*Opuntia* qui accumule plus de composé azoté est aussi celle qui connaît la plus forte accumulation des composés carbonyles et vice versa. Donc, l'accumulation des teneurs en proline, sous stress salin, est proportionnelle à l'accumulation des teneurs en sucres solubles. Ces résultats traduisent l'existence d'une connexion entre la voie de la biosynthèse de la proline et l'accumulation des sucres solubles. D'une façon générale, ils pourraient fournir les précurseurs carbonés et l'énergie chimique nécessaire à la synthèse de la proline. L' $\alpha$ -cétoglutarate, intermédiaire

de la voie respiratoire lors de l'oxydation du glucose, joue un rôle particulièrement important comme accepteur de groupement aminé de la glutamine, pour la conversion en glutamate. Celui-ci est le précurseur principal de la proline lors d'une situation de stress [180].

La caractérisation biochimique des plantes d'*Opuntia* permet de distinguer les plantes les plus tolérantes à la salinité. Ainsi, pour garder le potentiel de turgescence aussi élevé que possible, les espèces d'*Opuntia* étudiées ont accumulé certains osmoticums à l'intérieur de leurs cellules dont la proline et les sucres.

Les résultats montrent que les composés glucidiques évoluent dans tous les organes de la plante avec le niveau du stress salin par rapport aux plantes témoins. En effet, nous remarquons que les composés glucidiques se concentrent plus dans les cladodes âgés et jeunes que dans les racines aussi bien chez les plantes témoins que celles traitées aux différents niveaux de NaCl (200 mM, 400 mM, 600 Mm NaCl). Sous stress salin sévère (600 Mm NaCl), *O. engelmannii* a accumulé la plus forte teneur en sucres solubles dans les cladodes jeunes que l'*O. streptacantha* et l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, ce qui semble confirmer du point de vue tolérance, la supériorité de l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* par rapport aux deux autres.

En effet, les sucres solubles pourraient contribuer à plus de 50 % à l'ajustement osmotique des plantes soumises aux conditions de salinité [181]. Ils participent au maintien de la balance de la force osmotique pour garder la turgescence et le volume cytosolique aussi élevés que possible [182]. Ils permettent également une préservation de l'intégrité membranaire dans les organes desséchés ainsi qu'une protection des protéines [183]. L'accumulation des sucres semble induire la gélification du contenu cellulaire en saturant le milieu intracellulaire ; ce phénomène permettant d'éviter la cristallisation des molécules contenues dans la cellule et donc limite les dommages au niveau des structures cellulaires [184]. L'accumulation des sucres solubles sous l'effet du stress salin serait due, selon certains auteurs à une modification d'activités enzymatiques liées au métabolisme glucidique. Ainsi, UDOMCHALOTHORN et al., (2009) observent chez les plantes de riz soumises à un stress une diminution de l'activité du fructose 2-6-biphosphate (F26BP), conduisant à une accumulation de saccharose et contribuant ainsi à l'augmentation de la

tolérance au sel chez certaines variétés en augmentant l'osmolarité interne des cellules et les réserves disponibles en carbone [185]. Cet élément est considéré comme un marqueur biochimique du degré de tolérance et par conséquent pourrait être utilisé dans les programmes de sélection.

La proline augmente de teneur dans tous les organes de la plante en fonction de l'augmentation de la salinité. Les cladodes âgés et jeunes sont plus riches en proline que les racines aussi bien dans les plantes témoins que celles traitées aux différents niveaux de NaCl (200, 400, 600 mM NaCl). Les teneurs maximales en proline dans les cladodes jeunes sont accumulés en présence d'un stress salin sévère (600 mM NaCl). L'*O. engelmannii* var. *longuiformis* a accumulé la plus forte teneur en proline que l'*O. streptacantha* et l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, ce qui semble confirmer du point de vue tolérance, la supériorité de l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* par rapport aux deux autres.

De nombreux travaux rapportent que la proline s'accumule dans la plante lorsqu'elle se trouve en conditions défavorables [186], ce qui traduit le caractère de la résistance aux stress [187, 181]. Par contre chez les plantes sensibles, la présence de cet acide aminé est moindre [188]. L'accumulation de la proline n'est pas une conséquence de stress salin mais plutôt elle est métabolisée comme facteur de tolérance. ORTEGA et al., (2008) ont constaté dans leur étude de l'*O. streptacantha* soumise au 150 mM NaCl durant 20 jours, que le stress entraîne la synthèse de l'ABA, qui induit l'augmentation de l'expression de gène *P5CS*, responsable de la synthèse de delta-1-pyrroline-5- carboxylate-synthétase, une enzyme régulatrice clé impliqué dans la biosynthèse de la proline [189]. L'accumulation de la proline serait impliquée dans les mécanismes de l'ajustement osmotique et servirait aussi comme osmo-protecteur. De ce fait, ce paramètre pourrait servir comme marqueur d'ordre biochimique de sélection pour les espèces étudiées.

En prenant en considération tous les résultats obtenus pour les différents paramètres, l'ACP et la CAH nous permettent de déceler trois différents groupes en fonction de leurs réponses aux différents niveaux de stress. La classification doit considérer chaque niveau de stress séparément. Les résultats obtenus suivant cette stratégie montrent que sous stress faible et modéré la majorité des génotypes sont résistants, alors que sous stress sévère, 3 classes peuvent être distinguées :



Sous stress salin faible (200 mM NaCl) :

Groupe1 : *O. engelmannii* var. *longuiformis* espèce très résistante au sel,

Groupe 2 : *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* et *O. amycleae* des espèces résistantes,

Groupe3 : *O. streptacantha* qui est moyennement résistante au premier niveau du stress.

Sous stress salin modéré (400 mM NaCl) :

Groupe1 : *O. engelmannii* var. *longuiformis* espèce tres résistante au sel,

Groupe 2 : *O. streptacantha* qui est résistante,

Groupe 3 : *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* et *O. amycleae* des espèces moyennement resistente.

Sous stress sévère (600 mM NaCl) :

Groupe1 : *O. engelmannii* var. *longuiformis* espèce hautement tolérante au sel

Groupe 2 : *O. streptacantha* espèce tolérante

Groupe 3 : *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* moyennement tolérante au sel.

En effet, l'*O. engelmannii* présente des teneurs en pigments chlorophylliens (total, *a*, *b*) moins affectés par le sel, des teneurs en sucres solubles totale et en proline plus élevée, suivi par l'*O. streptacantha*. De ce fait, ces critères aisés à exploiter pourront servir de critère de sélection pour la tolérance au sel chez les différentes espèces du genre *Opuntia*.

L'utilisation des techniques de marquage d'ADN est une voie intéressante permettant d'accélérer et de faciliter l'exploitation de la richesse génétique. Cela fera l'objet du prochain chapitre, qui révélera à travers l'utilisation de marquage par RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) lié à la résistance au stress salin chez les cinq espèces d'*Opuntia* analysées précédemment.

### **Partie 3 : Analyse de la diversité génétique et des variations épi-génétiques chez différentes espèces d'*Opuntia* par les marqueurs moléculaires RAPD en réponse à la salinité.**

Dans ce chapitre, 5 génotypes d'*Opuntia* soumis aux quatre niveaux de NaCl (0, 200 mM, 400 mM et 600 mM) ont été discriminés à l'aide de marqueurs dominants type RAPD dans le but d'analyser la tolérance à la salinité et de positionner génétiquement les témoins par rapport aux espèces stressantes.

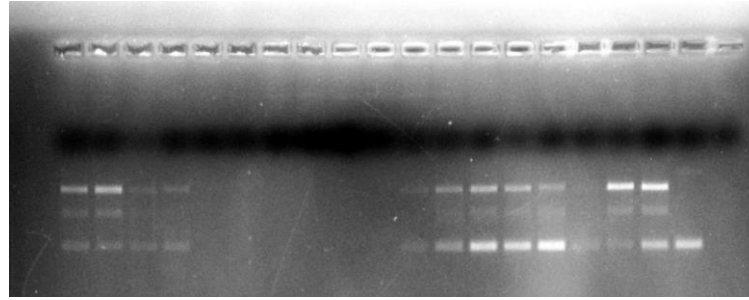
#### **4.3.1 Sélection des amorces**

Un lot de 11 amorces a été testé sur 2 génotypes appartenant au genre *Opuntia* (*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, *O. engelmannii* var. *longuiformis*). Seules les amorces dont les profils générés sont reproductibles, stables et présentant un degré de polymorphisme élevé ont été retenues.

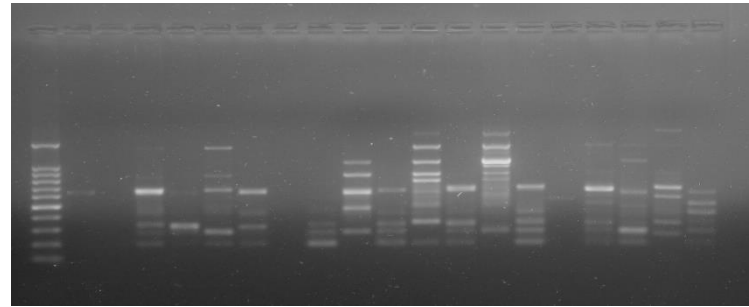
Comme le montre la figure 4.39, certaines amorces ont généré des bandes intenses, polymorphes et reproductibles (UBC-226, UBC-231, UBC-241). D'autres amorces ont généré des bandes monomorphes (incapables d'expliquer la diversité), tel est le cas des amorces UBC-227 et UBC-248. Celles-ci n'ont pas été retenues (Figure 4.39).

Par ailleurs, quelques amorces n'ont pas été fonctionnelles. Dans la bibliographie, il a été mentionné que certaines amorces sont incapables d'amplifier l'ADN ou de produire des profils exploitables [190].

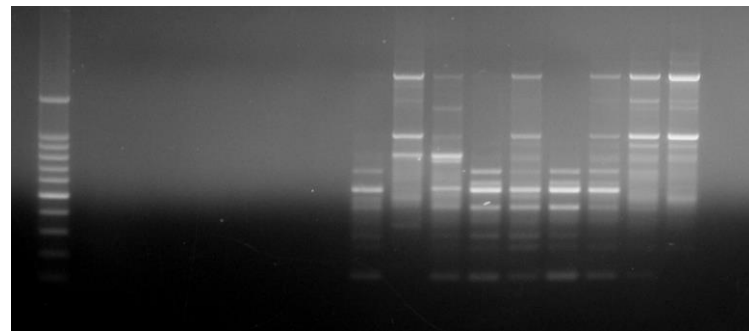
A la lumière de toutes ces considérations, 3 amorces parmi 11 ont été retenues pour leur capacité d'amplification et de polymorphisme (Tableau 4.12).



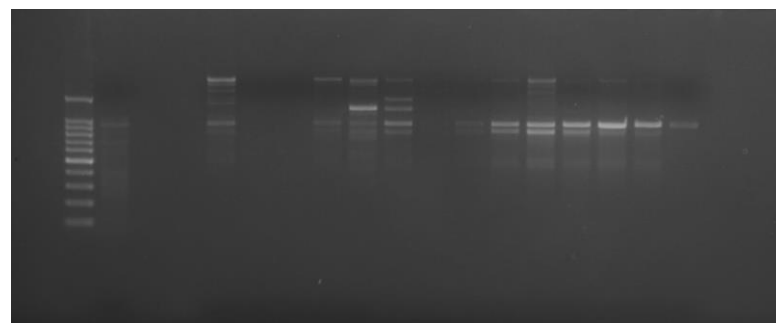
UBC 248



UBC 226



UBC 231



UBC 241

**Figure 4.39** : Sélection des amorces RAPD à partir de 16 génotypes d'*Opuntia*

**Tableau 4.12:** Liste des amorces RAPD utilisées et qualité de leurs produits d'amplification

N°	Amorce	Séquence de 5' à 3'	Qualité de l'amplification
1	UBC-226	GGGCCTCTAT	amplification très bonne et bandes polymorphes (retenue)
2	UBC-241	GCCCGACGCG	amplification très bonne et bandes polymorphes (retenue)
3	UBC-231	AGGGAGTTCC	amplification très bonne et bandes polymorphes (retenue)
4	UBC-232	CGGTGACATC	amplification faible et bandes monomorphes (éliminée)
5	UBC-212	GCTGCGTGAC	amplification faible et bandes monomorphes (éliminée)
6	UBC-238	CTGTCCAGCA	amplification faible et bandes monomorphes (éliminée)
7	UBC-227	CTAGAGGTCC	amplification faible et bandes monomorphes (éliminée)
8	UBC -261	CTGGCGTGAC	amplification faible et bandes monomorphes (éliminée)
9	UBC-246	TATGGTCCGG	amplification faible et bandes monomorphes (éliminée)
10	UBC-248	GAGTAAGCGC	amplification faible et bandes monomorphes (éliminée)
11	UBC-243	GGGTGAACCG	amplification faible et bandes monomorphes (éliminée)

### **4.3.2 Polymorphisme génétique liés aux marqueurs RAPD**

Un total de 16 plants stressés à différentes concentrations de NaCl a été génotypé à l'aide de 3 amorces RAPD qui ont été préalablement sélectionnées parmi 11 pour leur capacité d'amplification et de polymorphisme.

La figure 4.39 présente les profils d'amplification générés respectivement par les amorces : UBC-226, UBC-231, UBC-241.

Comme le montre la figure 4.40, les amorces utilisées ont généré des profils multi-bandes chez la totalité des génotypes, avec de nombreux marqueurs polymorphes.

Les amorces sélectionnées ont généré un total de 58 bandes, soit 19.66 bandes par amorce. Cette moyenne est largement supérieure à celles publiées par [114, 191, 112, 115], qui ont été de l'ordre de 8.26, 4.6, 9.33 et 7.66 bandes par amorce, respectivement.

Les bandes monomorphes ont été exclues et seules les bandes polymorphes ont été comptabilisées. Dans notre cas, presque la totalité des bandes générées sont polymorphes, soit en moyenne 19 marqueurs polymorphes par amorce (Tableau 4.13). Cette moyenne est amplement supérieure à celles publiées par [114, 112, 115, 120, 192, 106, 107] dont la moyenne de marqueurs polymorphes par amorce ont été respectivement de l'ordre de 4.87, 6.8, 6.83, 5.14, 13.7, 8.3, 6.22 et 18.

Le polymorphisme moyen des trois amorces est de 97.91 %, avec les amorces UBC-226 et UBC-231 présentant les degrés de polymorphisme sont les plus élevés (100 %).

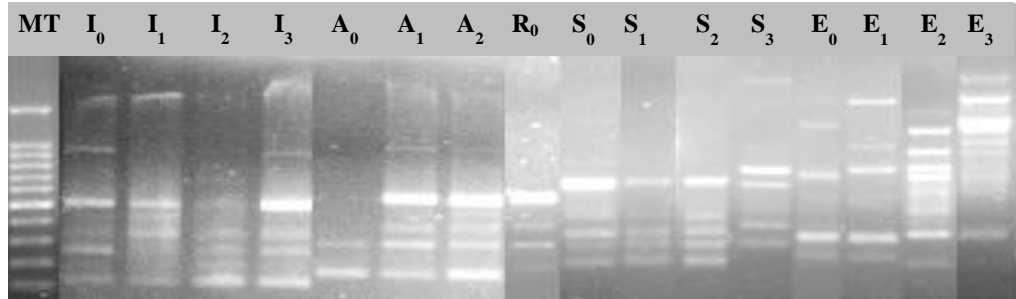
Les différentes amorces ont produit un nombre de bandes allant de 16 à 23, et un total de 58 dont la taille vari entre 100 pb et 4000 pb (Tableau 4.13).

L'*O. engelmannii* var. *longuiformis* stressé a 600 mM NaCl présente le nombre de bandes le plus élevé de 30 bandes dont 29 sont polymorphes, l'*O. amycleae* non stressée (témoin) révèle seulement 7 bandes dont 6 sont polymorphes. Quant aux autres espèces non stressées et stressées à différents niveaux de NaCl, elles présentent un nombre de bandes intermédiaire (Tableau 4.13). D'autre part, 42 profils électrophorétiques distincts ont été observés, témoignant ainsi d'un haut niveau de variabilité génétique, au niveau des différentes espèces étudiées.

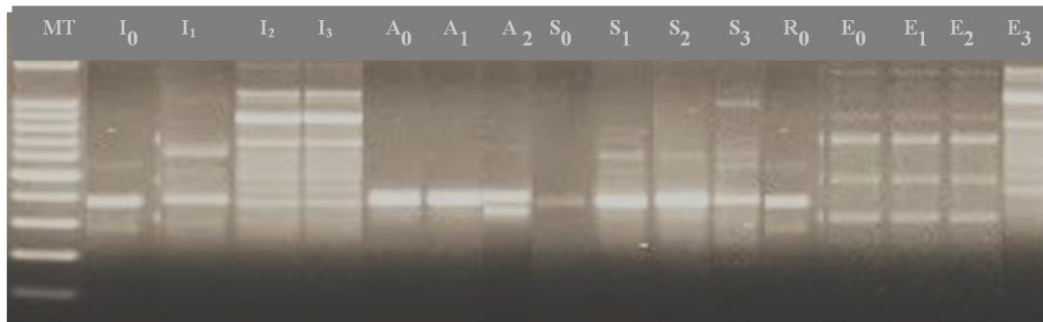
Pour toutes les amorces, les valeurs du pouvoir de résolution (Rp) ont varié de 8.5 pour l'amorce UBC-241 à 13 pour l'amorce UBC-226. Ces valeurs témoignent d'une haute résolution des amorces utilisées avec une valeur totale de Rp égale à 31.375 et une moyenne de 10.45 (Tableau 4.13). Cette moyenne est largement supérieure à celle publiées par [112, 114, 115], qui ont été de 4.02, 1.94 et 2.77 bandes par amorce.

L'amorce UBC-226 a été la plus discriminatoire avec la valeur la plus élevée de Rp (13), le nombre de marqueurs polymorphes le plus élevé et un nombre considérable de profils électrophorétiques (14). Cette amorce est d'un grand intérêt dans l'étude du polymorphisme génétique chez les 5 espèces d'*Opuntia* en fonction de la salinité.

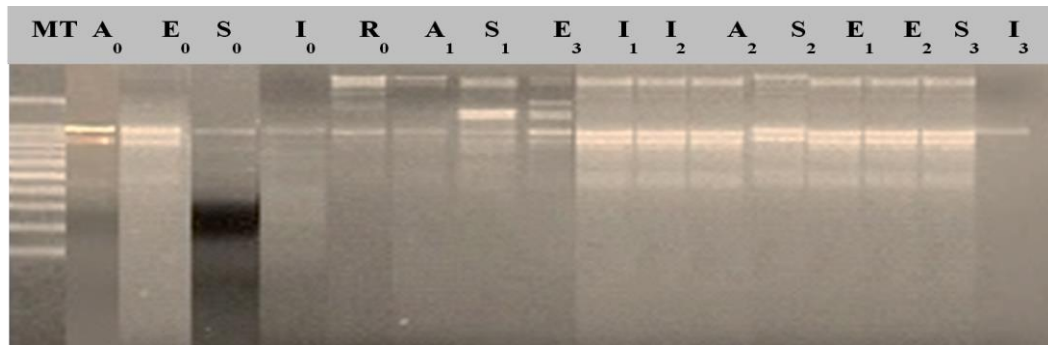
Dans l'ordre du pouvoir de discrimination, l'amorce UBC-226 (Rp= 13) a été la plus discriminatoire.



### UBC 226



### UBC 231



### UBC 241

**Figure 4.40 :** Fragments d'amplification générée par les amorces UBC-226, UBC-231, UBC-241 chez 5 espèces d'*Opuntia* stressées aux différents niveaux de NaCl. M : marqueur de taille 100 pb.

**Tableau 4.13 :** Polymorphisme génétique généré à l'aide de 3 amorces RAPD chez les espèces d'*Opuntia* stressées à différents niveaux de NaCl.

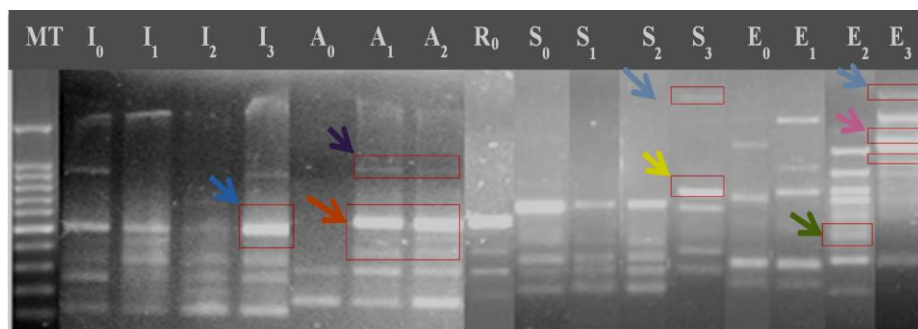
<b>N°</b>	<b>Amorce</b>	<b>Fenêtre de taille</b>	<b>Total de bande</b>	<b>Bandes polymorphes</b>	<b>Pouvoir de résolution (Rp)</b>	<b>Profil électrophorétique</b>	<b>Degré de polymorphisme (%)</b>
<b>1</b>	UBC-226	180-3100	23	23	13	14	100
<b>2</b>	UBC-231	100-4000	19	19	9.875	14	100
<b>3</b>	UBC-241	200-1400	16	15	8.5	14	93.75
<b>Total</b>	3		58	57	31.375	42	293.75
<b>Moyenne</b>			19.33	19	10.45	14	97.91



### 4.3.3 Caractérisation des fragments par amorces

#### 4.3.3.1 Amorce UBC-226

L'amorce UBC-226 présente 23 fragments avec des tailles différentes variant de 180 pb à 1600 pb. Cette amorce ne donne aucune bande commune pour l'ensemble des génotypes testés. Les 23 bandes sont hautement polymorphes (100 % polymorphisme) (Figure 4.41).



**Figure 4.41:** Fragments spécifiques générés par l'amorce UBC-226 chez 5 espèces d'*Opuntia* stressées à différents niveaux de NaCl. (200 mM, 400 mM, 600 mM).

(les bandes spécifiques : → (550 pb), → (500 pb), → (1000 pb), → (620pb), → (1600pb), → (380pb), → (1200))

«**I<sub>0</sub>, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>** : *O. ficus indica* Mill f. *inermis* sans stress et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ; **A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>** : *O. amycleae* non stressé et sous stress 200 et 400 mM NaCl ; **S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>** : *O. streptacantha* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ; **R<sub>0</sub>** : *O. robusta* var. *robusta* non stressé ; **E<sub>0</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>** : *O. engelmannii* var. *longuiformis* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl»

L'*Opuntia amycleae* non stressé (Figure 4.41) semble être séparé du reste par l'absence de la majorité des bandes. Celle-ci présente, deux bandes uniques de 180 pb et 280 pb, qui sont polymorphes.

L'*O. amycleae* sous stress faible et modéré donne 5 bandes. Toutes ces bandes sont polymorphes de taille de 180 pb, 280 pb, 380 pb, 500 pb et 1000 pb. Deux bandes sont

spécifiques dont le poids moléculaire de 500 pb, et 1000 pb sous stress faible et modérée (Figure 4.41).

L'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* non stressée, sous stress faible et modéré donne 8 bandes, toutes ces bandes sont polymorphes. Sous stress sévère, l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* montre 9 bandes polymorphes, avec une bande spécifique de 550 pb.

L'*O. streptacantha* non stressé et sous stress salin faible, modéré et sévère donne 5 bandes, toutes ces bandes sont polymorphes. Sous stress le plus sévère l'*O. streptacantha* montre deux bandes spécifique dont la taille varie de 620 pb et 1600 pb.

L'*O. robusta* var. *robusta* non stressée montre 3 bandes, toutes ces bandes sont polymorphes.

L'*O. engelmannii* var. *longuiformis* non stressée et sous stress faible donne 4 bandes, toutes ces bandes sont polymorphes de 200 pb, 280 pb, 640 pb, et 1000 pb.

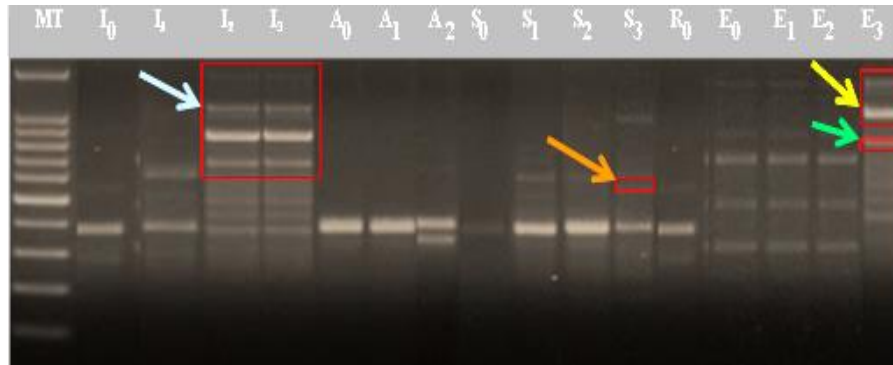
L'*O. engelmannii* var. *longuiformis* sous stress salin modéré et sévère enregistre le nombre le plus élevé de bandes soit 10, toutes ces bandes sont polymorphes, avec l'apparition d'une nouvelle bande de 380 pb sous stress modérée et deux nouvelles bandes sous stress sévère dont le poids moléculaire de 1200 pb et 1600 pb.

