

Identification des sources de tolérance au stress hydrique sur des espèces sauvages de la famille des Cucurbitacées en culture *in vitro*

Moussa Baragé ⁽¹⁾, Abdourahamane Balla ⁽²⁾, Toudou Adam ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Département des Productions végétales. Faculté d'Agronomie, BP 10960, Université Abdou Moumouni, Niamey (Niger).
E-mail : mouba@refer.ne

⁽²⁾ CRESA de Niamey. Faculté d'Agronomie, BP 10960, Université Abdou Moumouni, Niamey (Niger).

Reçu le 4 avril 2005, accepté le 16 août 2005

L'objectif de cette étude est d'identifier des sources de tolérance au stress hydrique, ce qui permettra de choisir le matériel adéquat permettant le transfert de gènes gouvernant la tolérance à la sécheresse au patrimoine génique des principales espèces cultivées. Pour cela, une méthode a été mise au point pour évaluer la tolérance au stress hydrique *in vitro*. Elle se base sur la capacité de récupération des calus après une déshydratation sous une hotte à flux laminaire jusqu'à une perte de 50 % de leur poids frais. L'étude a porté sur neuf accessions d'espèces sauvages et trois variétés cultivées de la famille des Cucurbitacées. Il ressort que les trois variétés cultivées (melon, concombre et pastèque), ainsi que certaines accessions d'espèces sauvages sont sensibles au stress hydrique. Les accessions sauvages de *Cucumis africanus* (L4), *Cucumis dipsaceus*, *Citrullus colocynthis* (Arabie Saoudite) et *Citrullus colocynthis* (Niger) sont manifestement tolérantes.

Mots-clés. Cucurbitacées, tolérance au stress hydrique, espèces sauvages.

Identification of tolerance sources to the water stress on wild species of the cucurbitaceous family in *in vitro* culture.

The objective of this survey is to identify sources of tolerance to the water stress. This will permit to choose the adequate material allowing the transfer of genes governing the drought tolerance to the gene pool of the main cultivated species. Indeed, a method has been developed to evaluate the water stress tolerance *in vitro*. It is based on the capacity of the calus recuperation after dehydration under a laminar flux hot until a loss of 50% of their fresh weight as a basis. The study included nine accessions of wild species and three cultivated varieties of the cucurbitaceous family. It comes out that the three cultivated varieties (melon, cucumber and watermelon), as well as some wild species accessions are sensitive to the water stress. The wild accessions of *Cucumis africanus* (L4), *Cucumis dipsaceus*, *Citrullus colocynthis* (Saudi Arabia) and *Citrullus colocynthis* (Niger) are obviously tolerant.

Keywords. Cucurbitaceous, tolerance to the water stress, wild species.

1. INTRODUCTION

De nos jours, la sécheresse est considérée comme le stress abiotique d'incidence majeure sur les plantes cultivées. Dès le début des années 1980, Christiansen (1982) estimait que près de la moitié des terres disponibles pour l'agriculture, soit 6 millions ha, était menacée par la pénurie d'eau de qualité. Ce problème de manque d'eau se pose avec beaucoup plus d'acuité dans les régions sahéliennes où des cycles de sécheresse persistants posent d'énormes difficultés à la production agricole, provoquant des périodes de famine récurrentes. D'une manière générale, les espèces cultivées sont sensibles aux stress climatiques en raison d'une perte progressive de

