



Original Paper

<http://indexmedicus.afro.who.int>

Effet de l'irradiation gamma des semences de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) sur la résistance au NaCl et l'accumulation de la proline dans les feuilles

Halima EL HADJI DJIBO^{1*} et Jianjun LEI²

¹Laboratoire de Biotechnologies Végétales, Institut National de la Recherche Agronomique du Niger (INRAN)
BP: 429 Niamey, Niger.

²College of Horticulture, South China Agricultural University Guang zhou 510642. Guangdong province,
China.

*Auteur correspondant ; E-mail: nourah36@ymail.com; Phone: 00227 90211037

RESUME

L'objectif de cette expérience est de sélectionner des variétés de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill) résistantes au NaCl grâce à l'irradiation gamma. Son but est d'évaluer l'effet de l'irradiation des graines de tomate sur leur résistance au NaCl et de confirmer celle-ci par l'évaluation de la concentration en proline contenue dans les feuilles des plantes régénérées. Des traitements gamma au cobalt 60 (60Co) ont été appliqués sur des semences de tomate à la température ambiante. Quatre doses d'irradiation ont été appliquées sur les graines à savoir : 0 (témoins) ; 100 ; 150 ; et 200 gray (Gy) à une fréquence de 20 rad.min⁻¹. Les graines ont ensuite été semées sur le milieu MS additionné de différentes concentrations de NaCl. Les résultats ont montré que la germination des graines a été affectée par l'addition du NaCl dans le milieu de culture. Avec l'ajout de 60 mM de sel dans le milieu de culture, une réduction de 50% du taux de germination chez les graines irradiées et non irradiées a été observée. A des concentrations en sel plus élevées (100 mM), seul quelques génotypes parmi les graines irradiées sont capables de germer mais avec un pourcentage de germination trop faible. La durée de germination est plus longue pour les graines irradiées que pour les témoins. 50% et 100% de jours supplémentaires sont nécessaires respectivement pour des concentrations de 60 et 100 mM de NaCl dans le milieu comparativement aux graines non irradiées. La concentration de proline contenue dans les feuilles des plantes régénérées a été déterminée. Les doses d'irradiation appliquées sur les semences ont un effet sur l'accumulation de la proline dans les feuilles de tomate. En effet, le taux de proline augmente avec l'augmentation des doses de radiation.

© 2014 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés: *Lycopersicon esculentum* Mill, irradiation gamma, NaCl, proline.

INTRODUCTION

La salinité est un facteur majeur qui limite le développement des plantes (Sengupta et Majumder, 2009) et est devenue un problème grave en particulier dans les terres

irriguées situées dans les zones semi-arides, où 20-30% de la terre est gravement affecté par le problème de salinité (FAOSTAT, 2002).

© 2014 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v8i4.14>

La tomate est l'une des cultures végétales les plus importantes dans le monde. Beaucoup d'efforts ont été accomplis pour son amélioration grâce à la biotechnologie (Szabolcs, 1994). Dans plusieurs grandes zones de production de tomate, la salinité des sols constitue un problème majeur. En effet, la plupart des cultivars commerciaux de tomate sont très sensibles à la salinité. Comme beaucoup d'autres stress abiotiques, le Stress salin inhibe la croissance des plantes. Chez la tomate, la période la plus sensible à la salinité est le stade de germination des graines (FAOSTAT, 2002). Les effets néfastes de la salinité sur la croissance des plantes sont généralement dus aux multiples perturbations au niveau moléculaire, biochimique et physiologique (Munns, 2002; Tester et Davenport, 2003).

Une des stratégies d'adaptation consiste à synthétiser des osmo-protecteurs, principalement des composés aminés et des sucres, et à les accumuler dans le cytoplasme et les organites (Hasegawa et al., 2000; Bartels et Sunkar, 2005; Ashraf et Harris, 2004; Chen et Jiang, 2010; Ksouri et al., 2012; Majumder et al., 2010). Ces osmolytes, généralement de nature hydrophilique, sont des molécules peu chargées mais polaires et très solubles (Sairam et Tyagi, 2004).