#### **4.3.3.2 Amorces UBC-231**

L'amorce UBC-231 présente 19 fragments avec des tailles variant de 200 pb à 1400 pb. Cette amorce ne donne aucune bande commune pour l'ensemble des génotypes testés. Les 19 bandes sont hautement polymorphes (100 %) (Figure 4.42).

L'*O. streptacantha* non stressée et l'*O. amyctae* non stressé et sous stress salin faible donnent une bande, avec le poids moléculaire de 380 pb (Figure 4.42).

L'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* sous stress modérée et sévère donne 7 bandes qui sont polymorphes avec les poids moléculaires 380 pb, 420 pb, 500 pb, 700pb, 900 pb et 1100 pb, 1400 pb. Cette espèce montre quatre bandes spécifiques dont le poids moléculaire de 700 pb, 900 pb, 1100 pb, 1400 pb (Figure 4.42).



**Figure 4.42:** Fragments spécifiques générés par l'amorce UBC-231 chez 5 espèces d'*Opuntia* stressées à différents niveaux de NaCl (200 mM, 400 mM, 600 mM).

Les bandes spécifiques : → (700 pb, 900pb, 1100pb, 1400pb), → (620 pb), → (800 pb), → (1200pb)

«**I<sub>0</sub>, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>** : *O. ficus indica* Mill f. *inermis* sans stress et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ; **A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>** : *O. amyctrae* non stressé et sous stress 200 et 400 mM NaCl ; **S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>** : *O. streptacantha* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ; **R<sub>0</sub>** : *O. robusta* var. *robusta* non stressé ; **E<sub>0</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>** : *O. engelmannii* var. *longuiformis* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl»

L'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* sous stress faible et l'*O. streptacantha* sous stress salin faible et modéré donnent 4 bandes, toutes ces bandes sont polymorphes (Figure 4.42).

L'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* sans stress, l'*O. amyctrae* sous stress modéré et l'*O. robusta* var. *robusta* non stressée montrent 3 bandes et toutes ces bandes sont polymorphes (Figure 4.42).

L'*O. streptacantha* sous stress salin sévère montre 7 bandes, toutes ces bandes sont polymorphes et sont les suivantes : 200 pb, 380 pb, 620 pb, 700 pb, 800 pb, 1000 pb, 1100 pb. Cette espèce montre une bande spécifique de 620pb (Figure 4.42).

L'*O. engelmannii* var. *longuiformis* non stressée et sous stress faible et modéré donne 5 bandes, toutes ces bandes sont polymorphes (Figure 4.42).

L'*O. engelmannii* var. *longuiformis* sous stress salin sévère enregistre le nombre le plus élevé de bandes soit 8, toutes ces bandes sont polymorphes et de taille de 380 pb, 480 pb, 500 pb, 700 pb, 800 pb, 850 pb, 1200 pb et 1400 pb. Cette espèce montre deux bandes spécifiques avec les poids moléculaires de 800pb et 1200pb (Figure 4.42).

#### **4.3.3.3 Amorces UBC-241**

Pour l'amorce UBC-241, la taille des fragments générés est comprise entre 100 pb et 4000 pb avec un degré de polymorphisme de 93.75 % (Figure 4.43).

L'*Opuntia ficus indica* Mill. f. *inermis* sous stress salin sévère semble être séparé du reste par l'absence de la majorité des bandes et présente une bande unique de 1000 pb qui est monomorphe (Figure 4.43).

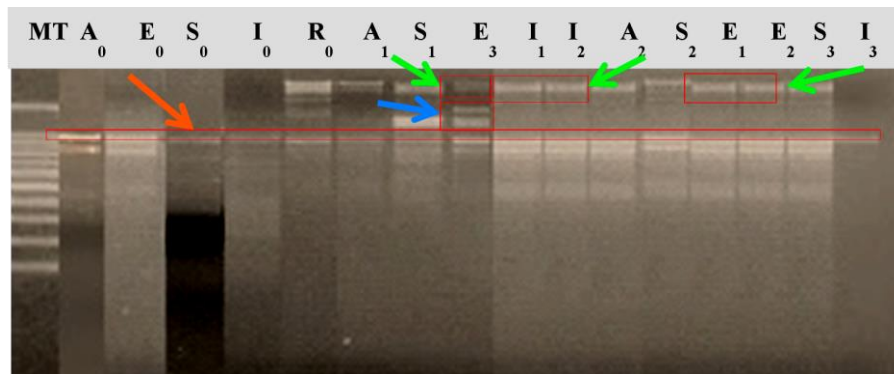
L'*Opuntia amyacleae* sous stress salin faible et modéré, l'*O. ficus indica* sous stress salin faible et modéré, l'*O. streptacantha* sous stress modéré et sévère, l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* sous stress faible et modéré donne 8 dont 7 sont polymorphes. L'*O. inermis* sous stress salin faible et modéré et l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* sous stress faible, modéré et sévère montrent deux bandes de taille de 3000 pb et 4000 pb (Figure 4.43).

L'*Opuntia ficus indica* non stressée et l'*O. streptacantha* sous stress salin faible, révèle les 6 bandes dont 5 sont polymorphes (Figure 4.43).

L'*O. engelmannii* var. *longuiformis* sous stress salin sévère révèle les 9 bandes dont 8 sont polymorphes. Cette espèce montre quatre bandes spécifiques des tailles de 1200 pb, 1400 pb, 3000 pb, 4000 pb (Figure 4.43).

L'*O. amycleae* non stressée, l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* non stressée et l'*O. streptacantha* non stressée donnent 4 bandes dont 3 sont polymorphes (Figure 4.43).

L'*O. robusta* var. *robusta* non stressée donne 8 bandes dont 7 sont polymorphes. (Figure 4.43).



**Figure 4.43 :** Fragments spécifiques générés par les amorces UBC-241 chez 5 espèces d'*Opuntia* stressées à différents niveaux de NaCl (200 mM, 400 mM, 600 mM).

→ (bande monomorphe 1000pb), → (1200, 1400pb) → (3000pb, 4000pb)

«**I<sub>0</sub>, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, I<sub>3</sub>** : *O. ficus indica* Mill f. *inermis* sans stress et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ; **A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>** : *O. amycleae* non stressé et sous stress 200 et 400 mM NaCl ; **S<sub>0</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>** : *O. streptacantha* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ; **R<sub>0</sub>** : *O. robusta* var. *robusta* non stressé ; **E<sub>0</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>** : *O. engelmannii* var. *longuiformis* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl»

#### **4.3.3.4 Certains fragments sont présents aussi bien chez les plantes témoins que chez celles qui sont stressées:**

Les bandes de taille de 180 pb, 200 pb, 280 pb, 380 pb, 400 pb, 500 pb, 1000 pb et 1600 pb caractérisent l'*O. ficus indica* non stressée et sous stress de 200 mM NaCl, 400 mM NaCl et 600 mM NaCl (Figures 4.41, 4.42, 4.43).

Chez l'*O. amycleae* non stressée et sous stress de 200 mM NaCl et 400 mM NaCl, les bandes 180 pb, 280 pb y sont communes. Idem pour l'*O. streptacantha* non stressé et

sous stress de 200 mM NaCl et 400 mM NaCl, où les bandes 200 pb et 280 pb y sont partagées.

Dans le cas d'*O. engelmannii* non stressée et sous stress de 200 mM NaCl, 400 mM NaCl et 600 mM NaCl, les bandes 480 pb, 700 pb et 1400 pb leurs sont communes.

#### **4.3.3.5 Certains fragments sont révélés que chez les témoins et disparaissent en cas de stress salin**

Certains fragments ne sont révélés que chez les témoins mais disparaissent en cas de stress salin c'est les cas de :

- des bandes de tailles de 180 pb et 280 pb chez l'*O. amycteleae*.
- des bandes de tailles de 380 pb, 800 pb chez l'*O. streptacantha* et chez l'*O. engelmannii*.

Il en découle de ces résultats que, chez les quatre espèces étudiées, nous avons remarqué la disparition de certains fragments en cas de stress salin; ces fragments pourraient être inhibés par le stress. Ces bandes pourraient être jugées comme marqueurs importants liés au stress salin et seraient donc importants dans les programmes de sélection par MAS (Marker Assisted Selection).

#### **4.3.3.6 De nouvelles bandes apparaissent chez les plantes stressées**

Chez l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* :

Deux nouveaux fragments de tailles de 3000 pb et 4000 pb apparaissent sous stress salin faible et modéré (200 mM et 400 mM NaCl) (Figures 4.41, 4.42, 4.43 ; tableau 4.14).

Quatre nouveaux fragments de tailles de 700 pb, 900 pb, 1100 pb, 1400 pb apparaissent sous stress modéré et sévère (400 et 600 mM NaCl).

Un nouveau fragment de taille de 550 pb a apparu sous stress salin sévère (600 mM NaCl). Ce fragment est considéré comme marqueur de tolérance à la salinité car il est révélé chez une espèce tolérante à la salinité à ce niveau de stress.

Chez l'*O. amycleae*:

Trois nouveaux fragments de tailles de 380 pb et 500 pb et 1000 pb apparaissent sous stress salin faible et modéré (200 et 400 mM de NaCl) (Figures 4.41, 4.42, 4.43 ; tableau 4.14).

Chez l'*O. streptacantha* :

Deux nouvelles bandes de tailles de 620 pb et 1600 pb sont présentes sous stress salin sévère (600 mM NaCl). Ces deux fragments sont considérés comme marqueurs de tolérance à la salinité car ils sont révélés chez une espèce tolérante à la salinité à ce niveau de stress.

Chez l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* :

Deux nouveaux fragments de tailles de 3000 pb et 4000 pb sont présents sous stress salin faible, modéré et sévère (200, 400 et 600 mM NaCl) (Figures 4.41, 4.42, 4.43 ; tableau 4.14).

Un nouveau fragment de taille de 380 pb est présent sous stress salin modéré et sévère (400 mM, 600 mM NaCl) (Figures 4.41, 4.42, 4.43 ; tableau 4.14).

Trois nouveaux fragments de taille de 800, 1200 pb et 1600 pb apparaissent sous stress sévère (600 mM NaCl) (Figures 4.41, 4.42, 4.43 ; tableau 4.14). Ces fragments pourraient être considérés comme marqueurs de tolérance à la salinité car ils sont révélés chez une espèce tolérante à la salinité à ce niveau de stress.

Au total 15 marqueurs sont induits par l'application du stress faible, modéré et sévère (200, 400 et 600 mM NaCl) (Tableau 4.14). Parmi ces 15 marqueurs, cinq sont induits par l'application du stress salin le plus sévère (600 mM NaCl) et qui sont absents chez les plantes témoins (plants non stressés) et chez celles qui sont stressées à des niveaux faible et modéré (200 mM et 400 mM NaCl). Parmi les cinq marqueurs spécifiques, trois de tailles de 800 pb, 1200 pb et 1600 pb apparaissent chez l'espèce la plus tolérante au stress le plus sévère qui est l'*O. engelmannii* var. *longuiformis*. deux marqueurs apparaissent chez l'*O. streptacantha* (620 pb et 1600 pb). Un marqueur a apparu chez l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* (550 pb).

**Tableau 4.14 :** Les marqueurs spécifiques induits par l'application du stress salin faible, modéré et sévère (200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl).

Espèce	NaCl	UBC-226	UBC-231	UBC-241
<i>O. ficus indica</i> Mill. f. <i>inermis</i>	200 mM	/	/	3000pb 4000pb
	400 mM	/	700pb 900pb	
	600 mM	550pb	1100pb 1400pb	/
<i>O. amygleae</i>	200 mM	380pb	/	/
	400 mM	500 pb 1000pb	/	/
<i>O. streptacantha</i>	200 mM	/	/	/
	400 mM	/	/	/
	600 mM	620pb 1600pb	620pb 1100pb	/
<i>O. engelmannii</i> var. <i>longuiformis</i>	200 mM	/	/	3000pb
	400 mM	380	/	4000pb
	600 mM	800pb	380pb	1200pb
		1200pb 1400pb 1600pb	800pb 1200pb 1400pb	1400pb 3000pb 4000pb

En bilan, l'investigation des variations épi-génétiques ont été effectuées en utilisant les amorces aléatoires UBC226, UBC231 et UBC241 qui ont généré 58 marqueurs polymorphes. Les résultats montrent que, par rapport aux plantes témoins, 15 marqueurs spécifiques sont détectés, qui peuvent être fortement impliqués dans les études de sélection assistée par marqueurs contre le stress salin chez le cactus. Par conséquent, le séquençage de l'ADN de ces marqueurs intéressants pourrait aider à identifier les gènes putatifs de résistance au sel et les procédures de transformation génétique faciliteront ensuite leur introgression chez l'*Opuntia* pour faire face à la salinisation du sol.



#### 4.3.4 Visualisation de la structuration phylogénétique

A partir des données du génotypage RAPD, la structuration phylogénétique des différentes espèces témoin et stressées a été établie en fonction de leurs distances génétiques calculées par paires de génotypes (Tableau 4.15).

**Tableau 4.15:** Distances génétiques calculées par paires de génotypes de cinq espèces d'*Opuntia* non stressées et stressées à trois niveaux de NaCl (200 mM, 400 mM et 600 mM) en utilisant 58 marqueurs RAPD

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	0.79														
3	0.76	0.84													
4	0.82	0.91	0.56												
5	0.80	0.88	0.65	0.76											
6	0.75	0.89	0.82	0.77	0.78										
7	0.72	0.83	0.73	0.77	0.75	0.64									
8	0.73	0.84	0.80	0.78	0.76	0.79	0.73								
9	0.81	0.84	0.71	0.81	0.79	0.82	0.79	0.88							
10	0.82	0.82	0.78	0.70	0.82	0.57	0.63	0.78	0.81						
11	0.68	0.82	0.73	0.79	0.71	0.64	0.40	0.69	0.76	0.58					
12	0.75	0.73	0.74	0.83	0.81	0.76	0.76	0.70	0.77	0.73	0.69				
13	0.84	0.81	0.80	0.83	0.86	0.84	0.84	0.83	0.71	0.84	0.76	0.79			
14	0.75	0.84	0.81	0.82	0.67	0.67	0.76	0.76	0.81	0.77	0.67	0.74	0.76		
15	0.74	0.84	0.69	0.73	0.79	0.68	0.75	0.78	0.73	0.72	0.68	0.62	0.69	0.72	
16	0.88	0.86	0.89	0.91	0.94	0.89	0.91	0.95	0.89	0.92	0.92	0.90	0.87	0.89	0.89

**1, 6, 10, 14:** *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* sans stress et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ;  
**2, 7, 11:** *O. amyycleae* non stressé et sous stress 200 et 400 mM NaCl ;  
**3, 8, 12, 15:** *O. streptacantha* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ;  
**4:** *O. robusta* var. *robusta* non stressé ;  
**5, 9, 13 16:** *O. engelmannii* var. *longuiformis* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl.

Comme le montre le Tableau 4.15, les distances génétiques ont varié entre 0.40 et 0.95, soit une moyenne de 0.675. A la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que les génotypes étudiés ont été différenciés au niveau de l'ADN. La plus faible distance a été observée entre l'*O. amyycleae* stressées à 200 mM NaCl et l'*O. amyycleae* stressées à 400 mM NaCl (DG = 0.40).

Par ailleurs, parmi les 120 valeurs de distances génétiques calculées par paires de génotypes, uniquement une valeur a été inférieure à 0.5 (Tableau 4.15). Ce résultat laisse croire à la singularité génétique de tous les génotypes étudiés. En outre, l'emploi de marqueurs RAPD n'a pas masqué l'appartenance de ces génotypes stressés à différentes espèces, d'où leur éloignement génétique.

Dans les analyses phylogénétiques, il a été communément publié sur ce genre d'éloignement génétique [107, 114, 106, 112, 115, 105] pour des individus appartenant à différentes espèces de genre *Opuntia* de la famille des Cactaceae.

#### **4.3.5 Analyse Factorielle de Correspondances**

L'Analyse AFC réalisée sur l'ensemble des données a montré une différenciation nette entre les génotypes d'*Opuntia* témoins et stressés (Figure 4.44).

L'examen de l'éclatement du nuage de points sur les axes 1 et 2 de l'AFC a montré un niveau de variabilité très important. En effet, tous les individus ont fui le centre du plot qui correspond au niveau de diversification le plus bas. Cette grande variabilité pourrait être attribuée à la nature des génotypes étudiés qui appartiennent à différentes espèces, stressées à différents niveaux de NaCl.

L'AFC, ainsi réalisée, fait apparaître 9 groupes (de A à I) (Figure 4.44) :

**Groupe A** : il est constitué par un seul individu: qui est *O. engelmannii* var. *longuiformis* sous le stress le plus sévère (600 mM NaCl).

**Groupe B** : comprend un seul génotype: *O. amycleae* non stressé.

**Groupe C** : comporte deux individus appartenant à la même espèce *O. engelmannii* sous deux niveaux de stress salin 200 mM et 400 mM NaCl.

**Groupe D** : comporte un seul individu : *O. streptacantha* non stressé (témoin)

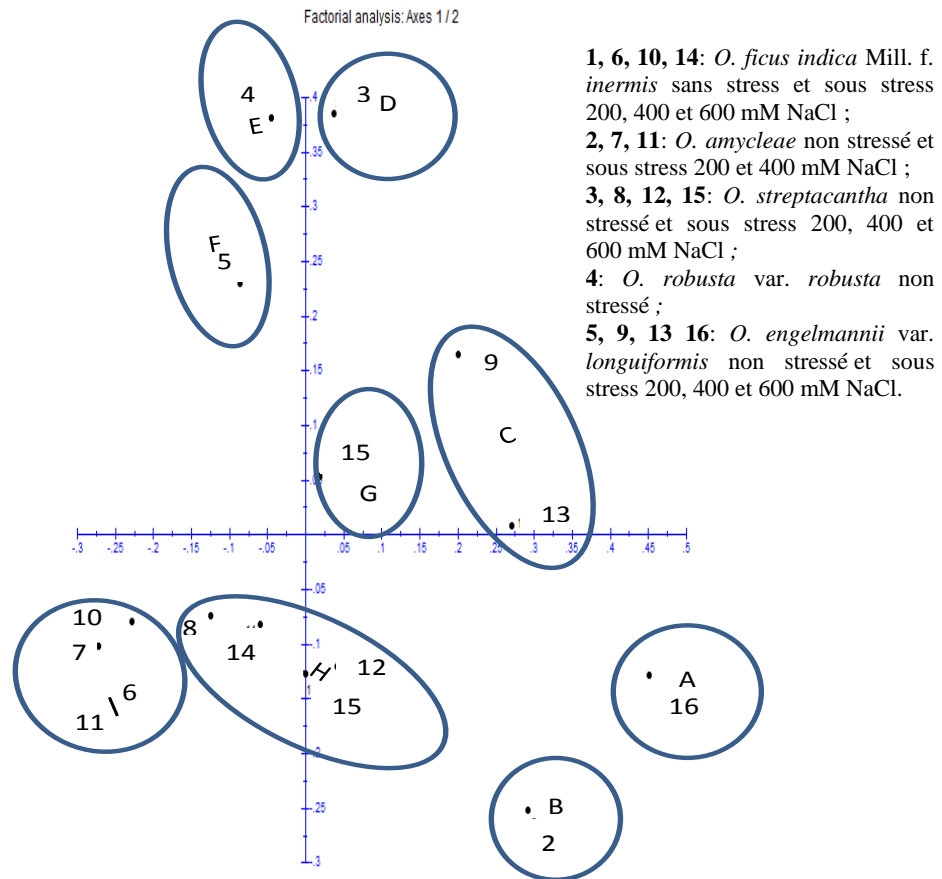
**Groupe E**: comporte un seul individu : *O. robusta* var. *robusta* non stressé (témoin).

**Groupe F** : comporte un seul individu : *O. engelmannii* var. *longuiformis* non stressé (témoin).

**Groupe G** : comporte un seul individu : *O. streptacantha* sous stress faible 200 mM NaCl.

**Groupe H** se compose de quatre individus appartenant à deux espèces : *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* sans stress et sous stress sévère, *O. streptacantha* sous stress faible et modéré (200 et 400 mM NaCl).

**Groupe I:** comporte deux espèces: *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* sous stress faible et modéré (200 et 400 mM NaCl), *O. amycleae* sous stress faible et modéré (200, 400 mM NaCl).



**Figure 4.44 :** AFC réalisée sur les données de génotypage à l'aide de 57 marqueurs RAPD chez 5 génotypes d'*Opuntia* stressés à différents niveaux de NaCl (200, 400 et 600 mM) en fonction des axes 1 et 2. De 1 à 16 : génotypes analysés

#### 4.3.6 Classification hiérarchique

Le dendrogramme individualisé fait apparaître presque le même schéma de clustérisation précédemment décrit sur l'AFC. En effet, 8 groupes ont été individualisés (Figure 4.45) :

**Groupe A :** Comporte un seul individu hautement tolérant à la salinité: *O. engelmannii* var. *longuiformis* sous le stress le plus sévère (600 mM NaCl) qui a été hautement différencié de tous les génotypes analysés (DG = 0.95).

**Groupe B :** Comporte un seul individu : *O. amyctae* sans stress salin (témoin) qui a été distant génétiquement (DG = 0.86).

**Groupe C :** Contient un seul individu tolérant à la salinité sous deux niveaux de stress salin: *O. engelmannii* var. *longuiformis* sous le premier et le deuxième niveau du stress salin (200 et 400 mM) avec DG=0.89 et DG=0.87 respectivement.

**Groupe D :** Il s'agit d'un groupe hétérogène rassemblant deux individus appartenant à deux espèces différentes: l'*O. streptacantha* et *O. robusta* var. *robusta* sans stress salin (témoin) avec DG=0.89.

**Groupe E :** Il s'agit d'un groupe hétérogène rassemblant deux individus appartenant à deux espèces: *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* sous stress sévère (600 mM) et *O. engelmannii* var. *longuiformis* sans stress avec DG=0.88.

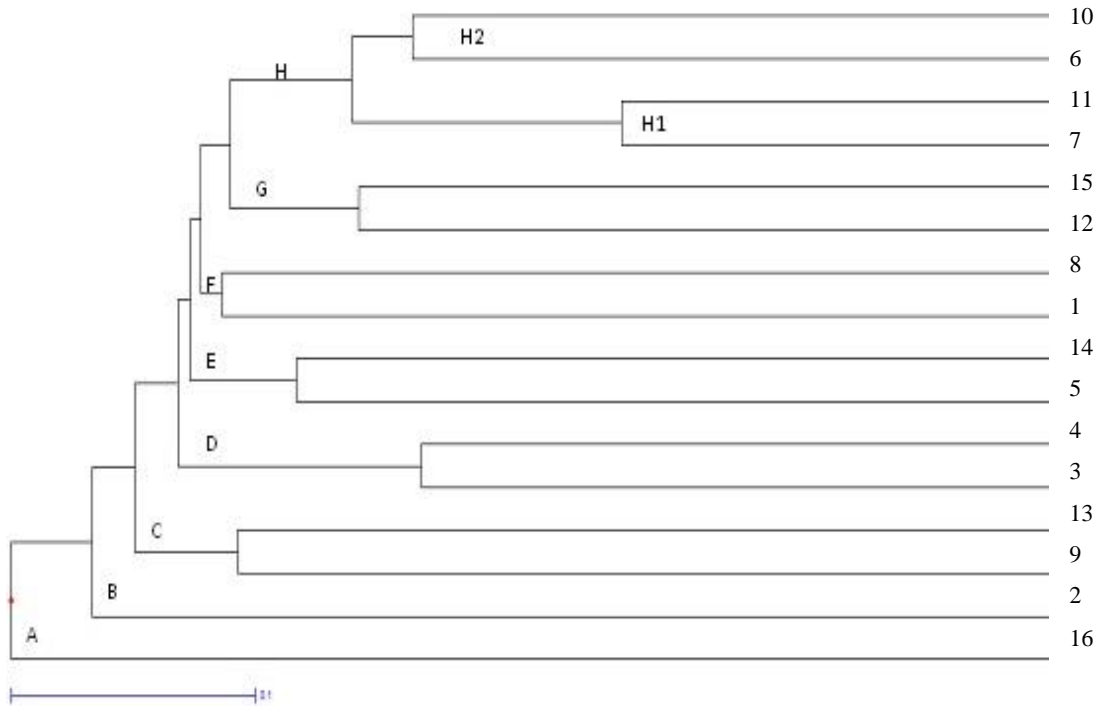
**Groupe F:** Il s'agit d'un groupe hétérogène rassemblant des individus appartenant à des espèces différentes: *O. streptacantha* stressé à 200 mM NaCl et *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* sans stress (témoin) avec DG=0.73.

**Groupe G:** Comprend 2 individus: *O. streptacantha* à deux niveaux de stress salin (400 et 600 mM NaCl) avec DG=0.62 et DG= respectivement. Cette espèce réagit de la même manière sous stress salin modérée et sévère.