tolérance due au processus de domestication souvent axée sur d'autres critères. C'est le cas des Cucurbitacées alimentaires cultivées dans toutes les régions tropicales et subtropicales des deux hémisphères (Jelaska, 1986). En théorie, les espèces sauvages possèdent ce caractère de tolérance puisqu'elles sont continuellement soumises à une pression de sélection naturelle dans des écosystèmes variés (Dabauza *et al.*, 1998). L'objectif de cette étude est d'identifier des sources de tolérance au stress hydrique sur des espèces sauvages de la famille des Cucurbitacées afin d'introgresser des gènes qui gouvernent cette caractéristique intéressante dans le patrimoine génique des espèces cultivées grâce à un programme d'amélioration génétique.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Neuf accessions d'espèces sauvages de la famille des Cucurbitacées et trois variétés d'espèces cultivées de la même famille ont été utilisées lors de cette étude. Les accessions d'espèces sauvages sont : *Cucumis africanus* Linley L4, *Cucumis myriocarpus* Naud L2, *Cucumis zeyheri* Sond L1 et L2, *Cucumis anguria* var. *longipes*, *Cucumis dipsaceus* Ehrenb, *Citrullus colocynthis* L. Shrad (récoltée en Arabie Saoudite), *Citrullus colocynthis* L. Shrad (récoltée au Niger) et *Cucurbita* sp. Duch (récoltée au Niger). Quant aux variétés cultivées, il s'agit du melon *Cucumis melo* L. var. *Amarillo Oro* (Batllé), du concombre *Cucumis sativus* L. var. *Marketer* (Fitó S.A) et de la pastèque *Citrullus lanatus* Thumb var. *Dulce Maravilla* (Sluis, Groot).

2.2. Désinfection, germination des semences et obtention de plantules saines

Après avoir éliminé la couverture séminale, les semences sont superficiellement désinfectées par immersion pendant 30 minutes dans une solution diluée à 50 % d'eau de Javel commerciale (équivalent à 25 g.l⁻¹ de chlore actif). À cette solution, on ajoute 2 à 3 gouttes de détergent 7x-o-matic (Flow laboratories) qui aide à casser la tension superficielle des tissus, favorisant ainsi le contact de ces derniers avec la solution de chlore. Après la désinfection, on élimine les restes de la solution désinfectante au moyen de trois lavages, durant 5, 10 et 15 minutes respectivement, avec de l'eau distillée stérile. Les semences sont ensuite placées dans des boîtes de Petri munies de papier filtre saturé d'eau distillée stérile. Les boîtes de Petri scellées au Parafilm, sont placées dans l'obscurité (à 28 °C) pendant 36 à 72 heures selon les accessions. Après l'émergence des radicules, les semences sont transférées dans des tubes à essai (3,5-25 cm ou 3,5-20 cm, suivant la longueur de la tige) contenant chacun 33 ml du milieu de germination (MG) (Moreno *et al.*, 1986). Les tubes sont placés dans une chambre de culture avec photopériode (16 heures de lumière, intensité lumineuse de 34 mE·m⁻²·s⁻¹, température de 24 °C ± 2 °C, HR de 70 % pendant la période obscure et de 40 % pendant la période lumineuse) jusqu'à l'apparition des deux premières feuilles développées. Celles-ci sont à l'origine des explants qui constituent le point de départ de l'obtention de calus.

2.3. Culture d'explants, obtention de calus et évaluation de la tolérance au stress hydrique

Des explants de 0,5 cm² des deux premières feuilles développées sont utilisés. Les explants sont cultivés dans des boîtes en verre de 250 ml de capacité, à raison

de huit explants par boîte. Celles-ci contiennent 40 ml de milieu de culture solide et sont incubées dans la chambre de culture. Pour induire la formation des calus, le milieu de culture adéquat pour chaque espèce sauvage ou variété cultivée a été choisi sur la base des études préalables du groupe de Moreno (1984) et Moreno *et al.* (1986). Ainsi, le milieu de culture NB2020 a été retenu pour les trois variétés cultivées et les accessions d'espèces sauvages de *C. anguria* var. *longipes*, *C. dipsaceus* et *Cucurbita* sp. (récoltée au Niger). Par contre, pour les autres accessions d'espèces sauvages, le milieu le plus indiqué était le DB1020. Les calus primaires sont obtenus après 25-30 jours d'incubation. L'essai d'évaluation de la tolérance au stress hydrique a été mené avec des inocules de calus primaires de 0,5 cm de diamètre. Ceux-ci ont été cultivés à raison de huit par boîte durant une période de 20 jours. Après cette période de croissance, les calus ont été soumis au traitement de stress hydrique.