Dans des conditions de stress telles que la sécheresse, la salinité, le gel, ou une forte intensité lumineuse, de nombreuses espèces de plantes accumulent la proline (Mansour et al., 2000 ; Achraf et Harris, 2004; Munns et Tester, 2008 ; Chen et al., 2009). L'implication des solutés tels que la proline dans l'amélioration de la résistance aux stress abiotiques a été mise en évidence par des travaux de génie génétique et de transgénèse végétale (Chen et Murata, 2002; Munns, 2002). Cette molécule protège les membranes et les protéines contre les effets néfastes des concentrations élevées d'ions inorganiques et des températures extrêmes par interaction avec les phospholipides (Blumwald et al., 2000).

Compte tenu des pertes de rendement importantes causées par les stress abiotiques, la sélection *in vitro* de variétés de tomates

résistantes à la salinité couplée avec l'utilisation de l'irradiation gamma peut être un moyen important et efficace pour surmonter le problème.

L'utilisation de l'irradiation gamma pour sélectionner des variétés de tomates résistantes au NaCl et la détermination de la concentration en proline dans les feuilles des plantes issues de semences irradiées et soumises au stress salin n'a jamais été mentionnée dans la littérature.

MATERIEL ET METHODES

Pour cette expérience, le matériel biologique utilisé était constitué de semences de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill, cultivar xiahong) produites par la South China Agricultural University China. Ces graines ont été d'abord exposées à une source de cobalt 60 à la température ambiante (25 °C). Les doses d'irradiation appliquées sur ces semences étaient de 0 (témoin), 100, 150 et 200 Gray à un taux de 20 rad/minute.

Evaluation de l'aptitude à germer des semences irradiées sur un milieu contenant du NaCl

L'aptitude des graines de tomates (irradiées ou non irradiées) à germer dans un milieu contenant différentes concentrations de NaCl a été étudiée et le milieu de culture utilisé était le MS (Murashige and Skoog, 1962). Il a été dilué de moitié ; additionné de quatre concentrations de NaCl: 0 (témoin), 60, 90 et 100 mM. ; 3% de sucre et 7 grammes d'agar agar par litre de milieu. Après avoir ajusté le pH à 5,8, le milieu a été autoclavé à 120 °C pendant une durée de 20 minutes. Un volume de 25 ml de milieu a été coulé dans chacun des flacons en verre de 250 ml. Après une désinfection rapide avec de l'éthanol à 70% (environ 1 minute), les graines sont ensuite lavées trois fois avec de l'eau distillée stérile et trempées dans de l'hypochlorite de sodium (5%) pendant 7 minutes, puis à nouveau lavées soigneusement trois à quatre fois avec de l'eau distillée stérile. Chaque flacon a été inoculé avec 7 graines de tomates irradiées ou non irradiées. Chaque concentration de NaCl a été répétée trois fois.

Les flacons inoculés ont été maintenus dans une chambre de culture à 25 ± 1 °C sous lumière (Photo 1). 19 jours après l'émergence, le pourcentage de germination des graines a été évalué.

Le pourcentage d'inhibition de la germination a été calculé selon la formule suivante :

$$I \% = \frac{X_i - Y_i}{X_i} \times 100$$

X_i est le nombre de graines ayant germées sur le milieu témoin (sans NaCl)