**Groupe H:** représenté par l'*O. ficus indica* et l'*O. amyctae*, est divisé en deux unités :

**Unité H1 :** Comprend deux individus: *O. amyctae* sous deux niveaux de stress salin (200 mM et 400 mM NaCl) avec DG=0.40. Cette espèce réagit de la même manière sous stress salin faible et modéré.

**Unité H2 :** Est constituée de deux individus qui sont: *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* sous deux niveaux du stress salin (200mM et 400 mM NaCl) avec DG=0.89 et DG=0.57 respectivement. Cette espèce réagit de la même manière sous stress salin faible et modéré.

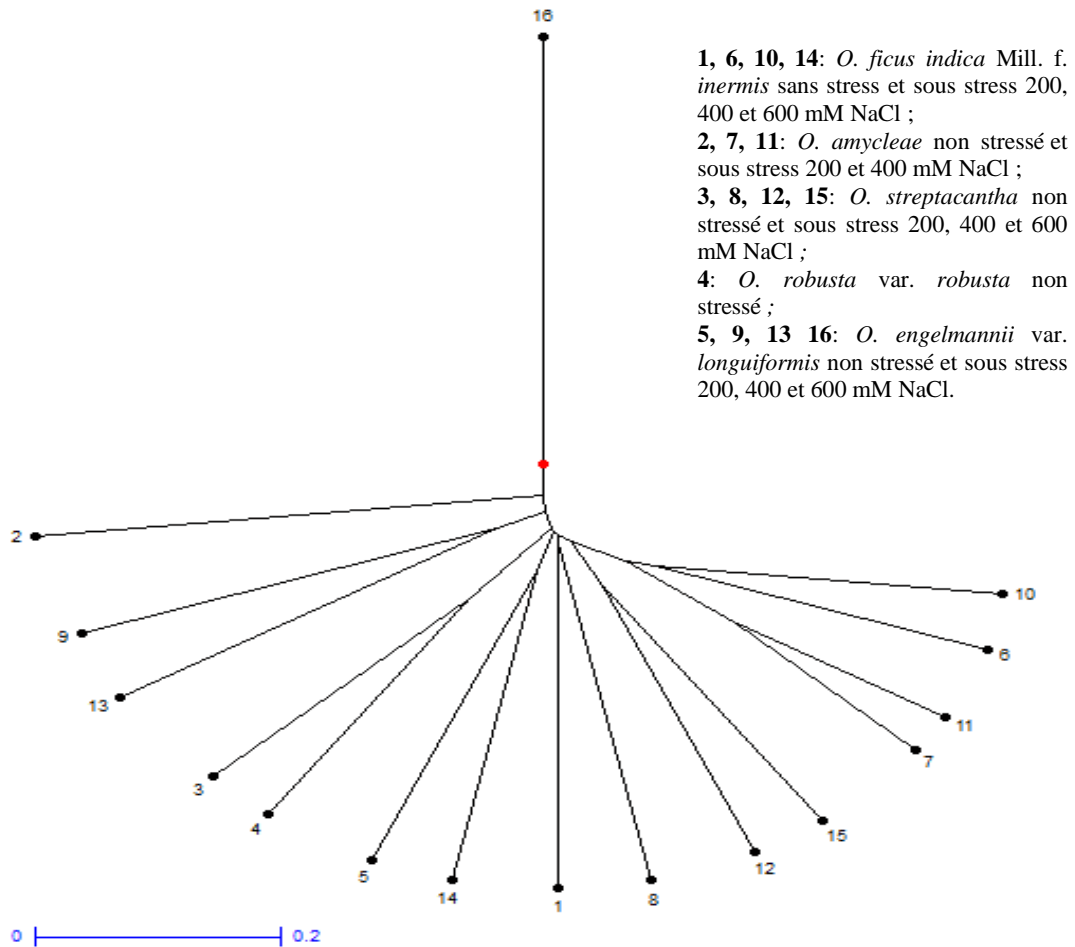


**Figure 4.45 :** Dendrogramme illustrant les relations phylogénétiques entre 5 espèces d'*Opuntia* non stressées et stressées (200, 400 et 600 mM NaCl) établies sur la base de 57 marqueurs RAPD. (De A à H : groupes et sous-groupes individualisés).

**1, 6, 10, 14 :** *O. ficus indica* Mill f. *inermis* sans stress et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ; **2, 7, 11** *O. amycleae* non stressé et sous stress 200 et 400 mM NaCl ; **3, 8, 12, 15 :** *O. streptacantha* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl ; **4 :** *O. robusta* var. *robusta* non stressé ; **5, 9, 13 16 :** *O. engelmannii* var. *longuiformis* non stressé et sous stress 200, 400 et 600 mM NaCl.

Afin de mieux visualiser la structuration génétique des différentes espèces d'*Opuntia* sous différents niveaux du stress salin, une clustérisation radiée a été effectuée en se basant sur la procédure du Neighbour Joining du logiciel Darwin (Figure 4.46).

La représentation ainsi effectuée a montré que l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* stressée à 600 mM NaCl (n° 16) a été strictement isolée de tous les génotypes étudiés.



**Figure 4. 46 :** Représentation radiée montrant la singularité d'*O. engelmannii* var. *longuiformis* stressé a 600 mM NaCl détectée sur la base de 57 marqueurs RAPD

En bilan, les résultats ont montré que les marqueurs RAPD ont permis une meilleure structuration phylogénétique des différentes espèces d'*Opuntia* soumises à différents niveaux de NaCl. En effet, les individus stressés et appartenant à la même espèce ont été mieux regroupés. Par ailleurs, le test de Mantel (MANTEL, 1967) a permis d'avoir une corrélation positive ( $r = 0.409$ ) entre les distances génétiques calculées sur la base de marqueurs RAPD. Ce qui signifie que cette technique utilisée serait suffisante pour l'analyse du polymorphisme génétique et pour la structuration phylogénétique en condition de stress salin.

#### **4.3.7 Discussion**

A partir des données du génotypage RAPD, la structuration phylogénétique des différents espèces témoins et stressées a été établie en fonction de leurs distances génétiques calculées par paires de génotypes. L'*O. engelmannii* var. *longuiformis* stressée à 600 mM NaCl a été la plus distante de tous les génotypes étudiés (DG = 0.95). Ces résultats soulignent bien la puissance des marqueurs RAPD. D'après les littérateurs, cette technique n'est pas limitée par le nombre d'amorces et permet d'identifier fréquemment le polymorphisme qui existe entre individus étudiés. Elle offre le moyen d'étudier la variabilité génétique au sein d'un complexe d'espèces, dans les populations naturelles d'une même espèce ou pour caractériser les différents génotypes [89, 194, 195].

Ainsi, l'analyse AFC réalisée sur l'ensemble des données a montré la nette discrimination de tous les génotypes. Par ailleurs, l'examen de l'éclatement du nuage de points sur les axes 1 et 2 de l'AFC a montré un niveau de variabilité très important. Cette grande variabilité pourrait être attribuée à la nature des génotypes étudiés qui appartiennent à différentes espèces et soumise aux différents niveaux du NaCl.

D'autre part, la classification hiérarchique et radiée fait apparaître presque le même schéma de clustérisation précédemment décrit sur l'AFC. En effet, la proximité génétique entre les génotypes partageant le même ancêtre commun a été également retrouvé sur les deux représentations. C'est le cas de l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* et l'*O. amyclae*. Toutefois, l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* stressé à 600 mM NaCl a été strictement isolée de tous les génotypes étudiés (Figure 4.16). Cet isolement est la conséquence d'une spécificité génotypique vis à vis de sa forte tolérance au NaCl. L'utilisation d'un nombre plus élevé de marqueurs RAPD pourrait aider à vérifier davantage cette distinction.

L'association entre les marqueurs RAPD et la tolérance au stress salin a été étudiée par de nombreux chercheurs. Dans cette étude, au total 15 marqueurs sont induit par l'application du stress faible, modéré et sévère (200 mM, 400 mM et 600 mM NaCl). Parmi ces 15 marqueurs cinq sont induits par l'application du stress salin sévère (600mM NaCl) et qui sont absents chez les plantes témoins et chez celles qui sont stressées par le

stress faible et modéré (200 mM et 400 mM NaCl). Parmi les cinq marqueurs spécifiques, trois dont le poids moléculaire de 800 et 1200 pb et 1600 pb sont présents chez l'espèce la plus tolérante au stress sévère qui est l'*O. engelmannii* var. *longuiformis*. Deux marqueurs apparaissent chez l'*O. streptacantha* dont le poids moléculaire de 620 pb et 1600 pb. Un marqueur apparu chez l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* de 550 pb.

Nos résultats montrent la synthèse de nouveaux fragments chez l'*Opuntia engelmannii* var. *longuiformis*, *Opuntia streptacantha* et *O. ficus indica* Mill. f. *inermis*. Ces nouveaux fragments induits par le NaCl ont une fonction directe dans l'augmentation de tolérance à la contrainte saline.

La différence d'accumulation des bandes entre les espèces peut résulter d'une différence dans la régulation du gène ou dans l'organisation du génome par la présence d'un nombre élevé de copie de ce gène [196].

On peut dire que chaque génotype a une tolérance au sel qui lui est propre et exprimée par les gènes qui le composent.

L'association entre les marqueurs RAPD et la tolérance au stress salin a été étudiée par de nombreux chercheurs. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude sont en accord avec ceux de DOGAN et al. (2012), qui ont rapporté que l'instabilité génétique induite par les plants du coton soumis au stress salin était reflétée par des changements dans les profils RAPD soit par la diminution ou l'augmentation de l'intensité des bandes, soit par la disparition des bandes et l'apparition de nouvelles bandes en comparaison avec le témoin [197]. On peut conclure qu'un nombre relativement élevé de bandes polymorphes a été retrouvé et pourraient être utilisés comme marqueurs. Un résultat similaire a également été rapporté par IQBAL et al. (2007) qui a souligné que l'analyse RAPD fournit une source riche de marqueurs spécifiques qui peuvent être utilisés pour caractériser et regrouper les génotypes de blé, ce qui sera utile dans les programmes de sélection du blé [198]. NAZARI et PAKNIYAT (2008) [199] ont détecté des marqueurs associés à la tolérance à la sécheresse dans les génotypes d'orge sauvages et cultivés à l'aide de marqueurs RAPD. KHAN et al. (2013) ont utilisé vingt amorces RAPD pour étudier la



variation génétique parmi dix génotypes de soja [200]. On conclut que les cultivars de soja les plus proches du groupe ont une similitude dans leur réponse à la tolérance à la salinité. Chez la tomate, FOOLAD et CHEN (1998) ont identifié les marqueurs RAPD associés aux loci quantitatifs (QTL) conférant une tolérance au sel pendant le stade de germination [201]. LEE et al. (2003) ont identifié deux marqueurs RAPD dans des lignées de riz tolérantes au sel [202]. RANIA et al. (2007) ont développé quatre marqueurs RAPD pour la tolérance au sel dans le sorgho [203] et ABDEL-TAWAB et al. (1997 et 1998) ont détecté un marqueur RAPD pour la tolérance au sel et trois pour la tolérance à la sécheresse chez le maïs [204, 205]. PAKNIYAT et al. (2004) ont introduit des marqueurs liés à la tolérance au sel dans l'orge cultivée et sauvage en utilisant RAPD-PCR [206]. BAHIELDIN et AHMED (1994) ont testé six cultivars d'orge avec 29 amorces RAPD et ont conclu que les marqueurs RAPD peuvent être utilisés comme marqueurs génétiques fiables pour l'analyse de la tolérance au sel [207]. Finalement, YANG et al. (2005) ont développé de nombreux marqueurs RAPD liés à la tolérance au sel dans une population de luzerne F2 [208].

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Chez le cactus, de nombreuses interrogations ont été soulevées quant à l'origine et la variabilité des différentes espèces, ainsi que sur la variabilité de réponse au stress abiotique notamment la salinité.

L'Algérie dispose d'un patrimoine de cactus comptant plusieurs espèces de cactus, qui se distingueraient par leur résistance aux conditions pédoclimatiques locales. Toutefois, pour ces espèces aucun travail de recensement, de caractérisation pour une meilleure gestion et utilisation de ces ressources n'a été effectué.

Dans le cadre de cette thèse et du programme d'amélioration et de conservation de ce patrimoine génétique et considérant l'importance des terres cultivées de cactus et de la variabilité des espèces locales, nous nous sommes proposés de caractériser différentes espèces d'*Opuntia* à l'aide de marqueurs morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires en conditions de stress salin.

Le recours à l'utilisation des marqueurs moléculaires a facilité la caractérisation génétique des différentes espèces de cactus mais d'analyser les variations épi-génétiques en conditions de stress salin et ce pour le développement de marqueurs génétiques qui pourraient être associés à la tolérance au sel.

Ces techniques nous ont en effet permis de développer les thèmes suivants :

- Chapitre 1 : Etude de l'effet du NaCl sur le comportement morpho-physiologique et biochimique de cinq espèces d'*Opuntia* et la recherche des marqueurs morphologiques, physiologiques et biochimiques de stress ;
- Chapitre 2 : Recherche des marqueurs de résistance au stress par l'intégration de 32 paramètres morpho-physiologiques et biochimiques et évaluation de la tolérance de cinq espèces d'*Opuntia* au stress salin ;

- chapitre 3 : Analyse de la diversité génétique et des variations épi-génétiques chez différentes espèces d'*Opuntia* par les marqueurs moléculaires RAPD en réponse à la salinité.

Les travaux présentés dans le premier chapitre repose sur des résultats clés qui ont permis de distinguer les marqueurs de la réponse au stress salin suivants :

- Le poids frais des cladodes jeunes admis comme marqueur morphologique,
- Les teneurs en chlorophylle totale et « *a* » au niveau des cladodes jeunes sont admis comme marqueurs physiologiques,
- La teneur en potassium dans les cladodes âgées et dans les cladodes jeunes. Ce paramètre admis comme marquer d'ordre nutritionnel du degré de tolérance a la salinité,
- La teneur relative en eau au niveau des cladodes âgées est le paramètre le plus discriminant, et considéré comme un marqueur de tolerance au stress salin,
- Teneur en sucres solubles totale au niveau des cladodes jeunes admis comme marqueur biochimique.

Par conséquent, ces paramètres sont très sensibles à la salinité et peuvent, servir comme marqueurs de tolérance ou de sensibilité à la salinité et pourraient être utilisés dans les programmes de sélection.

Dans le second chapitre, nous avons combiné 32 paramètres morpho-physiologiques et biochimiques analysés précédemment, pour sélectionner les paramètres les plus discriminants ou les marqueurs de la tolérance sous chaque niveau de stress salin et montré la variabilité de la réponse au sel des différentes espèces d'*Opuntia* étudiées.

En accord avec ce qui est trouvée à travers de cette expérience, on peut tirer la conclusion que parmi les 32 paramètres morpho-physiologiques et biochimiques analysés, les teneurs en chlorophylle totale, « *a* » et « *b* » des cladodes âgées et jeunes sont admis comme marqueurs physiologiques de tolérance à la salinité chez les différentes espèces d'*Opuntia*, suivi par la teneur en sucres solubles et la teneur en proline dans les différents organes.

Le comportement de tolérance à la salinité est donc, d'après notre étude, intimement lié au maintien de l'activité photosynthétique ainsi qu'à son aptitude à accumuler les sucres solubles et la proline au niveau de la partie aérienne (cladodes âgées et jeunes), et plus spécifiquement au niveau des cladodes jeunes.

En se basant sur les analyses des paramètres les plus discriminants, on conclut que l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* est l'espèce la plus tolérante au stress salin comparé avec les autres espèces, tandis que l'*O. ficus indica* et l'*O. streptacantha* ont été trouvée modérément tolérantes. L'*O. amycleae* sous stress salin sévère et l'*O. robusta* sous stress salin faible, modéré et sévère sont très sensible et cette forte sensibilité traduite par l'apparitions des symptômes de jaunissement, de chlorose et de nécrose allant jusqu'à la mort des cladodes âgées et jeunes.

Dans le troisième chapitre, nous avons montré que chez le cactus, les marqueurs RAPD sont des marqueurs de choix dans l'analyse de la diversité génétique et des variations épi-génétiques chez les différentes espèces d'*Opuntia* étudiées. En effet, ils ont permis une meilleure structuration phylogénétique des différentes espèces d'*Opuntia* soumises à différentes concentrations de NaCl. L'*O. engelmannii* var. *longuiformis* stressé à 600 mM NaCl a été strictement isolé de tous les géotypes étudiés. Cet isolement pourrait être est la conséquence d'une distinction génétique dictée par une tolérance à la salinité.

L'amorce UBC-226 a amplifié trois fragments spécifiques d'une taille de 800 pb, 1200 pb et 1600 pb apparaissent sous stress sévère (600 mM NaCl) chez l'*O. engelmannii* var. *longuiformis*. Ces fragments sont considérés comme des marqueurs de tolérance à la salinité car ils sont révélé chez une espèce hautement tolérante à la salinité à ce niveau de stress. Ces données sont en accord avec les marqueurs physiologiques et biochimiques trouvés précédemment, qui sont impliqués respectivement dans la variation des paramètres : teneur en chlorophylle (totale, « a » et « b ») dans les cladodes âgées et jeunes, teneurs en sucres solubles dans les cladodes âgées, jeunes et racines et la teneur en proline dans les différents organes (cladodes âgées, jeunes et racines). En effet, l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* présente des teneurs en pigments chlorophyllien (total, a, b) moins affecté par le sel, des teneurs en sucres solubles totale et en proline plus élevée dans

les différents organes, suivi par l'*O. streptacantha* et l'*O. ficus indica* Mill. f. *inermis* ce qui semble confirmé du point de vue tolérance, la supériorité de l'*O. engelmannii* var. *longuiformis* par rapport aux deux autres.

L'originalité de ces travaux, permettant l'évaluation de la diversité phénotypique et génétique d'*Opuntia*, constitue une valeur scientifique considérable et prometteuse. Cependant, l'ouverture de nouvelles perspectives, dans le but de rentabiliser davantage nos investigations, reste judicieuse:

1. Au total, les 15 marqueurs génétiques spécifiques détectés en conditions de stress salin pourraient être utilisés pour suivre la résistance au stress salin dans un programme de sélection assistée par marqueur (MAS) chez les différentes espèces du genre *Opuntia*.

2. Le séquençage d'ADN de ces marqueurs intéressants pourrait aider à identifier les patrons génétiques impliqués dans les variations des teneurs en chlorophylle, en sucres solubles et en proline sous stress salin, ainsi de classer ces marqueurs en mono- ou polygéniques (traits de tolérance à la salinité associés à un seul caractère ou plusieurs), et les procédures de transformation génétique qui faciliteront ensuite leurs introgression.

3. Enrichir les données de différentes espèces avec d'autres informations utiles telles que le polymorphisme des peroxydases ;

4. Nous envisageons d'approfondir l'étude de caractérisation génétique en utilisant les marqueurs SSR, SNP et le High throughput sequencing chez plusieurs espèces du genre *Opuntia* provenant de toutes les régions arides et semi-arides de l'Algérie afin d'accéder aux études de génétique d'association (moléculaire / physiologique / biochimique) ;

5. L'étude au niveau racinaire du transcriptome chez ce genre « *Opuntia* », donnera sans doute plus d'informations sur la compréhension de l'expression des gènes impliqués dans la tolérance à la salinité.

6. Confronter les résultats d'analyse de ressources génétiques algériennes d'*Opuntia* à ceux de certains pays méditerranéens afin de construire un arbre phylogénétique global pour le positionnement des ressources génétiques algériennes.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAO (Food and Agricultural Organization., 2008- Land and plant nutrition management service. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush/>.
2. IPTRID., «conférence électronique sur la salinisation». Extension de la salinisation et stratégie de prévention et réhabilitation. (2006), p 2-11.
3. Ashraf, M. and O'Leary, J.W., "Responses of Some Newly Evolved Salt-Tolerant Genotypes of Spring Wheat to Salt Stress": II. Water Relations and Gas Exchange. *Acta Botanica Neerlandica*, 45, (1996), 29-39.
4. Badraoui, M. et Merzouk, A., «Changes of soil qualities under irrigation: the effect of salt accumulation on water retention by Vertisols». In CIHEAM ed., farm water management techniques, Rabat, Morocco (1994).
5. Badraoui, M. Soudi, B. Merzouk, A. Farhat, A. M'hamdi, A. "Changes of soil qualities under pivot irrigation in the Bahira region of Morocco": Salinization. *Advances in Geo Ecology*, 31, (1998), 503-508.
6. Bouhlassa, S. Alechcheikh, C. et Kabiri, L., «Origine de la minéralisation et de la détérioration de la qualité des eaux souterraines de la nappe phréatique du Quaternaire du bassin versant de Rheris (Errachidia, Maroc)». *Sécheresse*, vol. 19, n° 1, (2008), pp. 67-75.
7. Pardo, J.M., «Biotechnology of water and salinity stress tolerance». *Curr. Opin. Biotech.* (2010), 21. pp 185-196.
8. Griffith, M.P., «The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae)», New molecular evidence<sup>1</sup>. *American Journal of Botany*. 91, (2004), 1915-1921.
9. Sejuro, N.O., «Plantas Medicinales Utilizadas por los Curanderos de Nasca», 2nd ed. *Boletín de Investigación en Tecnologías. Nativas* 5, (1990), [www.amjbot.org](http://www.amjbot.org).
10. Kiesling, R. «Origen, domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*», *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3, (1998), pp 50-59, Online at [www.jpacd.org](http://www.jpacd.org).
11. Sáenz-Hernández, C. Corrales-García, J. and Aquino-Pérez, G., Nopalitos, mucilage, fiber, and cochineal, in: Nobel, P.S. (Ed.), *Cacti. Biology and Uses*, University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London, (2002), pp. 211-234.
12. Bravo-Hollis, H., «Las Cactáceas de México», 2eme ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, (1978), p.743.
13. Benson, L.H «The cacti of the United States and Canada», Stanford University Press, Stanford, California, USA, (1982), p.10.