2.4. Procédure expérimentale d'évaluation de la tolérance au stress hydrique *in vitro*

Un total de 48 calus de chaque accession d'espèces sauvages et/ou variétés cultivées ont été évalués. Le traitement de stress hydrique a consisté en une déshydratation des calus jusqu'à 50 % de leur poids initial, en conditions axéniques. C'est ainsi que, les calus étaient déposés sur une balance sensible munie de papier filtre stérile et exposés sous une hotte à flux laminaire. Après la déshydratation, les calus ont été transférés sur des milieux de culture frais et incubés durant 15 jours pour déterminer leur capacité de récupération.

2.5. Variables étudiées

Les variables étudiées sont le poids initial des calus avant le traitement de stress hydrique, le temps écoulé jusqu'à ce que les calus perdent 50 % de leur poids initial, le poids des calus après le traitement de stress hydrique (déshydratation) et le poids final des calus après 15 jours de culture sur des milieux frais.

Comme variable dépendante, la capacité de récupération des calus a été calculée de la façon suivante :

Degré de récupération =

$$\frac{\text{Poids des calus après la récupération} - \text{Poids des calus après la déshydratation}}{\text{Poids frais initial des calus}} \times 100$$

Les données ont été traitées avec le logiciel Statgraphics 5.0.

3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les **tableaux 1 et 2** résument les valeurs correspondant au poids frais initial des calus, au poids des calus après une période de déshydratation (pour qu'ils perdent la moitié de leur poids frais initial), au poids frais des calus après une période de récupération, à la croissance nette ainsi qu'au temps (minutes) requis pour que les calus se déshydratent jusqu'à 50 % et à leur capacité de récupération sur le milieu de culture frais.

Comme on peut le constater, le poids initial des calus dépend de la variété ou de l'accession. Cependant, le plus intéressant est que le poids final (après la déshydratation et la période subséquente de récupération) ne dépend pas du poids initial. La croissance nette des calus de certaines accessions sauvages, comme *C. africanus* (L4), *C. dipsaceus*, *C. colocynthis* (Arabie Saoudite), et *C. colocynthis* (Niger), est relativement haute et cela pourrait indiquer un certain degré de tolérance au stress hydrique.

Avec l'aide des logiciels Statgraphics 5.0 et Multiple Range Test, l'analyse statistique de comparaison de moyenne des temps requis pour que les calus perdent 50 % de leur poids initial fait ressortir une différence significative entre les variétés cultivées et certaines accessions d'espèces sauvages. Concernant les variétés cultivées, les calus du concombre tardent à se déshydrater beaucoup plus que ceux du melon, mais leur capacité de récupération est faible (la croissance nette ne dépasse pas 0,35 g). La variété la plus sensible est celle de la pastèque, puisqu'elle a un temps de déshydratation intermédiaire (entre le melon et le concombre) mais sa capacité de se réhydrater est nulle.

En fait, les calus de la pastèque ont été incapables de se récupérer après le traitement de stress et leur poids final est inférieur à l'initial.

Quant aux accessions sauvages, de *C. anguria* var. *longipes*, *C. zeyheri* (L1 et L2) et *Cucurbita* sp. (Niger), elles ont un temps de déshydratation et une capacité de récupération similaires à ceux du concombre. L'accession sauvage de *C. myriocarpus* (L2) a aussi un temps de déshydratation similaire à celui du concombre, mais sa capacité de récupération (estimée en fonction du gain de poids des calus) est beaucoup plus grande. En effet, les calus des accessions sauvages de *C. africanus* (L4), *C. dipsaceus* et *C. colocynthis* (d'Arabie Saoudite et du Niger) requièrent non seulement un temps de déshydratation majeur mais aussi leur capacité de récupération est nettement supérieure.

Après le traitement de stress hydrique et la culture sur le milieu frais, le gain de poids des calus peut découler de l'absorption d'eau à partir du milieu et/ou des cycles successifs de division cellulaire. Le degré de récupération sera de 50 % quand le poids final des calus est égal au poids initial. Dans ce cas, le gain de poids pourrait seulement découler de l'absorption d'eau à partir du milieu. Quand le degré de récupération se situe entre 75 et 100 %, il est difficile que le gain de poids soit dû à l'absorption d'eau seulement. Dans ces circonstances, il faut espérer, au moins en partie, qu'il découle de l'existence de processus de division cellulaire. Quand le degré de récupération est supérieur à 100 %, cela indique que les cellules du calus ont pu supporter le stress hydrique et, après la réhydratation, ils ont initié un processus de croissance sur la base de cycles successifs de division cellulaire.