Y_i : est le nombre de graines ayant germées sur le milieu contenant du NaCl

La régénération *in vitro* sur milieu contenant du NaCl

La sélection *in vitro* de cultivars de tomate résistants au NaCl a été effectuée sur un milieu MS additionné de différentes concentrations de ce produit: 0, 60, 90, 100 mM. Afin d'étudier la capacité des explants de feuille de tomate à régénérer des pousses sur un milieu contenant du NaCl, de jeunes plants stériles âgés de 19 jours ont été découpés et cultivés sur milieu MS auquel a été ajouté des hormones : acide indole acétique (AIA): $0,5 \text{ mg} \cdot \Gamma^{-1}$; benzyl adénine (BA): $2,5 \text{ mg} \cdot \Gamma^{-1}$. Chaque flacon a été inoculé avec 5 explants et chaque concentration de NaCl a été répétée 3 fois. Le repiquage a été effectué toutes les deux semaines sur milieu MS contenant les mêmes concentrations de sel et d'hormones : AIA: $0,5 \text{ mg} \cdot \Gamma^{-1}$; BA: $2,5 \text{ mg} \cdot \Gamma^{-1}$.

Détermination de la teneur en proline contenue dans les feuilles des plantes régénérées

Pour l'extraction de la proline, nous avons utilisé la méthode modifiée de Bates et al. (1973). La collecte des échantillons de feuilles de tomate a été réalisée sur des pousses âgées de 40 jours issues de la régénération *in vitro* sur milieu MS additionné de différentes concentrations de NaCl. La proline a été extraite à partir de 0,1 g de feuille fraîchement cueillies. Cinq ml de la solution d'extraction MCW (chloroforme: méthanol: eau) à un rapport de 12: 5: 1 ont été utilisés. Les jeunes feuilles préalablement

lavées avec de l'eau distillée stérile ont été broyées dans un mortier dans la solution d'extraction. Le mélange obtenu a été mis dans un tube à essai auxquels sont ajoutés deux ml d'une solution de ninhydrine et deux ml d'acide acétique glacé. Les tubes à essai fermés contenant le mélange réactionnel ont été mis dans un bain d'eau bouillante pendant 1 h. La réaction a été terminée en plaçant la mixture dans un bain de glacial. L'extraction a été faite avec 4 ml de toluène et la phase chromophore contenant du toluène est ensuite séparée de la phase aqueuse. Un échantillon constitué de toluène a été utilisé comme blanc. L'absorbance a été lue immédiatement à une longueur d'onde de 520 nm en utilisant le modèle Pharma Spec UV-1700 Spectrophotomètre. Une courbe standard de proline a été préparée à partir de concentrations connues en proline comprises entre 10 et 100 µg/ml.

La concentration de proline a été déterminée à partir de la courbe standard et calculée sur la base du poids frais (mg/g de poids frais).

Le protocole expérimental de cette étude a été composé de deux traitements (quatre concentrations de NaCl et quatre doses d'irradiation aux rayons gamma avec trois répétitions chacune).

Analyse statistique

Les données ont été soumises à une analyse de variance (STATISTICA 6.0) et la signification statistique des résultats a été analysée par la comparaison entre la valeur calculée et la valeur tabulée F à $P = 0,05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

Germination des semences irradiées sur milieu contenant du NaCl

Dans des expériences préliminaires, afin de savoir si les doses de radiation appliquées aux semences de tomates ont été efficaces ou non, nous avons examiné l'effet de l'irradiation gamma sur la croissance des plants. Une réduction d'environ 30% de la croissance est observée chez les plantes issues de semence de tomate irradiées comparativement aux témoins (Photo 1).

Selon l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA, 1995) en pratique, pour des traitements par irradiation, une réduction de la croissance de jeunes plants de 30 à 50% ou un taux de survie de 40 à 60% en comparaison avec les plantes témoins est prise comme référence pour un traitement prometteur.

Les résultats enregistrés nous montrent qu'avec des concentrations relativement faibles de NaCl, la germination des graines de tomates est réduite. En effet, l'addition du NaCl dans le milieu de culture a réduit de manière significative le taux de germination des semences de tomate. Le pourcentage de germination diminue avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu. Une corrélation négative existe donc entre la concentration de NaCl dans le milieu et le pourcentage de germination (Figure 1). Le coefficient de corrélation r obtenu est de -0,98; -0,99; -0,99 et -0,98 respectivement pour S0; S100; S150 et S200 (Semences irradiées avec 0 ; 100 ; 150 et 200 gray).