14. Fournier, P. «Les cactées et les plantes grasses», 2<sup>ème</sup> édition, Paris, P. Lechevalier, (1954), p.113.
15. Barbera, G. Carimi, F. et Inglese, P. «Past and present role of the Indian-fig prickly-pear (*Opuntia ficus-indica* L. Miller, Cactaceae) », In: The agriculture of Sicily. Economic Botany 46, (1992), pp 10-20.
16. Barthlott, W. et Hunt, D.R., «Cactaceae», In: Kubitski. K, Rohwer. J.G, Bittrich. V, (Eds.). The Families and Genera of Vascular Plants. Vol (2). Springer, Berlin, (1993), pp 161-197.
17. Lopez-Garcia, J.J. Fuentes-Rodriguez, J.M. et Rogriguez. R.A, «Production and use of *Opuntia* as forage in Northern Mexico», In: Mondragón. J.C et Pérez-González. S, (Eds). pp 29-36. «Cactus (*Opuntia* spp.) as forage», FAO Plant protection and production paper 169, (2001), p. 146.
18. Boujghagh, M. et Chajia, L., «Le cactus: outil de gestion de la sécheresse dans le sud marocain», terre et vie, N°: 52, 44, Rabat (Maroc), Nob/Déb, (2001), p.7, [www. Terre et vie. ov.h.org/cactus pdf](http://www.Terre-et-vie.ov.h.org/cactus.pdf).
19. Dos Santos, D.C et de Albuquerque, S.G, «Fodder use in the semi arid northeast of Brazil» In: Mondragon. J.C et Perez-Gonzalez. S, (ed.). «Cactus (*Opuntia* spp) as forage», F.A.O. plant production and protection paper 169, FAO, Rome Italie, (2001), pp 37- 49.
20. F.A.O. «Projet FAO/CIRGP/PNUE sur les ressources génétiques pour l'amélioration de la vie rurale dans les zones arides et semi-arides, 1979», In: Cahier FAO conservation 21 Travaux de la Consultation FAO d'experts sur le rôle de la foresterie dans la lutte contre la désertification Saltillo, Mexique, 24-28 juin 1985, [www.fao.org](http://www.fao.org).
21. Le Houreou, H.N., The role of cacti (*Opuntia* spp.) in erosion control, land reclamation, rehabilitation and agricultural development in the Mediterranean Basin, J. Arid Environ. 33, (1996), 135-159.
22. Barbera, G., «History, economic and agro-ecological importance», In: Barbera. G, Inglese. P, Pimienta. B.E et Arias. J.E.de J, (Eds.), Agroecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear. FAO, Rome, (1995), pp 1-11.
23. Araba, A. El Aich, A. et Sarti, B., «Valorisation du figuier de Barbarie en élevage», Bultten Mensuelle d'Information et de Liaison du PNTT N° 68, (2000), pp 1- 4.
24. Mulas, M. et Mulas, G., «Potentialités d'utilisation stratégique dans des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification», Short and medium term priority environmental action programme (SMAP), Université des études de Sassari, groupe de la recherche sur la désertification, Italie, Fev. (2004), p.112.
25. Agence Méditerranéenne de l'Environnement « Plantes envahissantes de la région méditerranéenne», Fichier N°12 "Opunita spp. Oponces ou figuier de Barbarie»



- Agence Régionale Pour l'Environnement Provence-Alpes- Côte d'Azur, (2003), p.51.
26. Anaya-Pérez. M.A «History of the use of Opuntia as forage in Mexico», In: Mondragon. J.C et Perez-Gonzalez. S, (Eds.), Cactus (*Opuntia spp.*) as storage. Rome, Italy, FAO, (2001), pp 5-12.
  27. Walali, L. «Bultten de liaison du Programme National de transfert de technologie (PNTTA)», Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Rabat (Maroc), N°35, 1998, pp 5-10.
  28. Monjauze, A. et Le Houérou, H.N. «Le rôle de l'Opuntia dans l'économie Agricole Nord-africaine», Extrait du Bultten de l'Ecole Nationale Supérieure d'Agriculture de Tunisie. N°8-9 Septembre-December, 1966, pp 85-164.
  29. Ministère de l'Agriculture, des Ressources Hydrauliques et de la Pêche de Tunisie DGACTA; «Programme de Gestion des Ressources Naturelles dans les Territoires Ruraux Vulnérables de Tunisie». Brochures de présentation de la zone d'intervention prioritaire Gouvernorat de Sidi Bouzid Territoire d'El Ayoun-Versant Sud de Djebel Mghila (Délégation de Cebalet Ouled Askar. Version du 30 novembre (2015), pp1-12.
  30. Mabrouk A., Abbas Y., Fakiri M., Benchekroun M., El Kharrassi Y., El Antry-Tazi S., El Mzouri E., «Caractérisation phénologique de différents écotypes de cactus (*Opuntia spp.*)». J. Mater. Environ. Sci. 7 (4) ; (2016), 1396-1405
  31. Khouri, M.S., «Opuntia bilan écologique en Algérie», INRA et CAREF, (Janv.1970), p.59.
  32. Nerd, A. et Mizrah, Y., "Reproductive biology", In: Barbera. G, Inglese. P, Pimienta. B.E et Arias. J.E.de J, (Eds.), «Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear», FAO, Rome Italy, (1995), pp 49-58.
  33. Bourbouze, A. et Donadieu, P., "L'élevage sur parcours en régions méditerranéennes", Ciheam/LAM : Montpellier, (1987), p.104.
  34. Kenney, L., «Le figuier de barbarie, importance agronomique et conduite Technique», Bulletin de l'institut agronomique et vétérinaire Hassan II, MADRPM/DERD N° 35, Agadir (Maroc), (Août 1997). [http://www.iav.ac.ma/pntta/02-35 htm](http://www.iav.ac.ma/pntta/02-35.htm).
  35. Mondragón, J.C. Méndez, G.S. de J. et Olmos, O.G., «Cultivation of Opuntia for fodder production: from re-vegetation to hydroponics in: Mondragón, J.C., Pérez, G.S., Arias, E., Reynolds, S.G. et Sánchez, M. D. (eds.), Cactus (*Opuntia spp.*) as forage», F.A.O. plant production and protection paper 169, Rome (Italy), (2001), 107-122.
  36. Tegegne, F., "In vivo Assesment of the Nutritive Value of Cactus Pear as a Ruminant Feed", 323-328. In: Néfzaoui. A et Inglese. P, «Proceedings of the Fourth International Congress on Cactus Pear and Cochineal», Acta-Horticulturae, Novembre 581, Hammamet, Tunisia 22-28 Octobre 2000, p.352.

37. Shweizer, M. "Docteur NOPAL le médecin du Bon Dieu", APB, ed.3<sup>e</sup> trimestre, France, 1997, p.81.
38. Rengasamy, P., "Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview". *Australian Journal of Experimental Agriculture* 42, (2002), 351-361.
39. Munns, R. Tester, M., "Mechanisms of salinity tolerance". *Annual Review of Plant Biology*, 59, (2008), 651- 681.).
40. Zhu, J.K., "Plant salt stress". In *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley, Chichester, (2007).
41. F.A.O., «Techniques de développement pastorale», Vol.3, plantation d'arbustes fourragers, projets F.A.O. RAB.84.025, (1989),171p.
42. Cheverry, C., "Contraints environnementales et disponibilités en ressources naturelles. Ministère de l'Agriculture, de la pêche et de l'Alimentation". Groupe prospective. Séance du 19 juin 1996. 16 p.
43. Song, G. Feng, Tian, C.Y. Zhang, F.S., "Strategies for adaptation of Suaeda physophora Haloxylon ammodendron and Haloxylon ersicum a saline environment rigermination stage". *Ann. Bot.*, 96 (2005), pp. 399 - 405.
44. Chinnusamy, V. Jagendorf, A. Zhu, J.K., "Understanding and improving salt tolerance in plants". *Crop Sci.* 45, (2005), 437-448.
45. Cramer, G.R. Bowman, D.C., "Cell elongation control under stress conditions". In 'Handbook of plant and crop stress. (Ed. M Pessaraki), (1993), pp. 303-320. (Marcel Dekker, Inc.: New York).
46. Pujol, N. Bonnerot, C. Ewbank, J.J. Kohara, Y. Thierry-Mieg, D., "The Caenorhabditis elegans unc-32 gene encodes alternative forms of a vacuolar ATPase a subunit". *J Biol Chem* 276(15), (2001), 11913-21.
47. Läuchli, A. Epstein, E., "Plant responses to saline and sodic conditions". In Tanji, K.K. (ed). *Agricultural salinity assessment and management*. ASCE manuals and reports on engineering practice No, 71, (1990), p. 113-137.
48. Chinnusamy, V. Schumaker, K. Zhu, J.K., "Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants". *Journal of Experimental Botany*, Volume 55, Issue 395, 1 January 2004, P. 225-236.
49. Pical, C. Westergren, T. Dove, S.K. Larsson, C. Sommarin, M., "Salinity and hyperosmotic stress induce rapid increases in phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate, diacylglycerol pyrophosphate, and phosphatidylcholine in Arabidopsis thaliana cells". *J Biol Chem.*; 274, (1999), 38232-38240.
50. Hasegawa, P.M. Bressan, R.A. Zhu, J.K. and Bohnert, H.J., "Plant cellular and molecular responses to high salinity". *Annu. Rev. Plant Mol. Plant Physiol.* 51, (2000), 463-499.

51. Bounaqba, S., "Analyse des déterminants de la tolérance à NaCl chez le blé tendre, le triticale et l'orge. Utilisation de la fluorescence chlorophyllienne dans le diagnostic de l'état fonctionnel du photosystème II". Doctorat de Biologie, Faculté des Sciences de Tunis, Univ. Tunis II (1998).
52. Gorham, J., "Mechanisms of Salt Tolerance of Halophytes". In: Halophytes and Biosaline Agriculture, Redouane, C.A. Malcolm, C.V. and Hamdy, A. (Eds.). Marcel Dekker Inc., New York, (1996), pp: 31- 53.
53. Soltani, A. Hajji, M. Grignon, C., "Recherche de facteurs limitant la nutrition minérale de l'orge en milieu salé". Agronomie 10, (1990), 857- 866.
54. Yazici, I. Türkan, I. Sekmen, A.H. Demiral, T., "Salinity tolerance of purslane (*Portulaca oleraceae* L.) is achieved by enhanced antioxidative system, lower level of lipid peroxidation and proline accumulation". Environ. Exp. Bot. 61, (2007), 49-57.
55. Sudhakar, C. Lakshmi, A. Giridarakumar, S., "Changes in the antioxidant enzyme efficiency in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity". Plant Sci 161, (2001), 613-619.
56. Hernández, J.A. Talavera, J.M. Martínez-Gómez, P. Dicenta, F. Sevilla, F., "Response of antioxidant enzymes to plum pox virus in two apricot cultivars". Physiol Plant. 111, (2001), 313-321.
57. Azevedo Neto, A.D. Prisco, J.T. Eneas-Filho, J. Braga de Abreu, C.E. Gomes-Filho, E., "Effect of salt stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of salt-tolerant and salt-sensitive maize genotypes". Environ. Exp. Bot., 56, (2006), 235-241.
58. Smirnoff, N., "The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation". New Phytologist 125, (1993), 27- 58.
59. Parent, C. Capelli, N. and Dat, J., "Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes". C. R. Biol. 331 (4), (2008), 255-261.
60. Rahnama, H. Ebrahimzadeh, H., "The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seed-lings". Biol. Plant., 49, (2005), 93-97.
61. Reddy, A.R. Chaitanya, K.V. Vivekanandan, M., "Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants". J. Plant Physiol., 161, (2004), 1189-1202.
62. Demiral, T. Türkan, I., "Does exogenous glycinebetaine affect antioxidative system of rice seedlings under NaCl treatment" J. Plant. Physiol., 161, (2004), 1089-1100.
63. Hanana, H. Talarmin, H. Pennec, J.P. Droguet, M. Gobin, E. Marcocelle, P. Dorange, G., "Establishment of functional primary cultures of heart cells from the clam *Ruditapes decussatus*". Cytotechnology, 63, (2011), 295-305.

64. Zhu, J. K., "Plant salt tolerance". Trends in Plant Sci. 6, (2001), 66-71.
65. Khales, A. and Baaziz, M., "Marquage des ressources génétique d'*Opuntia ficus indica* L. par les peroxydases extraites des raquettes. Relation avec la croissance de la plante en présence du sel". 3ème. Journée Nationale sur le cactus, Ben Guerir (Maroc), (2004).
66. García-Carreño, F.L., "Peroxidase activity in the xerophytic "Cardón" (*Pachycereus pringlei*), a Cactaceae of the Sonoran Desert of Mexico". Journal of Plant Physiology. 142, (1993), 274-280.
67. Susumu, H. Katsutomo, S. HiroyukiitoYuko, O. and Hirokazu, M., "A Large Family of Class III plant Peroxidases". Plant Cell Physiology. 42 (5), (2001), 462-468.
68. Juarez, M.C. Passera, C.B., "In vitro propagation of *Opuntia ellisiana* Griff, and acclimatization to field conditions". Biocell 26, (2002), 319-324.
69. Evéque, V.D., "Optimisation of tissues cultures for *Opuntia*", thesis, University of Texas, Mai 1995, [www.Lawrence.edu](http://www.Lawrence.edu).
70. Leclerc, J.C., "Ecophysiologie végétale", Publication de l'Université de Saint-Etienne, (1999), p. 277.
71. Mauseth, J.D., "Introduction to 9 cactus anatomy", Epidermis Cactus and succulent journal US, N°7, (1984), pp: 272-276.
72. Nobel, P.S. Hartsock, T.L., "Relationships between photosynthetically active radiation, nocturnal acid accumulation, and CO<sub>2</sub> uptake for a crassulacean acid metabolism plant, *Opuntia ficus-indica*". Plant Physiology 71, (1983), 71-75.
73. De Kock, G.C., "The use of *Opuntia* as a fodder source in arid areas of Southern Africa". In: C. Mondragón-Jacobo and S. Pérez-González (Eds.). pp. 101-105. Cactus (*Opuntia* spp.) as forage, FAO Plant protection and production, (2001), paper 169-146.
74. DeKock, G.C., "Drought resistant fodder shrubs in South Africa". p. 399-408. In H.N. LeHouerou (ed.) Browse in Africa. The current state of knowledge. Papers presented at the International Symposium on Browse in Africa, Addis Ababa, International Livestock Center for Africa, (1980).
75. Chouaki, S. "Deuxième rapport national sur l'état des ressources génétiques", Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture INRAA/Juin 2006, p.91.
76. Levitt, J., "Responses of Plants to environmental stresses". Vol. 1, Acad. Press, (1980), 496.
77. Adam, A.F. et Dron, M., "Les outils moléculaires et leur applications à l'amélioration des plantes ». Dans: Le progrès génétique passe-t-il par le repérage

- et l'inventaire et des gènes? Ed. AURELP-UREF. John Libbey Eurotex, Paris, (1993), pp. 23-46.
78. De Vienne, D., "L'analyse du déterminisme génétique des caractères quantitatifs chez les végétaux". Médecines/sciences: 10(6) (1990), XI-V.
  79. FAO., "Report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture". FAO, Rome, 75pp. Hammer K. A. Diederichsen and M. Spahillari. Basic studies toward strategies for conservation of plant genetic resources, (1996).
  80. Mather, K. and Jinks, J.L., "Biometrical Genetics ". Chapman and Hall, London, (1971).
  81. Konate, I., «Diversité Phénotypique et Moléculaire du Caroubier (*Ceratonia siliqua* L.) et des Bactéries Endophytes qui lui sont Associées». Thèse de Doctorat, (2007), 196.
  82. Hunt, G. H. and Page, R. E. J., "Patterns of inheritance with RAPD molecular markers reveal novel type of polymorphism in the honey bee". Theor. Appl. Genet. 85, (1992), 15-20.
  83. Arnold, M. L., Buckner, C. M. and Robinson, J.J., "Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises". Pro. Natl. Acad. Sci. USA. 88, (1991), 1398-1402.
  84. Welsh J., Honeycutt, R. J., McClelland, M. and Sobral, B. W. S., "Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR)". Theor. Appl. Genet.82, (1991), 473-476.
  85. Hadrys, H., Balick, M. and Schierwater, B., "Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology". Mol. Ecol. 1, (1992), 55-63.
  86. Baird, W. V., Ballard, R.E., Rajapakse, S. and Addott, A. G., "Progress in Prunus mapping and application of molecular to germplasm improvement. Hort Science. 31, (1996), 1099-1106.
  87. Klein-Lankhorst, R. M., Vermunt, A., Weid, R., Liharska, T. and Zabel, P., "Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD)". Theor. Appl. Genet. 83, (1991), 1549-1551.
  88. Reiter, R. S., Williams, J. G. K., Feldmann, K., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. and Scolnik, P. A., "Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, (1992), 1477-1481.
  89. Khadari, B., Lashermes, P. and Kjellberg, F., "Identification variétale et ressources génétiques chez le figuier (*Ficus carica* L.): utilisation des marqueurs RAPD". In: Quel avenir pour l'amélioration des plantes? Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext, Paris, (1994), pp. 399-412.

90. Geraci, A., Divaret, I., Raimondo, F. M. and Chèvre, A. M., "Genetic relationships between Sicilian population of Brassica analysed with RAPD markers". *Plant Breeding*, 120, (2001), 193-196.
91. Lashermes, P., Cros, J., Marmey, P. and Charrier, A., "Use of random amplified polymorphic DNA markers to analyse genetic variability and relationships of Coffea species". *Crop Evol. Gent. Res.* 40, (1993), 91-99.
92. Hormaza, J. I., Dollo, L. and Polito, V. S., "Identification of a RAPD marker linked to sex determination in Pistacia vera using bulked segregant analysis". *Theor. Appl. Genet.* 89, (1994), 9-13.
93. Sanz-Cortés, F. Badens, M. L. Paz, S. Íñiguez, A. and Llácer, G., "Molecular Characterization of Olive cultivars using RAPD markers". *J. Amer. Soc Hort. Sci.* 126, (2001), 7-12.
94. Khadari, B., Breton, C., Moutier, N., Roger, J. P., Besnard, G., Bervillé, A. and Dosba, F., "The use of molecular marker of germplasm management in a French olive collection". *Theor. Appl. Genet.* 106, (2003), 521-529.
95. Xu, D. H. and Gai, J. Y., "Gentic diversity of wild and cultivated soybeans growing in China revealed by RAPD analysis". *Plant Breeding*, 122, (2003), 503-506.
96. Chen, L. and Yamguchi, S., "RAPD markers for discriminating tea germplasm at the specific level in China". *Plant Breeding*, 124, (2005), 404-409.
97. Dweikat, I., Ohm, H., Patterson, F. and Cambron, S., "Identification of RAPD marker for 11 Hessian fly resistance genes in wheat". *Theor. Appl. Genet.* 94, (1997), 419-423.
98. Dedryver, F., Jubier, M. F., Thouvenin, J. and Goyeau, H., "Molecular marker linked to the leaf rust resistance gene Lr24 in different wheat cultivars". *Genome*, 39, (1996), 830-835.
99. Robert, O., Abelard, C. and Dedryver, F., "Identification of molecular for the detection of the yellow rust resistance gene Yr17 in wheat". *Molecular Breeding*, 5, (1999), 167-175.
100. Gogorcena, Y. and Parfitt, D. E., "Evaluation of RAPD for detection of polymorphism in apricot". *Sci. Hort.* 59, (1994), 163-167.
101. Belaj, A., Trujillo, I., de la Rosa, R. and Rallo, L., «Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in Olive germplasm bank". *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126, (2001), 64-71.
102. Corniquel, B. and Mercier, L., "Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivar identification by RFLP and RAPD". *Plant Sci.* 101, (1994), 163-172.
103. Yee, E., Kidwell, K. K., Sills, G. R. and Lumpkin, T. A., "Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) Accession on the basis of RAPD and AFLP markers". *Crop Sci.* 39, (1999), 268-275.

104. Zoghlami, N. Mliki, A. Ghorbel, A., "Evaluation of genetic diversity among Tunisian grapevines by RAPD markers". *Vitis* 40 (1), (2001), 31-37.
105. Mattagajasingh, I. Acharya, L. Mukherjee, A. K. Panda, P. C. and Das, P., "Genetic relationships among nine cultivated taxa of *Calliandra* Benth. (Leguminosae: Mimosoideae) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers". *Scientia Horticulture*, 110, (2006), 98-103.
106. Mondragón-Jacobo, C., "Molecular characterization using RAPDs of a cactus (*Opuntia* spp. Cactaceae) collection from central México as a basis for plant breeding". *Revista Chapingo Serie Horticultura* 9 (1), 2003), 97-114.
107. Luna-Paez, A. Valadez-Moctezuma, E. Barrientos-Priego, AF. Gallegos-Vázquez, C., "Characterization of *Opuntia* spp. by means of seed with RAPD and ISSR markers and its possible use for differentiation". *JPACD* 9, (2007), 43-59.
108. Valadez-Moctezuma, E. Ortiz-Vásquez, Q. Samah, S., "Molecular based assessment of genetic diversity of xoconostle accessions (*Opuntia* spp.)". *Afr J of Biotech* 13, (2014), 202–210.
109. Srikanth, K. Whang S.S. Phylogeny of Korean *Opuntia* spp. based on multiple DNA regions. *Turkish Journal of Botany* 1-7.
110. De Lyra, M.C.P., "Molecular studies of forage prickly-pear cactus from the semiarid of Pernambuco State-Brazil". *Journal of Applied Biology & Biotechnology* Vol. 3 (02), (March-April, 2015.), pp. 001-005.
111. Arnholdt-Schmitt, B. Coe, G. L. Llamoca-Zárate, R. M. and Campos, A. P. F., "Genome Characterization of *Opuntia ficus-indica*: A simple and efficient micromethod. *J PACD*4, (2001), 57-65.
112. Bendhifi, M. Baraket, G. Zourgui, L. Souid, S. Salhi-Hannachi, A., "Assessment of genetic diversity of Tunisian Barbary fig (*Opuntia ficus indica*) cultivars by RAPD markers and morphological traits". *Sci. Hort.* 158, (2013), 1-7.
113. El Finti, A. Belayadi, M. El Boullani, R. Msanda, F. ElMousadik, A., "Genetic structure of cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) in a Moroccan collection". *Atlas Journal of Plant Biology* 1(2), (2013), 24-28.
114. Zoghlami, N. Chrita, I. Bouamama, B. Gargouri, M., "Molecular based assessment of genetic diversity within Barbary fig (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill.) in Tunisia". *Sci. Hort.* 113, (2007), 134-141.
115. Bendhifi Zarroug, M. Baraket, G. Zourgui, L. Souid, S. and Salhi Hannachi, A., "Genetic diversity and phylogenetic relationship among Tunisian cactus species (*Opuntia*) as revealed by random amplified microsatellite polymorphism markers". *Genetics and Molecular Research*. (1), (2015), 1423-1433.
116. Labra, M. Grassi, F. Bardini, M. Imazio, S. Guiggi, A. Citterrop, S. Banfi, E. and Sgorbati, S., "Genetic relationships in *Opuntia* Mill. genus (Cactaceae) detected by molecular marker". *Plant Science* 165, (2003), 1129-1136.

117. Abd El-Naby, Z.M. Abdalla, M., Hoballah, A., “Inbreeding and fertility in Egyptian clover, *Trifolium Alexandrinum*”. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* Vol. 4(2), pp. 16-25, March 2012.
118. Younis, R.A.A. Ahmed, M.F. and EL-Menshaw, M.M., “Molecular genetic markers associated with salt tolerance in grain sorghum”. *Arab J. Biotech.*, 10, (2007), 249-258.
119. Patade, V.Y. Supprasana, P. Bapat, V.A. and Kulkarni, U.G., “Selection for abiotic (salinity and drought) stress tolerance and molecular characterization of tolerant lines in sugarcane”. Poster presentation in National Conference on “Biotechnological Aspects towards Cultivation, Utilization and Disease Management of Plants”, held at Lal Bahadur Shastri Mahavidyalaya, Dharmabad, Nanded (2005).
120. Bhutta W.M. and Muhammad Hanif, M., “Identification of RAPD markers linked to salinity tolerance in wheat”. *African Journal of Biotechnology* Vol. 12(17), pp. 2175-2181, 24 April, 2013.
121. Ali, M.N., Yeasmin, L. Gantait, S. Goswami, R. Chakraborty, S., “Screening of rice landraces for salinity tolerance at seedling stage through morphological and molecular markers”. *Physiol. Mol. Biol. Plants.*, (2014).
122. Welsh, J. McClelland, M., “Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers”. *Nucleic Acids Research*, London, v. 18, (1990), p. 7213-7218.
123. Hormaza J. I., Dollo L. and Polito V. S., “Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis”. *Theoretical and Applied Genetic* 89, (1994), 9-13.
124. Guan, R. Chen, J. Jiang, J. and Qiu, L., “Mapping and validation of a dominant salt tolerance gene in the cultivated soybean (*Glycine max*) variety Tiefeng 8”. *Crop J.*, (2014).
125. M’Rib, H.K. and Hilu, K.W., “Detection of interspecific and intraspecific variation in *Panicum* millets through random amplified polymorphic DNA”. *Theor. Appl. Genet.* 88, (1994), 412-416.
126. Kurup, S.S. Hedar, Y.S. Al Dhaheri, M.A. El-Hewiety, A.Y. Aly, M.M. Alhadrami, G., “Morpho-physiological evaluation and RAPD markers—assisted characterization of date palm (*Phoenix dactylifera* L) varieties for salinity tolerance”. *J. Food Agric. Environ.* 7, (2009), 503–507.
127. Turner, N.C., “Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status”. *Plant Soil*, 58, (1981), 339–366.
128. Mackinney, G. “Absorption of light by chlorophyll solutions”. *J. Biol. Chem.* 140, (1941), 315-322.
129. Allen, D.G. Morris, P.G. Orchard, C.H. and Pirolo, J.S., “Nuclear magnetic resonance study of metabolism in the heart during hypoxia and inhibition of glycolysis”. *Journal of Physiology* 361, (1985), 185-204.



130. Monneveux, P. and Nemmar, M., "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, (1986), 583-590.
131. Dubois, M. Gilles, K.A. Hamilton, J.K. Rebers, P.A and Smith, F., "Colorimetric method for determination of sugars and related substances". *Anal. Chem.*, 28, (1956), 350-356.
132. Dagnelie, P., "Analyse statistique à plusieurs variables". Gembloux, Presses agronomiques, (1986), 362p.
133. Saporta, G., "Simultaneous analysis of qualitative and quantitative data". *Atti XXXV Riunione Scientifica della Societa Italiana di Statistica*, (1990), p.63-72.
134. Hospital, F. "Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs". *Genetics* 158(3), (2001), 1363-1379.
135. Moreau, L. Charcos, A. et Gallais, A., "Efficiency of marker-assisted selection compared with conventional selection". *OCL-Ol. Corps Gras Lipides* 8 (5), (2001), 496-501.
136. Eagles, H.A. Bariana, H.S. Ogonnaya, F.C. Rebetzke, G.J. Hollamby, G.J. Henry, R.J. Henschke, P.H. Carter, M., "Implementation of markers in Australian wheat breeding". *Aust. J. Agric. Res.* 52 (11-12), (2001), 1349-1356.
137. Dekkers, J.C.M. Hospital, F., "The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations". *Natl. Rev. Genet.* 3 (1), (2002), 22-32.
138. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., "DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers". *Nucleic Acids Res.* 18, (1990), 6531-6535.
139. Welsh, J. and McClelland, M., "Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers". *Nucleic Acids. Res.* 18, (1990), 7213-7218.
140. Snoussi Trifa, H. Labra, M. and Ben Salem, H., "Molecular characterization of three Tunisian collections of cactus". *Acta Hort.* 811, (2009), 287-292.
141. Wang, X.P. Felker, Burow, D.M. and Paterson, H.A., "Comparison of RAPD marker patterns to morphological and physiological data in the classification of *Opuntia* accessions". *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 3, (1998), 3-14.
142. Tutuncu, M. Sarier, K. İmrak, B. Comlekcioglu, S. Kuden, A. Kuden, A.B., "Determination of fruit characteristics of cactus pear selected from Adana province". *Anadolu Journal of Agricultural Science* 31, (2016), 183-190.
143. Doyle, J.J. Doyle, J.L. "A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue". *Phytochemical Bulletin*, v.19, (1987), p.11-15.