Tableau 1. Poids frais initial des calus (g), poids après la déshydratation (g), poids final des calus après la période de récupération (g) et la croissance nette (g). Pour chaque accession d'espèce sauvage ou variété cultivée, les valeurs moyennes de 48 calus sont présentées ainsi que les coefficients de variation — *Initial fresh weight of the calus (g), weight after the dehydration (g), final weight of the calus after the period of recuperation (g) and the net growth (g). For every wild species accession or cultivated variety, the middle values of calus are presented as well as the coefficient of variation.*

Variétés cultivées et accessions d'espèces sauvages	Poids initial des calus Pi (g)		Poids des calus déshydratés (g)		Poids des calus récupérés Pf (g)		Croissance nette = (Pf-Pi) (g)	
	M	CV %	M	CV %	M	CV %	M	CV %
<i>C. melo</i> A. OB	1,569	22,53	0,806	17,20	1,923	23,06	0,354	23,49
<i>C. sativus</i> M	1,182	18,94	0,605	25,55	1,517	22,84	0,335	27,05
<i>C. lanatus</i> D. M.	1,017	16,25	0,537	26,80	0,995	15,53	-0,022	
<i>C. anguria</i>	1,482	8,42	0,713	15,55	1,864	11,53	0,382	25,12
<i>C. africanus</i> (L4)	1,061	17,64	0,491	17,37	1,978	18,22	0,917	17,44
<i>C. myriocarpus</i> (L2)	0,994	19,84	0,482	25,43	1,642	18,99	0,648	23,03
<i>C. dipsaceus</i>	1,291	15,03	0,608	15,78	2,689	16,49	1,398	21,32
<i>C. zeyheri</i> (L1)	1,046	20,54	0,561	16,06	1,248	17,94	0,202	21,11
<i>C. zeyheri</i> (L2)	0,958	16,64	0,484	16,52	1,373	17,16	0,415	28,26
<i>C. colocynthis</i> (A.S.)	1,281	17,48	0,607	19,32	2,026	14,73	0,745	19,32
<i>C. colocynthis</i> (N)	1,496	17,10	0,741	25,89	2,414	15,50	0,918	20,32
<i>Curcubita</i> (N)	1,192	13,37	0,634	19,68	1,457	11,89	0,265	15,69

M = moyenne des observations — *average of the observations* ;

CV % = coefficient de variation en pourcentage — *coefficient of variation in percentage*.

En considérant comme critère de tolérance 110 % (la valeur qui résulte de la multiplication de la moyenne du melon et du concombre par 1,5), les valeurs du **tableau 2** indiquent que les accessions sauvages de *C. africanus* (L4), *C. myriocarpus*, (L2), *C. dipsaceus*, *C. colocynthis* (Arabie Saoudite) et *C. colocynthis* (Niger) exhibent une haute tolérance au stress hydrique. Il convient de mettre en relief que chez ces accessions sauvages, on enregistre une croissance importante des calus sur le milieu frais juste après le traitement, ce qui sous-entend que le stress hydrique n'a non seulement pas affecté la croissance des calus, mais, apparemment, il lui a servi de stimulus. À ce sujet, en 1992, Van Wann, a fait une évaluation visuelle de la tolérance au stress hydrique sur une collection de 300 accessions de la famille des cucurbitacées. Quatre de ces accessions présentent une tolérance au stress hydrique (trois collectées dans l'ex-Union Soviétique et une en Iran).