A 60 mM, plus de 50% de réduction du pourcentage de germination a été observée avec les graines irradiées. Avec l'ajout de 90 mM de NaCl dans le milieu, le pourcentage de germination diminue de façon drastique et la mise en place d'une culture compétitive serait difficile dans ces conditions. A des concentrations en sel plus élevées (100 mM), seuls quelques génotypes parmi les graines irradiées sont capables de germer avec un pourcentage de germination trop faible (Figure 1). Les graines non irradiées n'ont pas germé avec la présence de cette concentration (100 mM) dans le milieu. Ceci s'explique par le fait qu'une cellule ne peut absorber de l'eau que quand son potentiel hydrique est inférieur à celui du milieu environnant. Une concentration en NaCl de 100 mM (équivalent à une concentration osmotique de 200 mOsmol/L) rend difficile, voire impossible, l'absorption de l'eau par une cellule (ou même de retenir cette eau) sans la mise en place de système d'acclimatation (Reddy et al., 2011). Nos résultats concordent bien avec les travaux de ces deux chercheurs (Figure 1). Dans de cette expérience, l'aptitude à la germination dans un milieu

contenant 100 mM de NaCl acquise par certaines graines de tomates était sans aucun doute due à une mutation induite par à l'irradiation gamma de ces semences. L'analyse statistique démontre que les traitements étaient significativement différents. Des différences significatives ont été observées dans la durée de germination des graines. En effet, les graines de tomates irradiées ont besoin d'environ 50% de jours supplémentaires pour germer sur un milieu contenant 60 mM de NaCl que dans un milieu sans sel et presque 100% de plus de jours avec 100 mM. Cet allongement de la durée de germination peut être très dangereux pour une culture en semis direct compte tenu des décalages que cela peut engendrer dans la planification des travaux d'entretien de la culture ainsi que la période de récolte.

Concentration en Proline contenue dans les feuilles

L'accumulation de solutés compatibles peut aider à maintenir la teneur en eau nécessaire pour la croissance des plantes et les fonctions cellulaires. Les plantes répondent à une variété de stress environnementaux en accumulant certains métabolites spécifiques, comme la proline (Ksouri et al., 2012). Dans de nombreuses plantes sous diverses formes de stress, l'augmentation de la concentration en proline peut atteindre jusqu'à 80% du pool d'acides aminés (Heuer, 1994). Plusieurs chercheurs ont démontré le rôle osmo-protecteur de la proline, au niveau de la plante entière et dans des cultures cellulaires (Blumwald et al., 2000).

L'analyse statistique montre qu'il existe une différence significative entre les traitements au NaCl mais aussi entre les doses d'irradiation reçues par les semences (Figure 2). En effet, la valeur calculée (6,305) a dépassé la valeur tabulée (3,5) pour $p = 0,05$.

L'addition du NaCl dans le milieu de culture a eu un effet sur l'accumulation de la proline dans les feuilles de tomate. Se référant aux résultats du Figure 2, dans des conditions de stress salin, la proline est accumulée dans les feuilles de tomates de près de 2 à 3 fois par rapport aux témoins. Bien que les plantes

témoins accumulent la proline, l'exposition à un rayonnement gamma a joué un rôle dans l'augmentation de la teneur en proline dans les feuilles. En effet, la quantité de proline dans les feuilles augmente avec l'augmentation de la dose d'irradiation reçue par les semences. La Figure 2 montre que la concentration en proline augmente progressivement avec l'augmentation de la dose d'irradiation. En effet, pour les doses d'irradiation de 0 ; 100, 150 et 200Gy, les concentrations en proline extraites des feuilles étaient respectivement de 0,56 ; 2,7 ; 3,22 et 4,03 mg/g de poids frais.