144. Prevost, A. Wilkinson, M.J., "A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars". *Theor Appl Genet* 98, (1999), 107-112.
145. Gilbert, J.E. Lewis, E.V. Wilkinson, M.J. and Caligari, P.D.S., "Developping an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections". *Theor. Appl. Genet.*, 98, (1999), 1125-1131.
146. Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., "Numerical taxonomy the principles and practice of numerical classification". (W. H. Freeman: San Francisco.). (1973).
147. Cha-um, S. Samphumphuang, T. and Kirdmanee, C., "Morphological and Physio-biochemical Changes of in Vitro Cactus (*Echinopsis calochlora*) in Responses to Salt Stress". *Europ. J. Hort. Sci.*, 78(5), (2013), 225-231.
148. Franco-Salazar, V. Véliz, J., "Respuestas de la tuna [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] al NaCl". *Interciencia* 32, (2007), 125-130.
149. Gersani, M. Graham, A.E. Nobel, P.S., "Growth response of individual roots of *Opuntia ficus-indica* to salinity". *Plant Cell Environ.* 16, (1993), 827-834.
150. Murillo-Amador, B. Cortes-Avila, A. Troyo-Dieguez, E. Nieto-Garibay A. and Jones H.G., "Effects of NaCl salinity on growth and production of young cladodes of *Opuntia ficus-indica*". *J. Agron. Crop Sci.* 187, (2001), 269-279.
151. Rodríguez, H.G. Roberts, J.K.M. Jordan, W.R. Drew, M.C. "Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress". *Plant Physiol.* 113, (1997), 881-893.
152. Silverman, F. P. Young, D. R. and Nobel, P. S., "Effects of applied NaCl on *Opuntia humifusa*". *Physiol. Plant.* 42, (1988), 343-348.
153. Nobel, P.S., "Remarkable agavesandcacti". Oxford University Press, New York, (1994), 166p.
154. Lohaus, G. Hussmann, M. Pennewiss, K. Schneider, H. Zhu, J.J. Sattelmacher, B., "Solute balance of a maize (*Zea mays* L.) source leaf as affected by a salt treatment with special emphasis on phloem retranslocation and ion leaching". *J. Exp. Bot.* 51, (2000), 1721-1732.
155. Pommerrenig, B. Papini-Terzi, F.S. Sauer, N., "Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress". *Plant Physiol.* 144, (2007), 1029–1038.
156. Lee, G. Carrow, R.N. Duncan, R.R., "Photosynthetic responses to salinity stress of halophytic seashore *paspalum ecotypes*". *Plant Sci.*, 166 (6) (2004), pp. 1417-1425.
157. Cha-um, S. and Kirdmanee, C., "Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars". *Pak. J. Bot.*, 41(1), (2009), 87-98.

158. Sadler, M.T. Anwar, F. and Al-Doss, A.A., "Gene expression and physiological analysis of *Atriplex halimus* (L.) under salt stress. Austr". *J. Crop Sci.* 7, (2013), 112-118.
159. Stoeva, N. Kaymakanova, M., "Effect of salt stress on the growth, photosynthetic rate of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.)". *J. Central Europ. Agric.*, v.9, n.3, (2008), p.385-392.
160. Hamrouni, L. Hanana, M. Abdelly C. and Ghorbel, A., "Exclusion du chlorure et inclusion du sodium : deux mécanismes concomitants de tolérance à la salinité chez la vigne sauvage *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* (var. 'Séjnènè)," *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vol.15, no.3, (2011), pp. 387-400.
161. Blumwald, E., "Sodium Transport and salt tolerance in plants". *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12, (2000), 431-434.
162. Blumwald, E. Aharon, G.S. and Apse M.P., "Sodium transport in plant cells. Biochim. Biophys". *Acta*, 1465, (2000), 140-151.
163. H, T. Hamdi, S. Ghorbel, A. Blumwad, E., "A Grape Berry (*Vitis vinifera* L.) Cation/Proton Antiporter is Associated with Berry Ripening". *Plant Cell Physiol* 48 (6), (2007), 804-811.
164. Hanana, M. Cagnac, O. Zarrouk, M. and Blumwald, E., "Biological Roles of NHX vacuolar antiport": Achievements and prospects of plant breeding. *Botany-Botanique* 87, (2009), 1023-1035.
165. Hamrouni, L., "Evaluation de la tolérance au sel chez la vigne en Tunisie". Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences de Tunis, Tunisie, (2009), pp. 230.
166. Cramer, G., "Sodium-calcium interactions under salinity stress". *In* A Laüchli, U Lüttge, eds, *Salinity. Environment-Plants-Molecules*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, (2002), pp 205-227.
167. Murillo-Amador, B. Troyo-Diéguez, E. García-Hernández, J.L. López-Aguilar, R. Ávila-Serrano, N.Y. Zamora-Salgado, S. Rueda-Puente, E.O. and Kaya, C., "Effect of NaCl salinity in the genotypic variation of cowpea (*Vigna unguiculata*) during early vegetative growth". *Sci. Hort.*, 108, (2006), 423-431.
168. Hassani, A. Dellal, A. Belkhodja, M. Kaid- Harche, M., "Effet de la Salinité sur l'eau et certains osmolytes chez l'orge (*Hordeum Vulgare* L.)". *European Journal of scientific Research*. 23(1), (2008), PP. 61-69.
169. Hassani, A. Seddiki, D. Kouadria, M. Bounaceur, F. Sehari, N. and Moulay, B., "Impact of salt stress on morphological and physical behavior of the foliar system by cultivating olive and wild olive trees". *NT J CURR SCI*, 12, (2014), 161-169.
170. Ben Khaled, L.Morte Gómez, A. Honrubia, M. Oihabi, A., "Effet du stress salin en milieu hydroponique sur le trèfle inoculé par rhizobium". *Agronomie, EDP Sciences* 23(7), (2003), 553-560.

171. Mohsen, A.A. Ebrahim, M.K.H. Ghoraba, W.F.S., "Response of salt-stressed *Vicia faba* plant to application of ascorbic acid on the growth and some metabolites". Iranian J. of Plant Physiol.4 (2), (2013), 957-976.
172. Taffou, V.D. Wamba, F.O. Youmbi, E. Nono, G.V. Amougou, A., "Groeth, yield, water status and ionic distribution response of three babmara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.) landraces grown under saline conditions". Int. J. Bot. 61, (2010), 53-58.
173. Mane, A.V. Karadge, B.A. and Samant, J.S., "Salinity induced changes in photosynthetic pigments and polyphenols of *Cymbopogon nardus*(L.) Rendle". J. Chem. Pharm. Res., 2, (2010), 338-347.
174. Yeo, A.R. Yeo, M.E. Flowers, S.A. Flowers T.J., "Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance". Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 377-384.
175. Garg, N. Singla, R., "Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress". Braz J Plant Physiol 16, (2004), 137-146.
176. Al-Sobhi, O.A. Al-Zaharani, H.S. Al-Ahmadi, S.B. (2006). Effect of salinity on chlorophyll and carbohydrate contents of *Calotropis proceraseedlings*. Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences) Vol 7 No.11427H.
177. Khan, A. A. Sajjad, A.R. and McNeilly, T., "Assessment of salinity tolerance based upon seedling root growth response functions in maize (*Zea mays* L.)". *Euphytica*, 131, (2003), 81-89.
178. Dajic, Z., "Salt stress". In: Madhava Rao KV, Raghavendra AS, Janardhan Reddy K (ed) *Physiology and molecular biology of salt tolerance in plant*". Springer, Netherlands, (2006), pp 41-99.
179. Grennan, A.K., "High Impact Abiotic Stress in Rice. An Omic Approach"; *Plant Physiology*, (April 2006), Vol. 140, pp. 1139-1141.
180. Hopkins, W.G., «*Physiologie végétale*». 2éme édition. De Boeck, Bruscelles: (2003), 461-476.
181. Ashraf, M. and Harris, P.J.C., "Potential Biochemical Indicators of salinity tolerance in plants". *Plant Sci*, (2004), 166, 3-16.
182. Bouzoubaa, N. Lachemi, M., "Self-compacting concrete incorporating high volumes of class-F fly ash preliminary results", *Cement and Concrete Research*, 31, (2001), 413-420.
183. Darbyshire, B., "The Function of the Carbohydrate Units of Three Fungal Enzymes in Their Resistance To Dehydration". *Plant Physiol*. 54, (1974), 717-721.

184. Dubos, C., "Réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique en milieu hydroponique". Thèse de Doc. Université Henri Poincaré, Nancy I, (2001), p. 54-55.
185. Udomchalothorn, T. Maneeprasobsuk, S. Bangyeekhun, E. Boon-Long, P. and Chadchawan, S., "The role of the bifunctional enzyme, fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose 2, bisphosphatase, in carbon partitioning during salt stress and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.)". *Plant Sci.* 176, (2009), 334-341.
186. Sivarama-Krishnan, S. Pattel, V. Flower, G. and Paleg, L.G., "Proline accumulation and nitrate reductase activity in contrasting sorghum lines during mid season drought stress". *Plant Physiol.*, 74, (1988), p.418-426.
187. Greenway, H. et Munns, R., "Mechanism of salt tolerance in non halophytes". *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 31, (1980), 149-190.
188. Chen, H. Kuang, D. and Wang, J., "Studies on selection and characterisation of a stress tolerant sugarcane cell line". *Chin. J. Biotechnol.*, 11, 2, (1995), p.93-99.
189. Silva-Ortega, C.O. Ochoa-Alfaro, A.E. Reyes-Aguero, J.A. Aguado-Santacruz, G.A. and Jimenez-Bremont, J.F., "Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear". *Plant Physiol. Biochem.* 46(1), (2008), 82-92.
190. Caetano-Anollés, G. Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M., "DNA amplification fingerprinting: A strategy for genome analysis". *Plant. Mol. Biol. Rep.* 9, (1991), 292-305.
191. Fontes, F.V.H.M. Colombo, C.A. Lourenção, A.L., "Molecular characterization and genetic divergence of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) on different crops and growing areas". *Neotropical Entomology* 39, (2010), 221-226.
192. Michelmore, R.W. Paran, I. and Kesselli, R.V., "Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, (1991), 9828-9832.
193. Mantel, N.A., "The detection of disease clustering and a generalized regression approach". *Cancer Res.* 27, (1967), 209-220.
194. Sheeba, M.S. Mu neeb Hamza, K.H. Krishna Radhik, N. and Asha, V.V., "Molecular diversities among *Cardiospermum mularica* Linn. populations in Kerala assessed using RAPD markers". *Ann. Phytomed.*, 3(2), (2014), 87-92.
195. Radwan, A. Hara, M. Kleinwächter, M. Selmar, D., "Dehydrin expression in seeds and maturation drying: a paradigm change". *Plant Biol. (Stuttg.)* 16, (2014), 853-855.
196. Labhilili, M. Jouchier, P. Gautier, M.F., "Characterization of cDNAs encoding *Triticum durum* dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance". *Plant Sci.* 112, (1995), 219-230.

197. Dogan, B. Duran, A.Martin, E. Coşkun, F. “Türkiye Serratula L. cinsinin revizyonu”., (2012), Proje no: TÜBİTAK-TBAG-109T243.
198. Iqbal, A. Khan, A.S. Khan, F.S. Ahmad, A. Khan, A.A., “Study of genetic divergence among wheat genotypes through random amplified polymorphic DNA”. *Genetics and Molecular Research* 6(3), (2007), 476-481.
199. Nazari, L. and H. Pakniyat., “Genetic diversity of wild and cultivated barley genotypes under stress using RAPD markers”. *Biotech.*,7, (2008), 745-750.
200. Khan, M.I.R. Iqbal, N. Masood, A. Per, T.S. Khan, N.A., “Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation”. *Plant Signal. Behav.*, (2013), 8 e26374 10.4161/psb.26374.
201. Foolad, M.R. and Chen, F.Q., “RAPD markers associated with salt tolerance in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *L. pennellii*)”. *Plant Cell Reports* 17, (1998), 306-312.
202. Lee, I.S. Kim, D.S. Lee, S.J, Song, H.S. Lim, Y.P. Lee, Y.I., “Selection and characterizations of radiation-induced salinity tolerant lines in rice”. *Breeding Science* 53, (2003), 313-318.
203. Rania, A.A.Y. Ahmed, M.F. and EL-Menshawi, M.M., “Molecular genetic markers associated with salt tolerance in grain sorghum”. *Arab Journal of Biotechnology*, 2, (2007), 249-258.
204. Abdel-Tawab, F.M. Fahmy-Eman, M. Baieldin, A. Eissa-Hala, F. “Molecular marker for salt tolerance in some inbreds of maize (*zea mays* L.)”. *Arab Univ. J. Agric. Sci., Ain Shams Univ.* 5, (1997), 389-417.
205. Abdel-Tawab, F.M. Fahmy-Eman, M. Baieldin, A. Mahmoud-Asmahan, A.Saleh, O.M., “Development of molecular genetic indices for drought tolerance in some inbreds and hybrids of maize (*Zea mays* L.)”. 3<sup>rd</sup> Arab conference, Modern Biotech and Areas of Application in the Arab world, 14-17 December 1998, Cairo, Egypt., (1998), p. 641-660.
206. Pakniyat, H. Namayandeh, A. and Forster, B.P., “Identification of RAPD markers linked to salt tolerance in cultivated and wild barley”. *Proceedings of the 9th International Barley Genetics Symposium, June 20-26, 2004, Brono, Czech Republic*, (2004), pp: 191-194.
207. Bahieldin, A. Ahmed, I.A., “Use of Agarose-RAPD molecular markers for the identification of some barley cultivars”. *Egypt.J.Genet.Cytol.* 23, (1994), 81-94.
208. Yang, Z.J. Li, G.R. Feng, J. et al., “Molecular cytogenetic characterization and disease resistance observation of wheat-*Dasyphyrum breviaristatum* partial amphiploid and its derivatives”. *Hereditas* 142, (2005), 80-85.

**APPENDICE A**  
**LISTE DES ABREVIATIONS**

ROS : Espèces réactives de l'oxygène  
SOD : superoxyde-dismutases  
APX : ascorbate peroxydases  
CAT : catalases  
GST : glutathion-S-transférases  
GPX : glutathion peroxydases  
 $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF : microgramme par gramme de matière fraîche  
 $\mu\text{l}$  : micro-litre  
ACP : Analyse en Composante Principale  
ADN: acide désoxyribonucléique  
ARN : acide ribonucléique  
BET : bromure d'étidium  
C.A.H. : Classification Ascendante Hiérarchique  
 $\text{Ca}^{2+}$  R ( $\text{mg.g}^{-1}$  MS) : teneur en potassium au niveau des racines  
 $\text{Ca}^{2+}$  C ( $\text{mg.g}^{-1}$  MS) : teneur en calcium au niveau des cladodes âgées et jeunes  
Chlb Ca ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) : teneur en chlorophylle "b" dans les cladodes âgées  
Chlb Cj ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) : teneur en chlorophylle "b » dans les cladodes jeunes  
Chlt Ca ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) : teneur en chlorophylle totale dans les cladodes âgées  
Chlt Cj ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) : teneur en chlorophylle totale dans es cladodes jeunes  
Chta Cg ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) : teneur en chlorophylle "a" dans les cladodes âgées  
Clha Cj ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) : teneur en chlorophylle "a" dans les cladodes jeunes  
CTAB : Cetyl TRimethyl Ammonium Bromide  
DNase: Désoxyribonucléase  
EDTA : éthylène diamine tétra-acétique  
F.A.O: Food and Agriculture Organization of the United Nations  
H.C.D.S : Haut-Commissariat au Développement de la Steppe  
HCl : acide chlorhydrique  
 $\text{K}^+/\text{Na}^+$  C ( $\text{mg.g}^{-1}$  MS) : rapport teneur en potassium cladodes âgées et jeunes/ teneur en sodium cladodes âgées et jeunes  
 $\text{K}^+/\text{Na}^+$  R ( $\text{mg.g}^{-1}$  MS): rapport teneur en potassium racines/ teneur en sodium racines  
 $\text{K}^+$  C ( $\text{mg.g}^{-1}$  MS) : teneur en potassium au niveau des cladodes âgées et jeunes  
 $\text{K}^+$  R ( $\text{mg.g}^{-1}$  MS) : teneur en potassium au niveau des racines  
L Ca (cm) : longueur des cladodes âgées  
L Cj (cm) : longueur des cladodes jeunes  
LA Ca (cm) : largeur des cladodes âgées  
LA Cj (cm) : largeur des cladodes jeunes  
LR (cm) : Longueur de racines  
 $\text{Mg.g}^{-1}$  MS : milligramme par gramme de matière sèche  
mM : Milli mole  
 $\text{Na}^+$  C ( $\text{mg.g}^{-1}$  MS) : teneur en sodium au niveau des cladodes âgées et jeunes  
 $\text{Na}^+$  R ( $\text{mg.g}^{-1}$  MS) : teneur en sodium au niveau des racines  
NaCl : chlorure de sodium  
NR : Nombre de racines  
OD: densité optique  
P Ca ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  MF) teneur en proline au niveau des cladodes âgées

P Cj ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF) : teneur en proline au niveau des cladodes jeunes  
Pb : paire de base  
PCR: Réaction en chaîne par polymérase  
PF : poids frais en mg.  
PF Ca (g): poids frais des cladodes âgées  
PF Cj (g) : poids frais des cladodes jeunes  
PFR (g) : poids frais racinaire  
PFR/PFC (g) : rapport poids frais racinaire/ poids frais cladodes âgées et jeunes  
pH : Potentiel hydrogène  
PR ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF): teneur en proline au niveau des racines  
PS : poids sec en mg.  
PT : poids de turgescence en mg.  
PVP : polyvinyl pyrrolidone  
R.A.P.D : Polymorphisme d'amplification aléatoire de l'ADN  
S Ca ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF) : teneur en sucre soluble totale au niveau des cladodes âgées  
S Cj ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF) : teneur en sucre soluble totale au niveau des cladodes jeunes  
SR ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  MF) : teneur en sucre soluble totale au niveau des racines  
TAE : Tris-Acétate-EDTA  
TRE Ca (%): teneur relative en eau dans les cladodes âgées  
TRE Cj (%): teneur relative en eau dans les cladodes jeunes  
UBC: University of British Columbia  
V : volume de la solution extraite;



**APPENDICE B**  
**ANALYSE DE LA VARIANCE**

Tableau 1: Paramètres morphologiques / 200 mM NaCl

Paramètres	S. de variabilité	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Nombre de racines	VAR.TOTALE	730,765	23	31,772				
	VAR.FACTEUR 1	305,115	3	101,705	101,705	0		
	VAR.FACTEUR 2	388,815	1	388,815	388,815	0		
	VAR.INTER F1*2	20,835	3	6,945	6,945	0,0034		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	2,02%
Longueur de racines	VAR.TOTALE	3612,127	23	157,049				
	VAR.FACTEUR 1	2213,052	3	737,684	737,684	0		
	VAR.FACTEUR 2	796,953	1	796,953	796,953	0		
	VAR.INTER F1*2	586,122	3	195,374	195,374	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	3,89%
Poids frais des racines	VAR.TOTALE	612,125	23	26,614				
	VAR.FACTEUR 1	531,618	3	177,206	82,682	0		
	VAR.FACTEUR 2	45,237	1	45,237	21,107	0,00034		
	VAR.INTER F1*2	0,978	3	0,326	0,152	0,9262		
	VAR.RESIDUELLE 1	34,292	16	2,143			1,464	11,77%
Largeur des cladodes âgés	VAR.TOTALE	48,816	23	2,122				
	VAR.FACTEUR 1	22,091	3	7,364	7,072	0,00315		
	VAR.FACTEUR 2	9,754	1	9,754	9,367	0,00731		
	VAR.INTER F1*2	0,311	3	0,104	0,1	0,95812		
	VAR.RESIDUELLE 1	16,66	16	1,041			1,02	11,55%
Longueur des cladodes âgés	VAR.TOTALE	209,656	23	9,115				
	VAR.FACTEUR 1	88,031	3	29,344	14,015	0,00011		
	VAR.FACTEUR 2	78,844	1	78,844	37,657	0,00002		
	VAR.INTER F1*2	9,281	3	3,094	1,478	0,25785		
	VAR.RESIDUELLE 1	33,5	16	2,094			1,447	7,59%
Poids frais des cladodes âgés	VAR.TOTALE	916,771	23	39,86				
	VAR.FACTEUR 1	339,861	3	113,287	113,287	0		
	VAR.FACTEUR 2	511,711	1	511,711	511,711	0		
	VAR.INTER F1*2	49,199	3	16,4	16,4	0,00005		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	1,06%
Largeur des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	31,33	23	1,362				
	VAR.FACTEUR 1	0,156	3	0,052	0,035	0,99		
	VAR.FACTEUR 2	6,998	1	6,998	4,701	0,04359		
	VAR.INTER F1*2	0,357	3	0,119	0,08	0,96913		
	VAR.RESIDUELLE 1	23,819	16	1,489			1,22	19,89%
Longueur des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	210,955	23	9,172				
	VAR.FACTEUR 1	134,54	3	44,847	21,854	0,00001		
	VAR.FACTEUR 2	26,021	1	26,021	12,68	0,00265		
	VAR.INTER F1*2	17,561	3	5,854	2,853	0,06948		
	VAR.RESIDUELLE 1	32,833	16	2,052			1,433	11,69%
Poids frais des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1750,14	23	76,093				
	VAR.FACTEUR 1	1332,635	3	444,212	444,212	0		
	VAR.FACTEUR 2	365,977	1	365,977	365,977	0		
	VAR.INTER F1*2	35,527	3	11,842	11,842	0,00027		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	2,48%
PFR/PFC aj	VAR.TOTALE	0,03	23	0,001				
	VAR.FACTEUR 1	0,028	3	0,009	92,375	0		
	VAR.FACTEUR 2	0	1	0	3,375	0,08179		
	VAR.INTER F1*2	0	3	0	0,375	0,77462		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	11,59%

**Tableau 2:** Paramètres morphologiques / 400 mM NaCl

Paramètres	S. de variabilité	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Nombre de racines	VAR.TOTALE	1200,997	23	52,217				
	VAR.FACTEUR 1	251,202	3	83,734	83,734	0		
	VAR.FACTEUR 2	860,404	1	860,404	860,404	0		
	VAR.INTER F1*2	73,391	3	24,464	24,464	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	2,10%
Longueur de racines	VAR.TOTALE	3792,145	23	164,876				
	VAR.FACTEUR 1	2032,316	3	677,439	677,439	0		
	VAR.FACTEUR 2	1051,388	1	1051,388	1051,388	0		
	VAR.INTER F1*2	692,44	3	230,813	230,813	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	4,02%
Poids frais des racines	VAR.TOTALE	692,674	23	30,116				
	VAR.FACTEUR 1	463,21	3	154,403	176,459	0		
	VAR.FACTEUR 2	211,523	1	211,523	241,738	0		
	VAR.INTER F1*2	3,94	3	1,313	1,501	0,25182		
	VAR.RESIDUELLE 1	14	16	0,875			0,935	8,64%
Largeur des cladodes âgés	VAR.TOTALE	198,257	23	8,62				
	VAR.FACTEUR 1	25,353	3	8,451	8,451	0,00143		
	VAR.FACTEUR 2	102,713	1	102,713	102,713	0		
	VAR.INTER F1*2	54,19	3	18,063	18,063	0,00003		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	5,32%
Longueur des cladodes âgés	VAR.TOTALE	56,826	23	2,471				
	VAR.FACTEUR 1	21,551	3	7,184	7,184	0,00294		
	VAR.FACTEUR 2	18,904	1	18,904	18,904	0,00055		
	VAR.INTER F1*2	0,371	3	0,124	0,124	0,94386		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	11,64%
Poids frais des cladodes âgés	VAR.TOTALE	938,98	23	40,825				
	VAR.FACTEUR 1	300,659	3	100,22	100,22	0		
	VAR.FACTEUR 2	541,499	1	541,499	541,499	0		
	VAR.INTER F1*2	80,821	3	26,94	26,94	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	1,06%
Largeur des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	236,102	23	10,265				
	VAR.FACTEUR 1	167,133	3	55,711	55,711	0		
	VAR.FACTEUR 2	39,398	1	39,398	39,398	0,00002		
	VAR.INTER F1*2	13,57	3	4,523	4,523	0,01761		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	8,44%
Longueur des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	29,832	23	1,297				
	VAR.FACTEUR 1	6,87	3	2,29	2,498	0,09585		
	VAR.FACTEUR 2	5,088	1	5,088	5,55	0,03019		
	VAR.INTER F1*2	3,208	3	1,069	1,166	0,35388		
	VAR.RESIDUELLE 1	14,667	16	0,917			0,957	15,41%
Poids frais des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1800,506	23	78,283				
	VAR.FACTEUR 1	1184,296	3	394,765	394,765	0		
	VAR.FACTEUR 2	518,941	1	518,941	518,941	0		
	VAR.INTER F1*2	81,269	3	27,09	27,09	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	2,52%
PFR/PFC aj	VAR.TOTALE	0,034	23	0,001				
	VAR.FACTEUR 1	0,021	3	0,007	15,134	0,00007		
	VAR.FACTEUR 2	0,003	1	0,003	6,466	0,02082		
	VAR.INTER F1*2	0,002	3	0,001	1,34	0,29632		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,007	16	0			0,022	29,97%