Tableau 2. Temps (min) requis pour que les calus se déshydratent jusqu'à 50 % et leur capacité de récupération sur le milieu de culture frais. Pour chaque accession d'espèce sauvage ou variété cultivée, les valeurs moyennes de 48 calus sont présentées ainsi que les coefficients de variation — *Time (min) required so that the calus dehydrate themselves until 50% and their capacity of recuperation on the fresh culture medium. For every wild species accession or cultivated variety, the middle values of calus are presented as well as the coefficient of variation.*

Variétés cultivées et accessions sauvages	Temps de déshydratation d'espèces (min)		Capacité de récupération des calus (%)
	M	CV %	
<i>C. melo</i> A. OB	68,4 ^d	18,24	71,2
<i>C. sativus</i> M.	133,1 ^c	6,25	77,2
<i>C. lanatus</i> D.M.	86,3 ^c	15,26	45,0
<i>C. anguria</i>	148,5 ^{bc}	9,79	77,7
<i>C. africanus</i> (L4)	159,1^b	8,28	140,2
<i>C. myriocarpus</i> (L2)	128,4 ^c	14,57	116,7
<i>C. dipsaceus</i>	162,3^b	9,39	161,2
<i>C. zeyheri</i> (L1)	131,1 ^c	9,51	65,7
<i>C. zeyheri</i> (L2)	122,3 ^c	9,63	92,8
<i>C. colocynthis</i> (A.S.)	183,2^a	7,19	110,8
<i>C. colocynthis</i> (N)	178,0^a	8,57	111,8
<i>Cucurbita</i> (N)	105,3 ^{cd}	9,21	69,0

M = moyenne des observations — *average of the observations* ;
CV % = coefficient de variation en pourcentage — *coefficient of variation in percentage.*

a, b, bc, c, cd, d = groupes homogènes définis à partir de la comparaison de moyennes à l'aide du Multiple Rang Test. Il met en évidence des différences significatives entre les groupes. Les moyennes appartenant au même groupe sont statistiquement identiques — *homogeneous groups defined from the comparison of averages with the help of the Multiple Rang Test. It puts in evidence the significant differences between the groups. The averages belonging to the same group are statistically identical.*

4. CONCLUSION

Au vu des résultats de cette étude, les trois variétés cultivées de melon, concombre et pastèque sont sensibles au stress hydrique. La même appréciation peut être faite sur les accessions de *Cucumis anguria* var. *longipes*, *Cucumis zeyheri* (L1 et L2) et *Cucurbita* sp. (Niger). Au contraire, les accessions sauvages de *Cucumis africanus* (L4), *Cucumis dipsaceus*, *Citrullus colocynthis* (Arabie Saoudite) et *Citrullus colocynthis* (Niger) manifestent une haute tolérance au stress hydrique.

Il serait opportun d'étendre cette étude à des essais *in vivo* (en plein champ) afin de vérifier les résultats obtenus *in vitro*.

Remerciements

Nous remercions le Dr Vicente Moreno Ferrero, Chercheur à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Plantes de Valencia (Espagne), pour nous avoir cédé une partie du matériel végétal et facilité l'accès au Laboratoire ainsi que la Banque Islamique de Développement (BID) pour l'octroi du financement qui a permis la réalisation de cette étude.

Bibliographie

- Christiansen MM. (1982). World environmental limitations to food and fiber culture. In Christiansen MM., Lewis CF. (eds) *Breeding plant for less favorable environments*. New York: Wilded Interscience. p. 1–11.
- Dabauza M., Gonzalez L., Bordas M., Ramon D., Moreno V. (1998). Regeneration and characterization of *Cucumis melo* L (+) *Cucumis anguria* var. *longipes* (Hook Fil.) Meeuse somatic hybrids. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **52**, p. 123–131.
- Jelaska S. (1986). Cucurbits. In Bajaj Y.P.S. (ed). *Biotechnology in agriculture and forestry* **2**. Crops I. Berlin: Springer Verlag, p. 371–386.
- Moreno V. (1984). *Aplicaciones del cultivo in vitro de células vegetales en la mejora genética*. SP. Valentia, Espana: Universidad Politécnica de Valencia, 152 p.
- Moreno V., Roig LA., Zubeldia L., Orts MC., Roche MV. (1986). Isolation and culture of protoplasts from *Cucumis metuliferus* and *Cucurbita martinezii* and a method for their fusion with *Cucumis melo* protoplasts. *Cucurbit Genet. Coop. Rep.* **9**, p. 74–77.
- Van Wann E. (1992). Evaluation of the US cucumber germplasm collection for tolerance to soil moisture deficit. *Cucurbit Gen. Coop. Rep.* **15**, p. 1–3

(6 réf.)