La teneur en proline dans les feuilles augmente avec l'augmentation de la concentration en NaCl dans le milieu, sauf pour S150 dont la teneur en proline diminue à 100 mM de NaCl. En effet, pour des concentrations en chlorure de sodium 0 ; 60 ; 90 ;

100 mM, les concentrations en proline obtenue étaient respectivement de 4,03 ; 4,72 ; 4,8 et 5,61 mg /g de poids frais. Une corrélation positive existe donc entre la concentration de NaCl dans le milieu et la concentration de proline contenue dans les feuilles des plantes régénérées. La valeur de coefficient de corrélation était de 0,9867.

Pendant la régénération *in vitro* des plantes de tomate, nous avons observé que le NaCl ralentit la croissance des pousses de tomate. En effet, les plantes régénérées tolérantes au NaCl ont une croissance et une surface foliaire réduites comparativement aux plantes témoins. Toutefois, la comparaison entre les plantes régénérées nous amène à dire que le rayonnement gamma semble stimuler la croissance des pousses en présence de NaCl.



Photo1: Différence de croissance observée entre S0 ; S100 ; S150 et S200. Semences de tomate irradiées avec 0 ; 100 ; 150 et 200 gray.

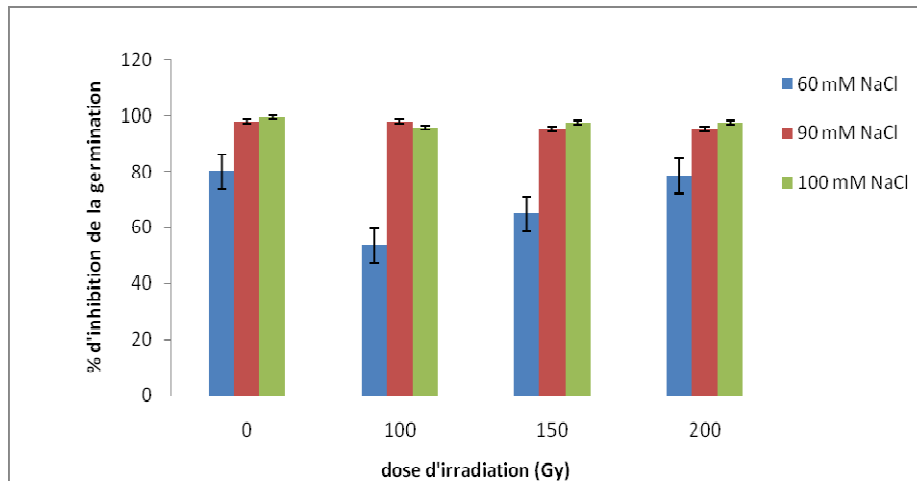


Figure 1 : Effet des doses d'irradiation et de la concentration en NaCl dans le milieu de culture sur la germination des semences de tomate.