**Tableau 3 : Paramètres morphologiques / 600 mM NaCl**

Paramètres	S. de variabilité	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Nombre de racines	VAR.TOTALE	1149,85	17	67,638				
	VAR.FACTEUR 1	56,541	2	28,271	28,734	0,00004		
	VAR.FACTEUR 2	1038,161	1	1038,161	1055,163	0		
	VAR.INTER F1*2	43,341	2	21,67	22,025	0,00012		
	VAR.RESIDUELLE 1	11,807	12	0,984			0,992	2,26%
Longueur de racines	VAR.TOTALE	1338	17	78,706				
	VAR.FACTEUR 1	776,453	2	388,226	388,226	0		
	VAR.FACTEUR 2	400,445	1	400,445	400,445	0		
	VAR.INTER F1*2	149,103	2	74,551	74,551	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	5,01%
Poids frais des racines	VAR.TOTALE	608,53	17	35,796				
	VAR.FACTEUR 1	281,328	2	140,664	140,664	0		
	VAR.FACTEUR 2	278,48	1	278,48	278,48	0		
	VAR.INTER F1*2	36,722	2	18,361	18,361	0,00026		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	10,54%
Largeur des cladodes âgées	VAR.TOTALE	208,5	17	12,265				
	VAR.FACTEUR 1	46,44	2	23,22	23,22	0,00009		
	VAR.FACTEUR 2	100,82	1	100,82	100,82	0		
	VAR.INTER F1*2	49,24	2	24,62	24,62	0,00007		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	5,78%
Longueur des cladodes âgées	VAR.TOTALE	51,056	17	3,003				
	VAR.FACTEUR 1	17,603	2	8,801	8,801	0,00454		
	VAR.FACTEUR 2	17,701	1	17,701	17,701	0,00127		
	VAR.INTER F1*2	3,752	2	1,876	1,876	0,19438		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	11,87%
Poids frais des cladodes âgées	VAR.TOTALE	501,565	17	29,504				
	VAR.FACTEUR 1	120,28	2	60,14	60,14	0		
	VAR.FACTEUR 2	300,125	1	300,125	300,126	0		
	VAR.INTER F1*2	69,16	2	34,58	34,58	0,00002		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	1,04%
Largeur des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	244,226	17	14,366				
	VAR.FACTEUR 1	16,725	2	8,363	8,221	0,00573		
	VAR.FACTEUR 2	71,202	1	71,202	69,997	0		
	VAR.INTER F1*2	144,092	2	72,046	70,826	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	12,207	12	1,017			1,009	9,45%
Longueur des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	35,368	17	2,08				
	VAR.FACTEUR 1	3,2	2	1,6	1,6	0,24159		
	VAR.FACTEUR 2	16,589	1	16,589	16,589	0,0016		
	VAR.INTER F1*2	3,58	2	1,79	1,79	0,20788		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	17,26%
Poids frais des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1736,856	17	102,168				
	VAR.FACTEUR 1	224,672	2	112,336	112,336	0		
	VAR.FACTEUR 2	786,061	1	786,061	786,061	0		
	VAR.INTER F1*2	714,123	2	357,061	357,061	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	2,84%
PFR/PFC aj	VAR.TOTALE	0,024	17	0,001				
	VAR.FACTEUR 1	0,013	2	0,007	130,188	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,009	1	0,009	180,445	0		
	VAR.INTER F1*2	0,001	2	0	7,693	0,00715		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,001	12	0			0,007	10,37%

**Tableau 4 : Paramètres physiologiques / 200 mM NaCl**

Paramètres	S. de variabilité	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Chlorophylle totale cladodes âgées	VAR.TOTALE	2,666	23	0,116				
	VAR.FACTEUR 1	2,338	3	0,779	7784,766	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,194	1	0,194	1941,834	0		
	VAR.INTER F1*2	0,131	3	0,044	437,46	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	1,09%
Chlorophylle totale cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1,753	23	0,076				
	VAR.FACTEUR 1	0,72	3	0,24	2392,63	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,767	1	0,767	7649,44	0		
	VAR.INTER F1*2	0,265	3	0,088	880,296	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	1,18%
Chlorophylle « a » cladodes âgées	VAR.TOTALE	0,1	23	0,004				
	VAR.FACTEUR 1	0,066	3	0,022	40,651	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,025	1	0,025	47,163	0,00001		
	VAR.INTER F1*2	0,001	3	0	0,465	0,71366		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,009	16	0,001			0,023	5,42%
Chlorophylle « a » cladodes jeunes	VAR.TOTALE	0,783	23	0,034				
	VAR.FACTEUR 1	0,472	3	0,157	1572,348	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,098	1	0,098	975,358	0		
	VAR.INTER F1*2	0,212	3	0,071	706,363	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	2,81%
Chlorophylle « b » cladodes âgées	VAR.TOTALE	2,407	23	0,105				
	VAR.FACTEUR 1	2,169	3	0,723	7231,253	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,09	1	0,09	900,361	0		
	VAR.INTER F1*2	0,146	3	0,049	487,366	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	2,04%
Chlorophylle « b » cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1,525	23	0,066				
	VAR.FACTEUR 1	1,004	3	0,335	3344,944	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,304	1	0,304	3037,449	0		
	VAR.INTER F1*2	0,216	3	0,072	720,487	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	2,04%
Teneur relative en eau des cladodes âgées	VAR.TOTALE	5576,546	23	242,459				
	VAR.FACTEUR 1	5129,806	3	1709,935	1709,935	0		
	VAR.FACTEUR 2	398,534	1	398,534	398,534	0		
	VAR.INTER F1*2	32,206	3	10,735	10,735	0,00045		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	1,64%
Teneur relative en eau des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	2108,965	23	91,694				
	VAR.FACTEUR 1	1204,365	3	401,455	401,455	0		
	VAR.FACTEUR 2	612,059	1	612,059	612,059	0		
	VAR.INTER F1*2	276,54	3	92,18	92,18	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	2,59%
Teneur en Na+ racine	VAR.TOTALE	1767,904	23	76,865				
	VAR.FACTEUR 1	304,308	3	101,436	101,309	0		
	VAR.FACTEUR 2	1175,72	1	1175,72	1174,251	0		
	VAR.INTER F1*2	271,856	3	90,619	90,505	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16,02	16	1,001			1,001	6,62%
Teneur en N+ cladodes âgées et jeunes	VAR.TOTALE	48802,41	23	2121,844				
	VAR.FACTEUR 1	845,262	3	281,754	281,754	0		
	VAR.FACTEUR 2	44919,45	1	44919,45	44919,45	0		
	VAR.INTER F1*2	3021,707	3	1007,236	1007,236	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	0,97%
Teneur en K+ cladodes	VAR.TOTALE	7644,877	23	332,386				
	VAR.FACTEUR 1	4703,982	3	1567,994	1567,994	0		
	VAR.FACTEUR 2	1678,354	1	1678,354	1678,354	0		
	VAR.INTER F1*2	1246,542	3	415,514	415,514	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	3,78%
Teneur en K+ racines	VAR.TOTALE	473,584	23	20,591				
	VAR.FACTEUR 1	403,482	3	134,494	134,825	0		
	VAR.FACTEUR 2	15,201	1	15,201	15,238	0,00132		
	VAR.INTER F1*2	38,941	3	12,98	13,012	0,00017		
	VAR.RESIDUELLE 1	15,961	16	0,998			0,999	13,52%
Teneur en Ca++ racines	VAR.TOTALE	656,063	23	28,524				
	VAR.FACTEUR 1	656,027	3	218,676	110665	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,004	1	0,004	2,255	0,14946		
	VAR.INTER F1*2	0	3	0	0,031	0,99		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,032	16	0,002			0,044	0,56%
Teneur en Ca++ cladodes âgées et jeunes	VAR.TOTALE	5463,65	23	237,55				
	VAR.FACTEUR 1	412,022	3	137,341	148,41	0		
	VAR.FACTEUR 2	3540,511	1	3540,511	3825,863	0		
	VAR.INTER F1*2	1496,311	3	498,77	538,969	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	14,807	16	0,925			0,962	3,40%
Rapport K+/Na+ racines	VAR.TOTALE	7,688	23	0,334				
	VAR.FACTEUR 1	5,237	3	1,746	40,579	0		
	VAR.FACTEUR 2	1,316	1	1,316	30,593	0,00006		
	VAR.INTER F1*2	0,447	3	0,149	3,46	0,04106		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,688	16	0,043			0,207	31,75%
Rapport K+/Na+ cladodes âgées et jeunes	VAR.TOTALE	0,38	23	0,017				
	VAR.FACTEUR 1	0,375	3	0,125	1249,377	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,003	1	0,003	30,373	0,00006		
	VAR.INTER F1*2	0	3	0	1,376	0,28593		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	3,35%

**Tableau 5: Paramètres physiologiques / 400 mM NaCl**

Paramètres	S. de variabilité	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Chlorophylle totale cladodes âgées	VAR.TOTALE	2,951	23	0,128				
	VAR.FACTEUR 1	1,995	3	0,665	6649,262	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,683	1	0,683	6834,26	0		
	VAR.INTER F1*2	0,271	3	0,09	903,36	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	1,19%
Chlorophylle totale cladodes jeunes	VAR.TOTALE	2,259	23	0,098				
	VAR.FACTEUR 1	0,541	3	0,18	1802,438	0		
	VAR.FACTEUR 2	1,561	1	1,561	15587,16	0		
	VAR.INTER F1*2	0,155	3	0,052	516,363	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	1,30%
Chlorophylle « a » cladodes âgées	VAR.TOTALE	0,177	23	0,008				
	VAR.FACTEUR 1	0,016	3	0,005	52,375	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,131	1	0,131	1305,377	0		
	VAR.INTER F1*2	0,029	3	0,01	96,375	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	2,59%
Chlorophylle « a » cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1,009	23	0,044				
	VAR.FACTEUR 1	0,504	3	0,168	1680,347	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,338	1	0,338	3384,318	0		
	VAR.INTER F1*2	0,165	3	0,055	550,366	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	3,32%
Chlorophylle « b » cladodes âgées	VAR.TOTALE	2,216	23	0,096				
	VAR.FACTEUR 1	1,898	3	0,633	6326,269	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,168	1	0,168	1683,345	0		
	VAR.INTER F1*2	0,149	3	0,05	495,367	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	2,13%
Chlorophylle « b » cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1,239	23	0,054				
	VAR.FACTEUR 1	0,738	3	0,246	2458,458	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,437	1	0,437	4373,926	0		
	VAR.INTER F1*2	0,062	3	0,021	206,997	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	2,14%
Teneur relative en eau des cladodes âgées	VAR.TOTALE	10526,92	23	457,692				
	VAR.FACTEUR 1	6600,809	3	2200,27	2200,27	0		
	VAR.FACTEUR 2	3091,736	1	3091,736	3091,736	0		
	VAR.INTER F1*2	818,373	3	272,791	272,791	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	1,87%
Teneur relative en eau des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	4638,848	23	201,689				
	VAR.FACTEUR 1	173,926	3	57,975	58,192	0		
	VAR.FACTEUR 2	3745,501	1	3745,501	3759,499	0		
	VAR.INTER F1*2	703,481	3	234,494	235,37	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	15,94	16	0,996			0,998	3,21%
Teneur en Na+ racine	VAR.TOTALE	86781,27	23	3773,098				
	VAR.FACTEUR 1	3492,93	3	1164,31	992,304	0		
	VAR.FACTEUR 2	81386,91	1	81386,91	69363,46	0		
	VAR.INTER F1*2	1882,648	3	627,55	534,84	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	18,773	16	1,173			1,083	0,92%
Teneur en N+ cladodes âgées et jeunes	VAR.TOTALE	450,394	23	19,582				
	VAR.FACTEUR 1	41,451	3	13,817	2,153	0,13258		
	VAR.FACTEUR 2	158,466	1	158,466	24,696	0,00016		
	VAR.INTER F1*2	147,811	3	49,27	7,678	0,0022		
	VAR.RESIDUELLE 1	102,667	16	6,417			2,533	23,68%
Teneur en K+ racines	VAR.TOTALE	494,787	23	21,512				
	VAR.FACTEUR 1	437,51	3	145,837	145,835	0		
	VAR.FACTEUR 2	7,729	1	7,729	7,729	0,01292		
	VAR.INTER F1*2	33,547	3	11,182	11,182	0,00037		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	13,97%
Teneur en K+ cladodes âgées et jeunes	VAR.TOTALE	14712,88	23	639,691				
	VAR.FACTEUR 1	6210,811	3	2070,27	2070,27	0		
	VAR.FACTEUR 2	6298,561	1	6298,561	6298,561	0		
	VAR.INTER F1*2	2187,51	3	729,17	729,17	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	2,92%
Teneur en Ca++ racines	VAR.TOTALE	679,719	23	29,553				
	VAR.FACTEUR 1	663,46	3	221,153	221,153	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,211	1	0,211	0,211	0,65587		
	VAR.INTER F1*2	0,048	3	0,016	0,016	0,99		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	12,37%
Teneur en Ca++ cladodes âgées et jeunes	VAR.TOTALE	6231,878	23	270,951				
	VAR.FACTEUR 1	442,715	3	147,572	147,572	0		
	VAR.FACTEUR 2	4646,22	1	4646,22	4646,22	0		
	VAR.INTER F1*2	1126,943	3	375,648	375,648	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	3,33%
Rapport racines K+/Na+	VAR.TOTALE	7,633	23	0,332				
	VAR.FACTEUR 1	7,075	3	2,358	23585,62	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,454	1	0,454	4538,101	0		
	VAR.INTER F1*2	0,103	3	0,034	342,546	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	1,34%
Rapport cladodes âgés et jeunes K+/Na+	VAR.TOTALE	0,378	23	0,016				
	VAR.FACTEUR 1	0,369	3	0,123	1229,502	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,007	1	0,007	73,499	0		
	VAR.INTER F1*2	0	3	0	1,5	0,252		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	3,42%

**Tableau 6 : Paramètres physiologiques / 600 mM NaCl**

Paramètres	S. de variabilité	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Chlorophylle totale cladodes âgées	VAR.TOTALE	2,128	17	0,125				
	VAR.FACTEUR 1	0,851	2	0,426	4248,235	0		
	VAR.FACTEUR 2	1,08	1	1,08	10786,06	0		
	VAR.INTER F1*2	0,196	2	0,098	976,397	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,001	12	0			0,01	1,59%
Chlorophylle totale cladodes jeunes	VAR.TOTALE	2,725	17	0,16				
	VAR.FACTEUR 1	0,295	2	0,147	1471,09	0		
	VAR.FACTEUR 2	2,354	1	2,354	23502,52	0		
	VAR.INTER F1*2	0,075	2	0,038	374,929	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,001	12	0			0,01	1,67%
Chlorophylle « a » cladodes âgées	VAR.TOTALE	0,328	17	0,019				
	VAR.FACTEUR 1	0,015	2	0,008	75,501	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,224	1	0,224	2244,518	0		
	VAR.INTER F1*2	0,087	2	0,044	435,503	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,001	12	0			0,01	3,05%
Chlorophylle « a » cladodes jeunes	VAR.TOTALE	0,946	17	0,056				
	VAR.FACTEUR 1	0,483	2	0,242	2415,459	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,296	1	0,296	2964,449	0		
	VAR.INTER F1*2	0,165	2	0,083	825,486	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,001	12	0			0,01	3,24%
Chlorophylle « b » cladodes âgées	VAR.TOTALE	1,238	17	0,073				
	VAR.FACTEUR 1	0,748	2	0,374	3741,622	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,289	1	0,289	2888,094	0		
	VAR.INTER F1*2	0,2	2	0,1	999,533	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,001	12	0			0,01	3,26%
Chlorophylle « b » cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1,054	17	0,062				
	VAR.FACTEUR 1	0,129	2	0,065	15,531	0,00052		
	VAR.FACTEUR 2	0,748	1	0,748	180,066	0		
	VAR.INTER F1*2	0,127	2	0,064	15,298	0,00056		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,05	12	0,004			0,064	21,69%
Teneur relative en eau des cladodes âgées	VAR.TOTALE	9316,821	17	548,048				
	VAR.FACTEUR 1	3964,327	2	1982,164	1982,164	0		
	VAR.FACTEUR 2	4950,122	1	4950,122	4950,122	0		
	VAR.INTER F1*2	390,372	2	195,186	195,186	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	2,27%
Teneur relative en eau des cladodes jeunes	VAR.TOTALE	4628,752	17	272,28				
	VAR.FACTEUR 1	191,81	2	95,905	95,423	0		
	VAR.FACTEUR 2	3981,889	1	3981,889	3961,899	0		
	VAR.INTER F1*2	442,994	2	221,497	220,385	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	12,061	12	1,005			1,003	3,36%
Teneur en Na <sup>+</sup> racine	VAR.TOTALE	213657,1	17	12568,07				
	VAR.FACTEUR 1	17553,27	2	8776,633	8776,633	0		
	VAR.FACTEUR 2	186477,3	1	186477,3	186477,3	0		
	VAR.INTER F1*2	9614,594	2	4807,297	4807,297	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	0,63%
Teneur en N <sup>+</sup> cladodes âgées et jeunes	VAR.TOTALE	548,423	17	32,26				
	VAR.FACTEUR 1	58,028	2	29,014	29,014	0,00003		
	VAR.FACTEUR 2	367,205	1	367,205	367,205	0		
	VAR.INTER F1*2	111,19	2	55,595	55,595	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	8,32%
Teneur en K <sup>+</sup> cladodes	VAR.TOTALE	15127,61	17	889,859				
	VAR.FACTEUR 1	3761,22	2	1880,61	1880,457	0		
	VAR.FACTEUR 2	10431,46	1	10431,46	10430,61	0		
	VAR.INTER F1*2	922,931	2	461,465	461,428	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	12,001	12	1			1	2,28%
Teneur en K <sup>+</sup> racines	VAR.TOTALE	421,382	17	24,787				
	VAR.FACTEUR 1	312,169	2	156,085	156,082	0		
	VAR.FACTEUR 2	42,412	1	42,412	42,412	0,00004		
	VAR.INTER F1*2	54,8	2	27,4	27,399	0,00005		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	11,20%
Teneur en Ca <sup>++</sup> racines	VAR.TOTALE	486,841	17	28,638				
	VAR.FACTEUR 1	473,115	2	236,558	283,303	0		
	VAR.FACTEUR 2	3,125	1	3,125	3,743	0,07434		
	VAR.INTER F1*2	0,581	2	0,291	0,348	0,71674		
	VAR.RESIDUELLE 1	10,02	12	0,835			0,914	9,11%
Teneur en Ca <sup>++</sup> cladodes âgées et jeunes	VAR.TOTALE	6598,601	17	388,153				
	VAR.FACTEUR 1	803,858	2	401,929	420,87	0		
	VAR.FACTEUR 2	5656,223	1	5656,223	5922,767	0		
	VAR.INTER F1*2	127,059	2	63,53	66,523	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	11,46	12	0,955			0,977	2,78%
Rapport racines K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	VAR.TOTALE	5,541	17	0,326				
	VAR.FACTEUR 1	4,776	2	2,388	3411,515	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,562	1	0,562	802,576	0		
	VAR.INTER F1*2	0,195	2	0,098	139,358	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,008	12	0,001			0,026	3,06%
Rapport cladodes âgées et jeunes K <sup>+</sup> /Na <sup>+</sup>	VAR.TOTALE	0,272	17	0,016				
	VAR.FACTEUR 1	0,245	2	0,123	1226,01	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,022	1	0,022	220,502	0		
	VAR.INTER F1*2	0,004	2	0,002	18	0,00028		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,001	12	0			0,01	3,21%

**Tableau 7: Paramètres biochimiques / 200 mM NaCl**

Paramètres	S. de variabilité	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Teneur en proline racine	VAR.TOTALE	0,373	23	0,016				
	VAR.FACTEUR 1	0,138	3	0,046	460,001	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,228	1	0,228	2281,504	0		
	VAR.INTER F1*2	0,005	3	0,002	17,5	0,00003		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	2,82%
Teneur en proline cladodes âgées	VAR.TOTALE	1,053	23	0,046				
	VAR.FACTEUR 1	0,615	3	0,205	2053,199	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,317	1	0,317	3177,744	0		
	VAR.INTER F1*2	0,119	3	0,04	397,446	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	1,45%
Teneur en proline cladodes jeunes	VAR.TOTALE	0,896	23	0,039				
	VAR.FACTEUR 1	0,447	3	0,149	1487,106	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,39	1	0,39	3892,229	0		
	VAR.INTER F1*2	0,057	3	0,019	187,968	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	1,51%
Teneur en sucre soluble racine	VAR.TOTALE	2968,36	23	129,059				
	VAR.FACTEUR 1	2647,65	3	882,55	882,55	0		
	VAR.FACTEUR 2	281,535	1	281,535	281,535	0		
	VAR.INTER F1*2	23,175	3	7,725	7,725	0,000214		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	3,61%
Teneur en sucre soluble cladodes âgées	VAR.TOTALE	5694,576	23	247,59				
	VAR.FACTEUR 1	4510,391	3	1503,464	1503,464	0		
	VAR.FACTEUR 2	1113,843	1	1113,843	1113,843	0		
	VAR.INTER F1*2	54,342	3	18,114	18,114	0,00003		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	1,97%
Teneur en sucre cladodes jeunes	VAR.TOTALE	12127,23	23	527,271				
	VAR.FACTEUR 1	10773,53	3	3591,175	3591,175	0		
	VAR.FACTEUR 2	975,375	1	975,375	975,375	0		
	VAR.INTER F1*2	362,325	3	120,775	120,775	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	2,33%

**Tableau 8: Paramètres biochimiques /400 mM**

Paramètres	S. de variabilité	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Teneur en proline racine	VAR.TOTALE	0,681	23	0,03				
	VAR.FACTEUR 1	0,102	3	0,034	341,494	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,522	1	0,522	5221,412	0		
	VAR.INTER F1*2	0,054	3	0,018	181,497	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	2,48%
Teneur en proline cladodes âgées	VAR.TOTALE	1,238	23	0,054				
	VAR.FACTEUR 1	0,692	3	0,231	2305,182	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,454	1	0,454	4531,407	0		
	VAR.INTER F1*2	0,09	3	0,03	301,072	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	1,41%
Teneur en proline cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1,078	23	0,047				
	VAR.FACTEUR 1	0,508	3	0,169	1690,647	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,522	1	0,522	5209,192	0		
	VAR.INTER F1*2	0,046	3	0,015	152,081	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,002	16	0			0,01	1,45%
Teneur en sucre soluble racine	VAR.TOTALE	3350,646	23	145,68				
	VAR.FACTEUR 1	2606,052	3	868,684	868,684	0		
	VAR.FACTEUR 2	633,454	1	633,454	633,454	0		
	VAR.INTER F1*2	95,141	3	31,714	31,714	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	3,40%
Teneur en sucre soluble cladodes âgées	VAR.TOTALE	5943,804	23	258,426				
	VAR.FACTEUR 1	4259,234	3	1419,745	1419,745	0		
	VAR.FACTEUR 2	1633,5	1	1633,5	1633,5	0		
	VAR.INTER F1*2	35,07	3	11,69	11,69	0,00029		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	1,93%
Teneur en sucre cladodes jeunes	VAR.TOTALE	12384,79	23	538,469				
	VAR.FACTEUR 1	10343,65	3	3447,884	3447,884	0		
	VAR.FACTEUR 2	1608,845	1	1608,845	1608,845	0		
	VAR.INTER F1*2	416,289	3	138,763	138,763	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	16	16	1			1	2,23%

**Tableau 9 : Paramètres biochimiques / 600 mM NaCl**

Paramètres	S. de variabilité	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Teneur en proline racine	VAR.TOTALE	0,669	17	0,039				
	VAR.FACTEUR 1	0,116	2	0,058	579,491	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,53	1	0,53	5304,413	0		
	VAR.INTER F1 *2	0,022	2	0,011	108,497	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,001	12	0			0,01	2,51%
Teneur en proline cladodes âgées	VAR.TOTALE	1,095	17	0,064				
	VAR.FACTEUR 1	0,687	2	0,343	3433,612	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,353	1	0,353	3528,116	0		
	VAR.INTER F1 *2	0,054	2	0,027	271,509	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,001	12	0			0,01	1,52%
Teneur en proline cladodes jeunes	VAR.TOTALE	1,021	17	0,06				
	VAR.FACTEUR 1	0,348	2	0,174	355,83	0		
	VAR.FACTEUR 2	0,448	1	0,448	916,297	0		
	VAR.INTER F1 *2	0,218	2	0,109	223,361	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	0,006	12	0			0,022	3,41%
Teneur en sucre soluble racine	VAR.TOTALE	2938,5	17	172,853				
	VAR.FACTEUR 1	1826,76	2	913,38	913,38	0		
	VAR.FACTEUR 2	1030,58	1	1030,58	1030,58	0		
	VAR.INTER F1 *2	69,16	2	34,58	34,58	0,00002		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	2,91%
Teneur en sucre soluble cladodes âgées	VAR.TOTALE	2547,225	17	149,837				
	VAR.FACTEUR 1	487,89	2	243,945	243,945	0		
	VAR.FACTEUR 2	2028,845	1	2028,845	2028,845	0		
	VAR.INTER F1 *2	18,49	2	9,245	9,245	0,00382		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	1,64%
Teneur en sucre cladodes jeunes	VAR.TOTALE	8836,227	17	519,778				
	VAR.FACTEUR 1	6141,791	2	3070,895	3070,895	0		
	VAR.FACTEUR 2	2401,245	1	2401,245	2401,245	0		
	VAR.INTER F1 *2	281,191	2	140,596	140,596	0		
	VAR.RESIDUELLE 1	12	12	1			1	1,84%



## USE OF PHYSIO-BIOCHEMICAL TRAITS TO EVALUATE THE SALT TOLERANCE OF FIVE *OPUNTIA* SPECIES IN THE ALGERIAN STEPPES

BAHIA LALLOUCHE<sup>1,2\*</sup>, AMMAR BOUTEKRABT<sup>1</sup>, BOUBAKR HADJKOUIDER<sup>2</sup>,  
LEILA RIAHI<sup>3</sup>, SALIM LAMINE<sup>4,5</sup> AND NÉJIA ZOGHLAMI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Sciences, Faculty of Nature and Life Sciences, Saad Dahlab University, Blida, Algeria

<sup>2</sup>Department of Agricultural Sciences, Faculty of Science, Mohamed Boudiaf University, M'sila, Algeria

<sup>3</sup>Laboratory of Biotechnology and Bio-Geo Resources Valorization (LR11ES31), Higher Institute for Biotechnology - University of Manouba, Biotechpole of Sidi Thabet, 2020, Sidi Thabet, Ariana, Tunisia

<sup>4</sup>Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University, Ceredigion SY23 3FG, UK.