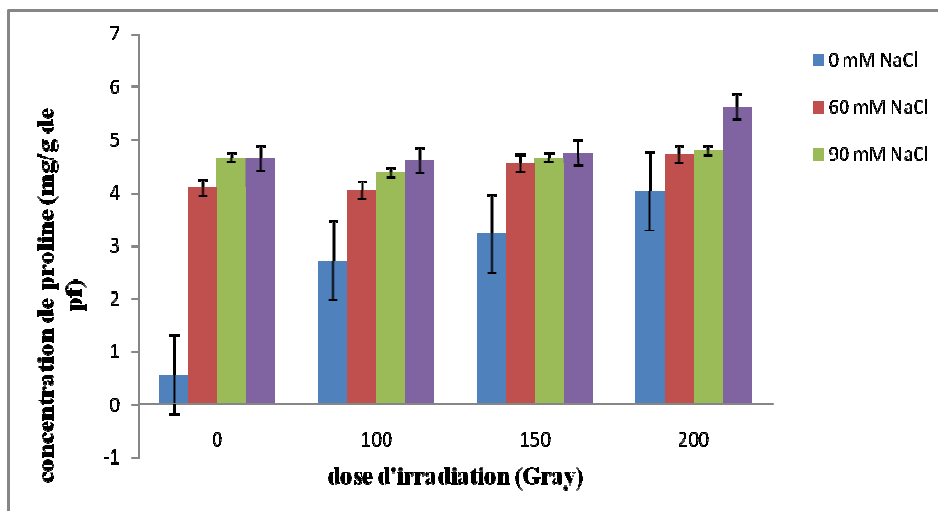


Figure 2 : Concentration en proline contenue dans les feuilles de tomates prélevées sur des pousses régénérées sur milieu MS contenant différentes concentrations de NaCl et obtenues à partir de semences irradiées.

Conclusion

Les doses d'irradiation gamma appliquées sur les semences de tomate ont été efficaces et ont permis de faire la sélection pour la résistance au NaCl. La quantité de proline extraite des feuilles augmente avec l'augmentation de la concentration en NaCl contenu dans le milieu de culture.

Cependant, l'augmentation de cette concentration en proline dans les plantes de tomate n'est pas seulement due à la présence unique du NaCl dans le milieu. En effet nous avons constaté que la quantité de proline augmente progressivement avec l'augmentation de la dose d'irradiation appliquées sur les semences.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par China Scholarship Council (CSC) Beijing P.R. China, sous le No:2001563010.

REFERENCES

- AIEA (Agence Internationale de l'Energie Atomique). 1995. Induced Mutations and Molecular Techniques for Crop Improvement. Proc. FAO/IAEA Symposium, Vienna.
- Ashraf M, Harris P. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science*, **166**: 3-16.
- Bartels D, Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Cri. Rev. Plant Sci.*, **24**: 23-58.
- Bates L, Waldren RP, Teare ID. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, **39**: 205-207.
- Blumwald E. 2000 Salt transport and salt resistance in plants and other organisms. *Curr Op Cell Biol.*, **12**: 431-434.
- Chen T, Cai X, Wu X, Karahara I, Schreiber L, Lin J. 2011. Casparian strip development and its potential function in salt tolerance. *Plant Signal Behav.*, **6**: 1499-1502.
- Chen CH, Wang ZC, Guo ZF, Li HH. 2009. Physiological responses of somaclonal variants of triploid bermudagrass (*Cynodon transvaalensis* x *Cynodon dactylon*) to drought stress. *Plant Cell Reports*, **28**: 517-526.
- Chen TH, Murata N. 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**: 250-257.
- Davenport RJ, Tester M. 2000. A weakly voltage-dependent, nonselective cation channel mediates toxic sodium influx in wheat. *Plant Physiol.*, **122**: 823-834.
- FAO. 2002. *Crops and Drops. Making the Best Use of Water for Agriculture*. Food And Agriculture Organization Of The United Nations: Roma; 26.
- Hassan N, Serag MS, El-Feky FM, Nemat Alla MM. 2008. *In vitro* selection of mung bean and tolerance to NaCl. *Annals of Applied Biology*, **152**: 319-330.
- Ksouri R, Smaoui A, Isoda H, Abdelly C. 2012. Utilization of Halophyte Species as New Sources of Bioactive Substances. *Journal of Arid Land Studies*, 41-44.
- Mansour MMF. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol. Plant*, **43**: 491-500.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of salt tolerance. *Annual Review Plant Biology*, **59**: 651-681.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ.*, **25**: 239-250.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**: 473-497.
- Reddy A, Helena, C, Irene S. 2011. Coping with Stresses: Roles of Calcium- and Calcium/Calmodulin-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell*, **23**: 2010 - 2032.
- Sairam RK, Tyagi A. 2004: Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.*, **86**: 407-421.
- Sengupta S, Majumder AL. 2009. Insight into the salt tolerance factors of a wild halophytic rice, *Porteresia coarctata*: a physiological and proteomic approach. *Planta*, **229**, 911-929.