<sup>5</sup>Laboratory of Management and Valuation of Natural Resources and Quality Assurance, University of Bouira, Bouira 10000, Algeria

<sup>6</sup>Laboratory of Plant Molecular Physiology, Biotechnology Centre of Borj-Cédria, Hammam-lif, Tunisia.

\*Corresponding author's email: blallouche@gmail.com; Tel.: +00213 773 563 649; Fax: 00213 35 332 329

### Abstract

In this study, twelve physio-biochemical parameters were estimated to assess the behavior of five *Opuntia* species in the Algerian steppes (*Opuntia ficus indica* f. *inermis*, *O. amyclea*, *O. streptacantha*, *O. robusta* and *O. engelmannii*). Herein, the salt stress was induced using three levels of NaCl (200 mM, 400 mM and 600 mM). Based on the analysis of variance (ANOVA), the chlorophyll level for both young cladode and aged cladode was found to be the most discriminant parameter under salt stress concentrations 200 and 400 mM. The species were clustered in three groups with *O. ficus indica* f. *inermis* and *O. amyclea* being the most tolerant to salinity. For a salt concentration of 600 mM, the ANOVA showed that the chlorophyll content in aged cladode was the most discriminant parameter. The Biplot-based species analysis revealed that *O. engelmannii* was the most salt tolerant species. However, *O. amyclea* and *O. robusta* were found to be the most sensitive. In conclusion, total chlorophyll contents for young cladode and aged cladode, chlorophyll a of aged cladode, and root total soluble sugars can be used as key parameters to identify the salt tolerance for *Opuntia* species.

**Key words:** Salt tolerance, *Opuntia* species, Physio-biochemical traits, Algerian steppes.

### Introduction

Salinity is one of the most important abiotic stresses and constitutes a limiting factor of plant distribution and production (Khan *et al.*, 2013). The capacity of the plants to adapt with salinity stress is governed mostly by natural parameters. Thus, understanding the mechanisms underlying salt tolerance is very important (Gilbert *et al.*, 1998). Two negative effects can be elicited by salinity stress for plants: osmotic stress and ionic toxicity; Osmotic inhibition is the result of the salt presented in the soil solution which reduces the ability of the plant to take up water, and minerals such as K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> (Munns *et al.*, 2006). Ionic toxicity is caused by an excessive amount of salt entering the transpiration stream which eventually injures cells in the transpiring leaves and may further reduce growth (Munns *et al.*, 2006). Reduction in growth and photosynthesis are among the most conspicuous effects of salinity stress. In addition, the primary effect of high salinity in plants is stomatal closure. The latter reduces transpiration and CO<sub>2</sub>, and appears to be the main cause of reduced photosynthetic activity (Pelleschi *et al.*, 1997).

Basically, the lack of CO<sub>2</sub> may have a direct effect on the leaf carbohydrate content by generating a translocation pattern (Pelleschi *et al.*, 1997). Salt stress causes accumulation of carbohydrates in plant tissues, which contributes in osmotic adjustment (Pattanagul & Thitisaksakul, 2008).

During osmotic adjustment the cells tend to synthesize and accumulate compatible organic solutes in the cytoplasm in order to maintain the osmotic equilibrium (Blum *et al.*, 1996; Hazewaga *et al.*, 2000). Sugar

accumulation in plant tissues and cells due to salinity stress was reported in many studies (Tattini *et al.*, 1996).

In many plant species, the absolute osmolyte concentrations maintain osmotic equilibrium (Martínez-Ballesta, 2004). Other advantages of these solutes include buffering the potential of cellular redox and protecting cellular structure under a stress condition. Despite the large number of studies that have been conducted regarding salt tolerance for *Opuntia* species (Murillo-Amador *et al.*, 2001; Cony *et al.*, 2006; Véliz *et al.*, 2007; Ochoa-Alfaro *et al.*, 2008; Franco-Salazar & Éliz, 2008; Nieto-Garibay *et al.*, 2011, Salas-Muñoz, 2012), the basic mechanisms governing salt tolerance in *Opuntia* are not yet understood and a more advanced work is required in this research area.

The objective of the present work was to evaluate the salt tolerance in five *Opuntia* species and to classify the species as highly salt tolerant (HST), salt tolerant (ST) or moderately salt tolerant (MST). We used three levels of NaCl concentration (200 mM, 400 mM and 600 mM), and the physio-biochemical changes have been estimated using multivariate and cluster analyses.

### Materials and Methods

**Plant material and salt stress application:** The present investigation is based on five *Opuntia* species (*Opuntia ficus indica* Mill. f. *inermis* (O.I), *Opuntia amyclea* (O.A), *Opuntia engelmannii* (O.E), *Opuntia robusta* (O.R) and *Opuntia streptacantha* (O.S) growing naturally in the Algerian steppes and belonging to the arid and semi-arid climatic regions (Table 1).

During the random sampling survey, we selected 10 plants from each species and 4 cladodes were sampled from each plant. Thus, a total number of 40 cladodes have been taken from each species. A total of 200 cladodes for the five species were used in this experiment.

The collected cladodes were planted during the period of 2014 using 2L plastic pots, the volume of each pot was filled with sand and placed under natural growing conditions. Experimentation has been achieved in a completely randomized design with ten replicates per species and also per concentration. The pots were watered on a weekly basis by distilled water. Salinity stress was induced to the generated plants after the second year of culture. All the samples were exposed to salinity treatments during a period of sixty days (2 months). The treatments included four different NaCl concentration levels (0, 200, 400 and 600 mM), where 0 mM was for the control treatment.

For each species, a total of 40 samples were considered, with 10 samples per concentration were used during the analysis. Variation of tolerance to salt stress within the studied genotypes was evaluated based on different physio-biochemical traits, and after 60 days after of the salt stress treatments. Plant material samples (young cladodes, aged cladodes, and roots) were collected for further analysis (Fig. 1).

**Evaluation process:** The measure of the levels of chlorophyll a (Chl<sub>a</sub>), chlorophyll b (Chl<sub>b</sub>) and the total chlorophyll content (TC) for aged and young cladodes was performed using MacKinney method (Mackinney, 1941). Chl<sub>a</sub> and Chl<sub>b</sub> contents have been measured for each sample, then we obtained the following estimates: ACChl<sub>a</sub>: aged cladode chlorophyll a, YCChl<sub>a</sub>: young cladode chlorophyll a, ACChl<sub>b</sub>: aged cladode chlorophyll b, YCChl<sub>b</sub>: young cladode chlorophyll b, ACTC: aged cladode total chlorophyll, and YCTC: young cladode total chlorophyll.

The spectrophotometer UV-1800 SHIMADZU was used to measure the Optical Density (OD) at two specific

wavelengths 663 nm and 645 nm. Concentrations of Chl<sub>a</sub>, Chl<sub>b</sub> and TC ( $\mu\text{g g}^{-1}$  FW) were estimated separately using the following equations:

$$\text{Chl}_a = (12.7 \text{ OD}_{663} - 2.59 \text{ OD}_{645}) \times V / (1000 \times m)$$

$$\text{Chl}_b = (22.9 \text{ OD}_{645} - 4.68 \text{ OD}_{663}) \times V / (1000 \times m)$$

$$\text{TC} = \text{Ch}_a + \text{Ch}_b$$

where, V is the volume of extracted solution, m is the weight of fresh matter and OD is the optical density.

**Soluble sugar contents:** we adopted the acronyms ACS, YCS and RS respectively for soluble sugars contents of aged cladodes, young cladodes and roots. The measurements were performed following Dubois *et al.* method (Dubois *et al.*, 1956). The absorbance was read in a spectrophotometer UV-1800 SHIMADZU at a wavelength of 490 nm and the results were expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW.

**Proline contents:** we adopted the acronyms ACP, YCP and RP respectively for Proline content in aged cladodes, young cladodes and roots. The Monneveux & Nemmar (1986) technique was used for the quantification of Proline. Samples of 100 mg of fresh weight and 2 ml of 40% methanol were placed in test tubes and warm water bath at 85°C for 60 min. In order to avoid the alcohol evaporation, the tubes were covered with an aluminum foil during the heating. After cooling, 1 ml is removed from the extract and added with 1 ml of acetic acid, 80 ml of orthophosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, density 1.7) and ninhydrin (25 mg per sample). The mixture was boiled for 30 min, until the solution turns red. After cooling, 5 ml of toluene were added per sample. Two phases were formed, the upper phase containing proline and the lower phase without proline. After retrieving the upper phase, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> was added using a spatula to remove water. The optical densities of the samples were determined using a spectrophotometer UV-1800 SHIMADZU adjusted in wavelength 528 nm, and as the previous technique, the results are expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  FW.

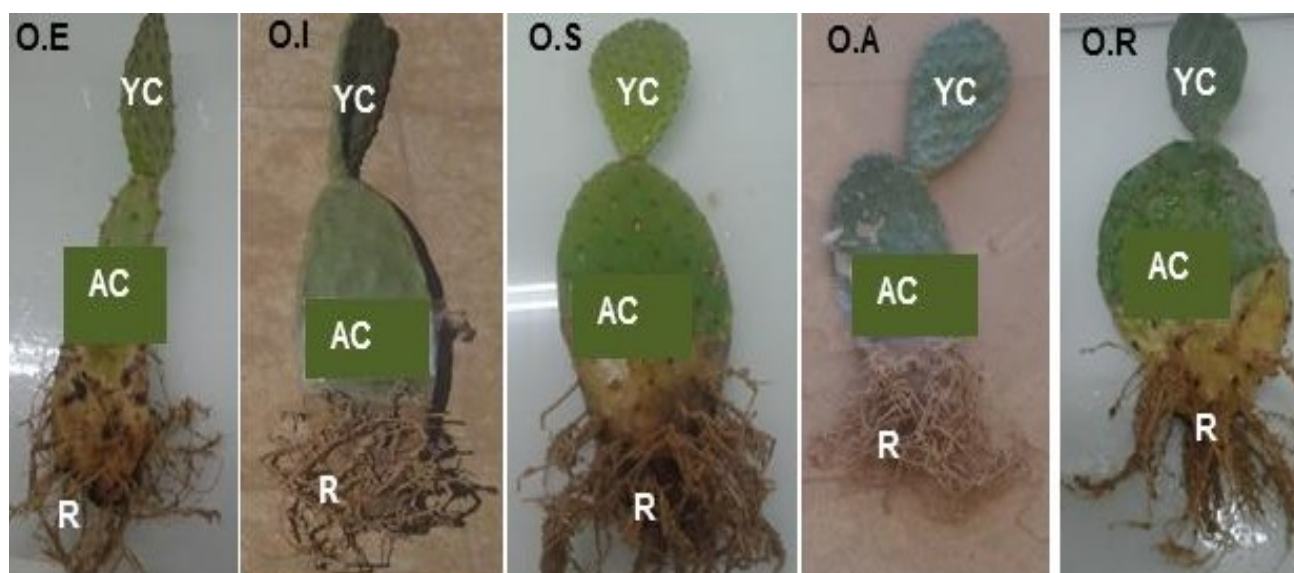


Fig. 1. Illustration of the different *Opuntia* sampling organs used during the experimental analysis (YC for Young cladode samples; AC for aged cladode samples and R for root samples).

**Data analysis:** The results were analyzed by comparing F ratio values obtained from one-way ANOVA (Fast statistics v 2.0.4). The least amplitude significant differences (PPAS) between the mean at 95% confidence interval, were determined whether there is significant interaction between species and treatments (G x T). Physio-biochemical data were analyzed using multivariate analysis, clustering analysis using XLSTAT software (Addinsoft, [www.xlstat.com](http://www.xlstat.com)); principal component analysis (PCA) was performed to identify species groups and to determine the axes and the factors significantly contributing to the variation. In this procedure, the similarity matrix was used to generate eigen values and scores for the species. The first two principal components, which accounted for the highest variation, were then used to plot two dimensional scatter plots. HCA was carried out using Ward's minimum variance method as a clustering algorithm (Williams, 1976) and squared Euclidean distances as a measure of dissimilarity (Ward, 1963).

## Results

Four levels of applied stress (0, 200, 400 and 600 mM NaCl concentrations) have been applied in order to test the direct effect of salinity on different physio-biochemical parameters of *Opuntia* species.

Four species (*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, *O. amyoclea*, *O. streptacantha* and *O. engelmannii*) were used for the evaluation of salt tolerance (200 and 400 mM). The species *O. robusta* was excluded because it was totally damaged by the first levels of stress (200 and 400 mM) while the three species (*O. ficus indica* Mill. f. *inermis*, *O. streptacantha* and *O. engelmannii*) were used for the evaluation of salt tolerance at 600 mM.

**Stress 200 mM NaCl:** Statistical analysis revealed significant differences between the species O.I, O.A, O.S, and O.E 60 days after treatment with 200 mM NaCl (Table 2). One-way ANOVA indicates a significant effect of salinity on the proline contents for root, aged and young cladodes (RP, ACP, YCP), soluble sugar contents for root, aged and young cladodes (RS, ACS, YCS) and chlorophyll a, b and total chlorophyll content for aged and young cladodes (ACChl<sub>a</sub>, YCChl<sub>a</sub>, AGChl<sub>b</sub>, YCChl<sub>b</sub>, ACTC, YCTC) (Table 2). Young cladode total chlorophyll content (YCTC) and young cladode chlorophyll b content (YCChl<sub>b</sub>) were found to be the most discriminant parameters, followed by ACTC, ACChl<sub>b</sub>, YCS, YCChl<sub>a</sub>, ACChl<sub>a</sub>, ACS, RS, YCP, ACP and RP (F ratio > F critical). The most discriminant parameter young cladode total chlorophyll content (YCTC) was affected by salinity in all the studied species (Table 2). O.I and O.A exhibited a decrease in young cladode total chlorophyll content of 48.71 and 41.99% respectively. Moreover, O.S exhibited an important decrease in young cladode total chlorophyll content of 62.17%. On the other hand, O.E exhibited an increase of 39.12%. There was a high decrease of more than 57% in the chlorophyll b content of young cladodes in O.I, O.A and O.S, while, we observed an increase of 23.54% in O.E (Table 2). The matrix of correlations reveals a strong negative correlation of total content chlorophyll in young cladode with total soluble sugar roots ( $r = -0.94$ ) and total soluble sugar content of older cladodes ( $r = -0.968$ ).

PCA revealed that the first and second principal components (PC) accounting for 49.72, and 39.12 % of variation among the traits, respectively. The first PC comprised of RS, ACS, ACTC, YCTC, YCChl<sub>b</sub>, and ACChl<sub>b</sub>, while the second PC involved RP, ACP, YCP, ACChl<sub>a</sub>, and YCS. The PCA plots confirm young cladode chlorophyll total content and young cladode chlorophyll b content as the most discriminant parameters.

This analysis showed that the parameters, soluble sugar contents for root and aged cladodes (RS, ACS) is correlated to the first axis, while the soluble sugar contents for young cladodes (YCS) parameter is correlated to the second axis inversely to what was noted at the control (0 mM) (Figs. 2A and 2B). There were differences in clustering of species in Fig. 2C compared to that observed in Figs. 2A and 2B.

The maximum Euclidean distance of 160.4 was observed between species O.S. and O.E. The lowest Euclidean distance was observed between O.I and O.A with only 36.9. The Euclidean distance between O.I and O.E was moderate with 85.069, due to their genetic similarity. In order to group the species based on 12 physio-biochemical parameters, Cluster Analysis (CA) and Ward method were performed. This analysis grouped the genotypes into three categories: C1 for the category of Highly Salt Tolerant (HST) species, including O.I and O.A. C2 for Moderately Salt Tolerant (MST), including O.S, and C3 Salt Tolerant (ST) for O.E (Fig. 2D). Clusters 1 and 3 had the lowest genetic distance (86.2), while cluster 3 and 2 had the highest genetic distance (160.4). Groups in cluster analysis were similar to the groups of two dimensional plot of PCA. Thus, both analyses validated each other.

**Stress 400 mM NaCl:** Statistical analysis showed significant differences between the species O.I, O.A, O.S, and O.E sixty days after salt stress treatment at 400 mM NaCl (Table 3). The data of one-way ANOVA based on table 3, indicates a significant effect of salinity on the proline content for root, aged cladodes and young cladode (RP, ACP, YCP), sugar soluble content for root, aged cladode and young cladode (RS, ACS, YCS) and chlorophyll a, b and total content for aged and young cladodes (ACChl<sub>a</sub>, YCChl<sub>a</sub>, AGChl<sub>b</sub>, YCChl<sub>b</sub>, ACTC, YCTC). Aged cladode total chlorophyll content (ACTC) and young cladode total chlorophyll content (YCTC) were found to be the most discriminant parameters (F ratio > F critical). ACChl<sub>b</sub>, YCChl<sub>a</sub>, ACChl<sub>a</sub>, YCS, YCChl<sub>b</sub>, RS, YCP, ACP, RP and ACS also reflected G×T effects but the F-ratio were relatively low (Table 3). The most discriminant parameters aged cladode, total chlorophyll (ACTC) and young cladode total chlorophyll content (YCTC), were affected by salinity in all species (Table 3). For all species, aged cladode total chlorophyll content and young cladode total chlorophyll content showed significant decrease. This decrease was higher and faster in O.S (from  $0.6 \pm 1$  in control plants to  $0.072 \pm 1.02$  and from  $1.15 \pm 1$  in control plants to  $0.083 \pm 1$  in stressed plants). There was a strong negative correlation ( $r = -0.971$ ) between aged cladode total chlorophyll content and the total soluble sugar content of older cladodes.

Table 1. Locations and bioclimatic characteristics of the original sampling sites for the five studied *Opuntia* species.

Species	<i>O. ficus indica</i> Mill. <i>f. inermis</i> (OI)	<i>O. amyklea</i> (OA)	<i>O. streptacantha</i> (OS)	<i>O. robusta</i> (OR)	<i>O. engelmannii</i> (OE)
Species locality	Belaiba ( M'sila)	Doukkara (Tébessa)	Choucha (Laghouat)	Mesrane (Djelfa)	
Latitude	35° 36'	35° 58'	34° 8'	34° 36'	
Longitude	05° 17'	8° 14'	3° 01'	3° 03'	
Minima (C°)	13,0	10,1	9,36	9,47	
Maxima (C°)	24,3	22,3	23,0	23,3	
Precipitation (mm)	238,2	406,7	236,4	229	
Bioclimatic floor	Semi-arid mild winter	Semi-arid cold winter	Semi-arid cold winter	Semi-arid mild winter	

Table 2. Physiological and biochemical parameters for four *Opuntia* species after 60 days of experimental conditions and salt stress (0 and 200 mM of NaCl), Values bearing the same letter in each line are not significantly different at p<0.05.

	One-way ANOVA													
	<i>O. ficus indica</i> Mill. <i>f. inermis</i> (O.I)		<i>O. amyklea</i> (O.A)		<i>O. streptacantha</i> (O.S)		<i>O. engelmannii</i> (O.E)		Interaction between all genotypes and treatment (GXT)		O.I under salinity	O.A under salinity	O.S under salinity	O.E under salinity
	Control	200 mM	Control	200 mM	Control	200 mM	Control	200 mM	F-ratio	F-critical	F-ratio > F-critical	F-ratio > F-critical	F-ratio > F-critical	F-ratio > F-critical
PR ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.32d	0.51a	0.35c	0.5a	0.13f	0.34c	0.23e	0.46b	182.75	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
ACP ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.86b	0.9a	0.73c	0.88ab	0.3f	0.68d	0.4e	0.75c	190.14	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
YCP ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.7c	0.89a	0.7c	0.84b	0.3f	0.6d	0.45e	0.84b	510.75	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
RS ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	42b	15.8f	16.7f	24.9c	16f	20e	22.5d	50a	706.02	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
ACS ( $\mu\text{g}^{-1}\text{FW}$ )	44b	17.3e	23.3d	29.2c	53a	28.3c	54a	54a	721.46	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Non<
YCS ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	42e	44.3d	18.4h	36.1f	23g	64c	89a	73b	875.01	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
ACTC ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.67e	0.58g	1.42a	0.99d	0.6f	0.50h	1.29b	1.17c	12290	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
YCTC ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.70e	0.35g	1.23b	0.71e	1.1c	0.43f	1.02d	1.42a	708692	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
ACCCh <sub>a</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.47b	0.42c	0.52a	0.47b	0.4d	0.31e	0.42c	0.32e	723.29	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
YCCCh <sub>a</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.41d	0.23g	0.37e	0.47b	0.8a	0.3f	0.23g	0.45c	790.75	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
ACCCh <sub>b</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.19e	0.15f	0.91a	0.52d	0.2e	0.19e	0.87b	0.85c	12282	4.06	Yes>	Yes>	Non<	Yes>
YCCCh <sub>b</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.28f	0.12g	0.85b	0.32e	0.3d	0.13g	0.79c	0.97a	482918	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>

RP = Proline content for root; ACP = proline content for aged cladode proline; YCP = proline content for young cladode proline; RS = soluble sugar content for root; ACS = soluble sugar content for aged cladode; YCS= soluble sugar content for young cladode; ACTC: total chlorophyll content for aged cladode, YCTC: total chlorophyll content for young cladode; ACCCh<sub>a</sub>: chlorophyll a content for aged cladode, YCCCh<sub>a</sub>: chlorophyll a content for young cladode, ACCCh<sub>b</sub>: chlorophyll b content for aged cladode, YCCCh<sub>b</sub>: chlorophyll b content for young cladode

**Table 3. Physiological and biochemical parameters for four *Opuntia* species after 60 days of experimental conditions and salt stress (0 and 400 mM of NaCl). Values bearing the same letter in each line are not significantly different at  $p < 0.05$ .**

	One-way ANOVA													
	<i>O. ficus indica</i> Mill.f. <i>inermis</i> (O.I)		<i>O. amyalea</i> (O.A)		<i>O. streptacantha</i> (O.S)		<i>O. engelmannii</i> (O.E)		Interaction between all genotypes and treatment (GXT)					
	Control	400 mM	Control	400 mM	Control	400 mM	Control	400 mM	F-ratio	F-critical				
PR ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.32e	0.54b	0.35d	0.54b	0.13g	0.45c	0.23f	0.67a	184.0	4.06	Yes>	Yes>	O.S under salinity	O.E under salinity
ACP ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.86b	0.96a	0.73d	0.95a	0.30g	0.7e	0.4f	0.78c	494.7	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
YCP ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.7d	0.95a	0.7d	0.91b	0.32g	0.6e	0.45f	0.89c	552.0	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
RS ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	42c	18.6f	16.7g	27.4d	16g	50b	22.5e	58a	1031.	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
ACS ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	44d	64b	23.3e	54c	53c	71a	54c	70a	182.7	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
YCS ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	42d	18.9g	18.4g	27.5e	23f	55c	89a	80b	2311.	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
ACTC ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.67d	0.50f	1.42a	0.94c	0.6e	0.07h	1.29b	0.33g	402290	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
YCTC ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.70d	0.33f	1.23a	0.55e	1.16b	0.08h	1.02c	0.23g	116414	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
ACCCh <sub>a</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.47b	0.35f	0.52a	0.45c	0.4e	0.05h	0.42d	0.1g	4455.5	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
YCCCh <sub>a</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.41b	0.20e	0.37c	0.13f	0.8a	0.05g	0.23d	0.03h	18801	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
ACCCh <sub>b</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.19e	0.15f	0.91a	0.48c	0.2e	0.02g	0.87b	0.23d	111798	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>
YCCCh <sub>b</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.28e	0.12g	0.85a	0.42c	0.36d	0.02h	0.79b	0.2f	1679.9	4.06	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>

RP = Proline content for root; ACP = proline content for aged cladode proline; YCP = proline content for young cladode proline; RS = soluble sugar content for root; ACS = soluble sugar content for aged cladode; YCS = soluble sugar content for young cladode; ACTC: total chlorophyll content for aged cladode, YCTC: total chlorophyll content for young cladode; ACCCh<sub>a</sub>: chlorophyll a content for aged cladode, YCCCh<sub>a</sub>: chlorophyll a content for young cladode, ACCCh<sub>b</sub>: chlorophyll b content for aged cladode, YCCCh<sub>b</sub>: chlorophyll b content for young cladode

**Table 4. Physiological and biochemical parameters for three *Opuntia* species after 60 days of experimental conditions and salt stress (0 and 600 mM of NaCl). Values bearing the same letter in each line are not significantly different at  $p < 0.05$ .**

	One-way ANOVA													
	<i>O. ficus indica</i> Mill.f. <i>inermis</i> (O.I)		<i>O. streptacantha</i> (O.S)		<i>O. engelmannii</i> (O.E)		Interaction between all genotypes and treatment (GXT)		O.I under salinity		O.A under salinity		O.S under salinity	
	Control	600 mM	Control	600 mM	Control	600 mM	Control	600 mM	F-ratio	F-critical	F-ratio > F-critical	F-ratio > F-critical	F-ratio > F-critical	
PR ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.32d	0.6b	0.13f	0.44c	0.23e	0.67a	0.67a	417	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
ACP ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.86b	0.985a	0.30f	0.62d	0.4e	0.79c	0.79c	964.6486	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
YCP ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.7c	0.98a	0.32f	0.53d	0.45e	0.93b	0.93b	1825	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
RS ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	42c	28.7d	16f	69a	22.5e	63b	63b	1418.29	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
ACS ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	44e	87b	53d	98a	54d	63c	63c	961.0	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
YCS ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	42d	28.7e	23f	75c	89b	95a	95a	3469.69	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
ACTC ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.67b	0.15f	0.6c	0.47d	1.3a	0.16e	0.16e	2833.61	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
YCTC ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.70c	0.22d	1.16a	0.05f	1.02b	0.15	0.15	655.52	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
ACCCh <sub>a</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.47a	0.04d	0.4b	0.29c	0.42d	0.06b	0.06b	58273	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
YCCCh <sub>a</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.41b	0.19d	0.8a	0.03e	0.2c	0.04e	0.04e	21979	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	
ACCCh <sub>b</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.19b	0.10c	0.2b	0.17b	0.8a	0.1c	0.1c	4903	5.14	Yes>	Non<	Yes>	Yes>	
YCCCh <sub>b</sub> ( $\mu\text{gg}^{-1}\text{FW}$ )	0.28c	0.13d	0.36b	0.01f	0.8a	0.1e	0.1e	156.00	5.14	Yes>	Yes>	Yes>	Yes>	

RP = Proline content for root; ACP = proline content for aged cladode proline; YCP = proline content for young cladode proline; RS = soluble sugar content for root; ACS = soluble sugar content for aged cladode; YCS = soluble sugar content for young cladode; ACTC: total chlorophyll content for aged cladode, YCTC: total chlorophyll content for young cladode; ACCCh<sub>a</sub>: chlorophyll a content for aged cladode, YCCCh<sub>a</sub>: chlorophyll a content for young cladode, ACCCh<sub>b</sub>: chlorophyll b content for aged cladode, YCCCh<sub>b</sub>: chlorophyll b content for young cladode



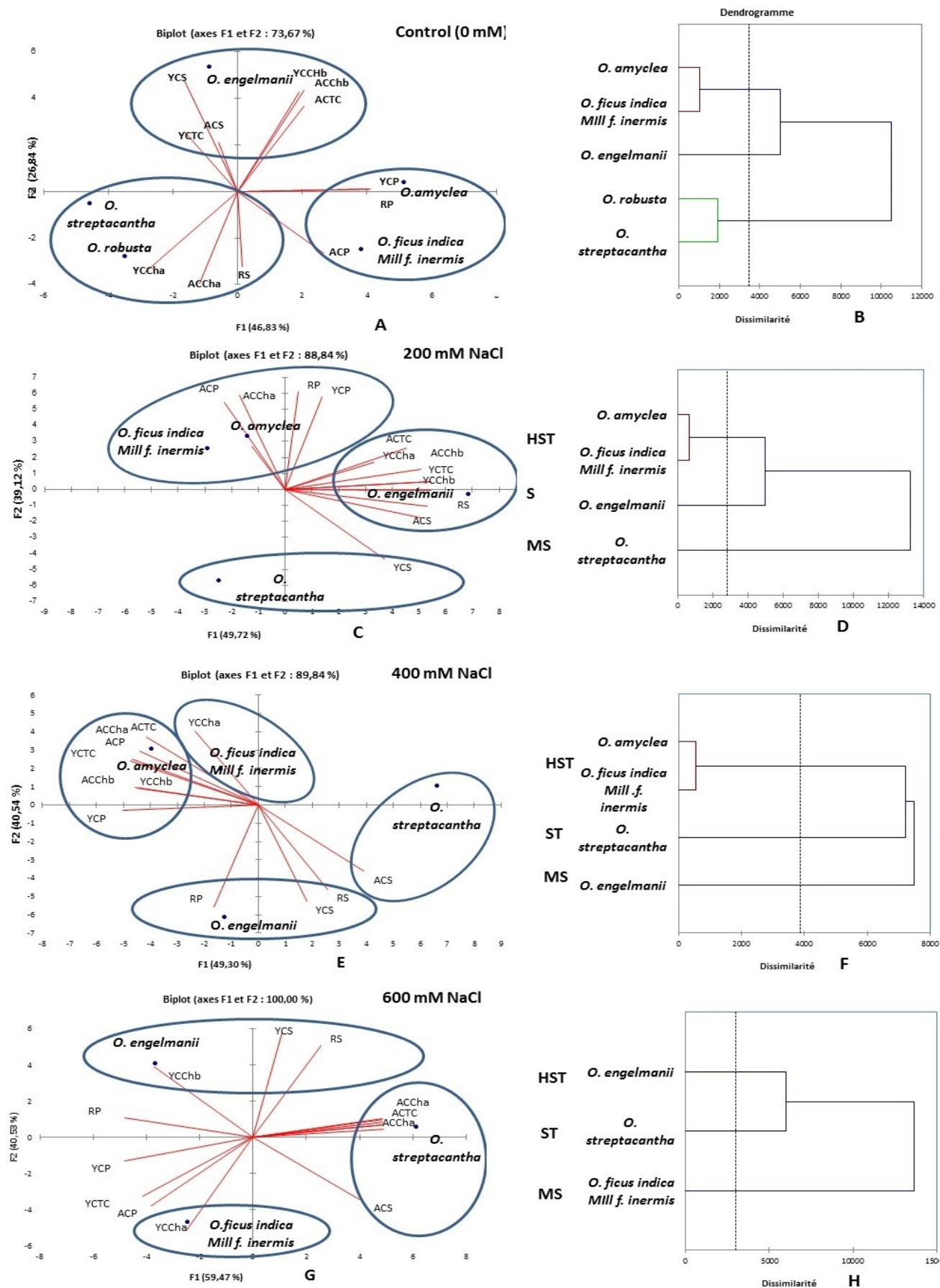


Fig. 2. Left: Biplot display of *Opuntia* species according to the first and second PCA components under salt stress conditions (200, 400 and 600 mM of NaCl). Right: Cluster analysis using 12 physio-biochemical traits: Highly salt tolerant (HST), salt tolerant (ST) moderately salt tolerant (MST).

PCA revealed that the first, second and third principal components accounting for 49.29, 40.53 and 10.16 % of the observed variation between traits, respectively. The first component comprised of ACP, YCP, ACS, ACTC, YCTC, ACCh<sub>a</sub>, ACCh<sub>b</sub>, YCCh<sub>b</sub>. The second component involved RP and YCS. The third component comprised of YCCh<sub>a</sub>, and ACL. The PCA plots confirmed that aged cladode total chlorophyll content is the most discriminant parameter.

This analysis showed that the parameters, sugar soluble content for root and aged cladode (RS, ACS) are correlated to the first axis, while the sugar soluble for young cladode (YCS) parameter is correlated to the third axis which was the opposite of what was observed for the control (0 mM) (Figs. 2A and 2B). The distribution of species in the Fig. 2E based on the two axes gave different clustering.

The maximum Euclidean distance was observed between species O.S and O.E (120.4). The lowest Euclidean distance was observed between species O.I and O.A (33.1), which described their genetic similarity. In order to group the species by considering all the attributes, cluster analysis and Ward's method were performed. This analysis generated three clusters: C 1 included HST (O.A, O.I), C2 included ST (O.S) and C3 included MST (O.E) (Fig. 2F). Clusters 2 and 3 had the highest genetic distance (120.4).

**Stress 600 mM NaCl:** Statistical analysis revealed significant differences between the species O.I, O.A, O.S, and O.E sixty days after treatment with a salt concentration of 600 mM (Table 4). The data of one-way ANOVA (Table 4), showed a significant effect of salinity on the chlorophyll a, b and total content for aged and young cladodes (ACCh<sub>a</sub>, YCCh<sub>a</sub>, AGCh<sub>b</sub>, ACTC, YCTC), proline content for root, aged and young cladode (RP, ACP, YCP), sugar soluble content for root, aged and young cladode (RS, ACS, YCS). Aged cladode chlorophyll a content (ACCh<sub>a</sub>) was found to be the most discriminant parameter ( $F$  ratio >  $F$  critical, Table 4). The YCCh<sub>a</sub> and RP also reflected  $G \times T$  effects but the  $F$ -ratio was relatively low (Table 4). Aged cladode and chlorophyll a content was affected by salinity in all species (Table 4) O.E, O.S and O.I exhibited a decrease of 26, 84.76, and 89.97 % respectively (Table 4). There was a strong positive correlation ( $r = 1$ ) between this parameter with aged cladode total chlorophyll content.

In order to study the relationship between all the parameters for two levels of salt stress (control, 600 mM), PCA revealed that the first and second principal components accounted for 59.47 and 40.53% of the observed variation between traits, respectively. The first component comprised of ACS, ACTC, ACCh<sub>a</sub> and ACCh<sub>b</sub>. The second component involved RS, YCS, YCCh<sub>a</sub> and YCCh<sub>b</sub>. The PCA plots confirmed that aged cladode chlorophyll a content was the most discriminant parameter.

In contrast to what was observed at 0 mM of NaCl (control), the parameters, chlorophyll a, b and total content for aged cladode (ACCh<sub>a</sub>, ACCh<sub>b</sub>, ACTC), chlorophyll total content for young cladode (YCTC) (Figs. 2A and 2B). The distribution of species in Fig. 2G based on the two axes has not kept the same grouping.

The maximum Euclidean distance was observed between species O.S and O.I (157.9), the lowest Euclidean distance was observed between species O.S and O.E (109.5), which described their genetic similarity. In order to group species based on all attributes, a cluster analysis and Ward method were performed. This analysis clustered the genotypes into three categories such as highly salt tolerance, C1 (O.E), salt tolerant, C2 (O.S) and moderately salt tolerant, C3 (O.I), (Fig. 2H). Clusters 1 and 2 had the lowest genetic distance (109.5). Groups in cluster analysis were similar to the groups of two dimensional PCA plots

## Discussion

The ANOVA showed that photosynthetic pigments including total chlorophyll content of young cladode, young cladode's chlorophyll b content, total chlorophyll of aged cladode and chlorophyll a of aged cladode, were the most discriminant parameters. Moreover, the correlation matrix reveals strong negative correlation of total chlorophyll content in young cladode with total soluble sugar roots ( $r = 0.94$ ) and total soluble sugar content of older cladodes ( $r = 0.968$ ).

The physiological response, analyzed during the expression of the accumulation of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content in O.I, O.A, O.E and O.S. for the three NaCl concentrations 200, 400 and 600 mM, showed that these compounds can be accumulated by different plant organs. The level of accumulation varies from one organ to another and also from one species to another, which depends on the applied salt concentration.

In O.E, O.A species, the accumulation of chlorophyll a, chlorophyll b content and total chlorophyll content is the highest for young cladode, aged cladodes, under normal conditions or under salt stress (200, 400 and 600 mM). In the young cladodes, the chlorophyll b content was higher than chlorophyll a content. This result was in agreement with those of Akça&Samsunlu (2012) on walnut genotypes. The total chlorophyll content and chlorophyll b content in the O.E stressed by NaCl (200, 400 mM) increased much more in young cladodes compared to aged cladodes. This result agrees with the study of Silva-Ortega *et al.* (2007) on cactus pear.

In O.I, chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content showed significant reduction in comparison to the control under salt stress both at 200, 400 and 600 mM. However, Chlorophyll b in young cladode was higher compared to chlorophyll a and total chlorophyll in young cladode. In comparison with the control, at 600 mM there was a decrease in chlorophyll a (young cladode), total chlorophyll content (young cladode) and chlorophyll b content (young cladode) with 53.28 %, 67.71 and 88.23 % respectively. In the aged cladodes, the total chlorophyll content was higher than the total chlorophyll in young cladode.

In O.S, there was a significant reduction in chlorophyll a and chlorophyll b of both aged cladode and young cladode, in addition to the total chlorophyll content of aged cladode and young cladode under salt stress at 200, 400 and 600 mM compared to the control. However,

it was observed that this species showed the maximum reduction in chlorophyll content with the increase in salt concentration. In the young cladodes, the total chlorophyll content was higher than that observed in aged cladode.

The results of this study, regarding the decrease in chlorophyll a, b, and total chlorophyll agree with what was obtained by Cha-um *et al.* (2013) who pointed out that the exposure of Cactus (*Echinopsis calochlora*) to zero, 50, 100 and 200 mM of NaCl led to the decrease of chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content. In another study on maize,

Cha-um & Kirdmanee (2009) showed that chlorophyll a, b and total chlorophyll decreased under salt stress. Similar results of decrease in total chlorophyll content when increasing salt concentration were also observed on *Atriplex halimus* (L.), (Sadder *et al.*, 2013), on *Vigna subterranean* (L.) (Taffouo *et al.*, 2010), and on beans (*Phaseolus vulgaris* L.) (Stoeva & Kaymakanova, 2008).

Decrease in chlorophyll content with the increase of salt concentrations is a general phenomenon which leads to disordering synthesizing chlorophyll (Parida & Das, 2005). According to Rao & Rao (1981) salinity stress decreases total chlorophyll content by increasing the chlorophyllase enzyme activity (Blumenthal-Goldschmidt & Poljakoff-Mayber, 1968). In another study, Ali *et al.* (2004) attributed this reduction in chlorophyll by NaCl to the inhibitory effect of the accumulated ions of various salts on the biosynthesis of the chlorophyll a, b, and total chlorophyll. Salinity affects the forces of bringing the complex pigment protein-liquid into the chloroplast. As the chloroplast stability depends on the membrane safety (Yeo *et al.*, 1990) which under high salinity condition could not remain intact. The reduction in chlorophyll content under salt tolerance is not a function of single organ, but it is the product of all the plant attributes (Ali *et al.*, 2004).

The present study showed that the concentration of soluble sugars in the different organs of all *Opuntia* species increased with the increase salt concentration. The accumulation of soluble sugars was higher in cladode than in roots under normal conditions or under salt stress (200, 400 and 600 mM NaCl). Benhassaini *et al.* (2012) reported an increase in the content of total soluble sugars in *Pistacia atlantica* Desf. sub sp. *atlantica* in a salt stress situation. Lallouche *et al.* (2015) observed a higher accumulation of soluble sugars in *O. engelmannii* and *O. streptacantha* at 600 mM NaCl stress. Sugars play an important role in osmotic adjustment, as well as at stabilization of some proteins. The accumulation of sugars seems to induce gelation of the cell contents by saturating the intracellular environment. This phenomenon avoids the crystallization of cell molecules, which limits the damage of cellular structures (Dubos, 2001). Consequently, there is a direct correlation between the amount of soluble sugars and the levels of proline. Therefore, the proline and soluble sugars of the different species correlate reasonably well.

## Conclusion

The present study investigated the response of five *Opuntia* species to four sodium chloride concentrations (0, 200, 400, and 600 mM). With regard to physio-biochemical parameters. The tested species in this study, *O. engelmannii* (O.E) and *O. streptacantha* (O.S) were found to be the least affected by salinity stress, followed

by *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* (O.I). Based on the analysis of the most discriminant parameters, we concluded that *O. engelmannii* (O.E) was highly salt tolerant compared to other *Opuntia* species, while *O. ficus indica* Mill. f. *inermis* (O.I) was moderately salt tolerant. On the other hand, *O. amyoclea* (O.A) under salt stress 600 mM and *O. robusta* (O.R) under salt stress 200, 400 and 600 mM were susceptible species. According to our findings, the young cladode, aged cladode total chlorophyll content (YCTC, ACTC), aged cladode chlorophyll a content (ACCh<sub>a</sub>) and root total soluble sugars can be used effectively as salt tolerance parameters of *Opuntia* species.

## References

- Akça, Y. and E. Samsunlu. 2012. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline and nutrient accumulation, and K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratio in walnut. *Pak. J. Bot.*, 44(5): 1513-1520.
- Ali, Y., Z. Aslam, M.Y. Ashraf and G.R. Thair. 2004. Effect of salinity on chlorophyll concentration, leaf area, yield and yield components of rice genotypes grown under saline environment. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 1: 221-22.
- Benhassaini, H., A. Fetati, A.K. Hocine and M. Belkhdja. 2012. Effect of salt stress on growth and accumulation of proline and soluble sugars on plantlets of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* used as rootstocks. *Biotechnol. Agron. Soc. Envir.*, 16(2): 159-165.
- Blum, A., R. Munns, J.B. Passioura and N.C. Turner. 1996. Genetically engineered plants resistant to soil drying and salt stress: How to interpret osmotic relations. *Plant Physiol.*, 110 (4): 1051-1053.
- Blumenthal-Goldschmidt, S. and A. Poljakoff-Mayber. 1968. Effect of substrate salinity on growth and submicroscopic structure on leaf cells of *Atriplex halimus* L. *Aust. J. Bot.*, 16(3): 469-478.
- Cha-um, S. and C. Kirdmanee. 2009. Effect of salt stress on proline accumulation, photosynthetic ability and growth characters in two maize cultivars. *Pak. J. Bot.*, 41(1): 87-98.
- Cha-um, S., T. Samphumphuang and C. Kirdmanee. 2013. Morphological and Physio-biochemical Changes of *in Vitro* Cactus (*Echinopsis calochlora*) in Responses to Salt Stress. *Europ. J. Hort. Sci.*, 78(5): 225-231.
- Cony, M.A., S.O. Trione and J.C. Guevara. 2006. Macrophysiological responses of two forage *Opuntia* Species to salt stress. *J. Prof. Assoc. Cactus.*, 8: 52-62.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, Rebers, P.A and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28: 350-356.
- Dubos, C. 2001. Réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique en milieu hydroponique. Thèse de Doc. Université Henri Poincaré. Nancy I. pp. 54-55.
- Franco-Salazar, V.A. and J.A. Véliz. 2008. Effects of salinity on growth, titrable acidity and chlorophyll concentration in *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. Saber, Universidad de Oriente, Venezuela. 20(1): 12-17.
- Gilbert, G.A., M.V. Gadush, G.C. Wilson and M.A. Madore. 1998. Amino acid accumulation in sink and source tissues of *Coleus blumei* Benth. during salinity stress, *J. Exp. Bot.*, 49: 107.
- Hazewaga, P., R.A. Bressan, J.K. Zhu and J. Bohnert. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51: 463-499.



- Khan, F., K. R. Hakeem, T.O., Siddiqi and A. Ahmed. 2013. RAPD markers associated with salt tolerance in Soybean genotypes under salt stress. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 170: 257-272.
- Lallouche, B., A. Boutekrabi and B. Hadjkouider. 2015. Effect of salt stress on accumulation of proline and soluble sugars in cladodes and roots of two *Opuntia* species existing in Algerian steppe. *Int. J. Biosci.*, 12: 43-51.
- Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. Biol. Chem.*, 104: 315-322.
- Martínez-Ballesta, M.C., V. Martínez and M. Carvajal. 2004. Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. *Environ. Exp. Bot.*, 52(2): 161-174.
- Monneveux, P. and M. Nemmar. 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.): Etude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie*, 6: 583-590.
- Munns, R.R., A.J. Richard and A. Lauchli. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.*, 57(5): 1025-1043.
- Murillo-Amador, B., A. Cortes-Avila, E. Troyo-Dieguez, A. Nieto-Garibay and H.G. Jones. 2001. Effects of NaCl salinity on growth and production of young cladodes of *Opuntia ficus-indica*. *J. Agron. Crop. Sci.*, 187: 269-279.
- Nieto-Garibay, A., E. Troyo-Dieguez, R.D. Valdez-Cepeda, E. Rueda-Puente, J.L. García-Hernández, A. Flores-Hernández, S. Zamora-Salgado, I. Orona-Castillo and B. Murillo-Amador. 2011. Plant height and mineral content of *Opuntia tapona* growing along the coasts of Baja California Sur, México. *J. Prof. Assoc. Cactus.*, 13: 77-87.
- Ochoa-Alfaro, A.E., C.O. Silva-Ortega, A. Becerra-Flora, J. Flores-Rivas and J.F. Jiménez-Bremont. 2008. Effect of salt stress, proline, and polyamines on seed germination of *Opuntia streptacantha*. *J. Prof. Assoc. Cactus.*, 10: 56-70.
- Parida, A.K., and A.B. Das. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 60 (3): 324-349.
- Pattanagul, W. and M. Thitisaksakul. 2008. Effect of salinity stress on growth and carbohydrate metabolism in three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity tolerance. *Indian. J. Exp. Biol.*, 46: 736-742.
- Pelleschi, S., J.P. Rocher and J.L. Prioul. 1997. Effect of water restriction on carbohydrate metabolism and photosynthesis in mature maize leaves. *Plant. Cell. Environ.*, 20: 493.
- Rao, G.G. and G.R. Rao. 1981. Pigment composition chlorophyllase activity in pigeon pea (*Cajanus indicus Spreng*) and Gingelly (*Sesamum indicum* L.) under NaCl salinity. *Indian J. Experimental. Biol.*, 19: 768-770.
- Sadder, M.T., F. Anwar and A.A. Al-Doss. 2013. Gene expression and physiological analysis of *Atriplex halimus* (L.) under salt stress. *Aust. J. Crop. Sci.*, 7 (1): 112-118.
- Salas-Muñoz, S., G. Gómez-Anduro, P. Delgado-Sánchez, M. Rodríguez-Kessler and J.F. Jiménez-Bremont. 2012. The *Opuntia streptacantha* *OpsHSP18* gene confers salt and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 10154-10175.
- Silva-Ortega, C.O., A.E. Ochoa-Alfaro, J.A. Reyes-Aguero, G.A. Aguado-Santacruz and J.F. Jimenez-Bremont. 2008. Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant. Physiol. & Biochem.*, 46: 82-92.
- Stoeva, N. and M. Kaymakanova. 2008. Effect of salt stress on the growth and photosynthesis rate of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Cent. Eur. Agric.*, 9(3): 385-392.
- Taffouo, V.D., O.F. Wamba, E. Yombi, G.V. Nono and A. Akoe. 2010. Growth, yield, water status and ionic distribution response of three bambara groundnut (*Vigna subterranean* (L.) verdc.) landraces grown under saline conditions. *Int. J. Bot.*, 6(1): 53-58.
- Tattini, M., R. Gucci, A. Romani, A. Baldi and D. Everard. 1996. Changes in non-structural carbohydrates in olive (*Olea europaea*) leaves during root zone salinity stress. *Physiol. Plant.*, 9: 117.
- Véliz, J., V. Franco-Salazar and M. García. 2007. Salinity effect on *Aloe vera* and *Opuntia ficus-indica*: CAM plant of commercial interest. *Rev. Fav. Agron.*, (LUZ). 1: 337-341.
- Ward, J.H.J.R. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *J. Am. Stat. Assoc.*, 58: 236-244.
- Williams, W.T. 1976. Pattern Analysis in Agricultural Science. Elsevier, Melbourne Amsterdam.
- Yeo, A.R., M.E. Yeo, S.A. Flowers and T.J. Flowers. 1990. Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance and their relationship to overall performance. *Theo. Appl. Genet.*, 79: 377-384.

(Received for publication 12 April 2016)