

Régénération *in vitro* et caractérisation physiologique de variants somaclonaux de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) tolérants aux basses températures

T. Bettaieb^{1*}, M. Denden^{1*} & M. Mhamdi²

Keywords: *Gladiolus*- Low temperature tolerance- Chlorophyll content- Chlorophyll fluorescence- Photosynthesis- Tunisia

Résumé

Pour la régénération de vitrovariants de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) tolérant le froid hivernal, des essais ont été entrepris pour l'obtention *in vitro* de mutants par culture de cals, associée à une pression sélective constituée par des basses températures et/ou à l'irradiation aux rayons gamma du cobalt 60. Les essais entrepris ont abouti à la régénération de 5 somaclones (R_1 , Rb_1 , Rb_2 , Rib_1 , Rib_2). Le clone R_1 a été régénéré à 23 °C et sélectionné après culture à 8 °C. Rb_1 et Rb_2 ont été régénérés à 8 °C. Rib_1 et Rib_2 proviennent de cals irradiés aux rayons gamma du cobalt 60 aux doses 20 et 40 Gy respectivement et cultivés à 8 °C. La tolérance à la basse température des somaclones obtenus a été évaluée par la mesure de la fluorescence chlorophyllienne, la teneur en chlorophylle et la photosynthèse. Ainsi, il a été démontré que le stress thermique n'affecte pas sensiblement les somaclones R_1 , Rb_1 , Rb_2 et Rib_1 , alors que le témoin (T) et Rib_2 se sont montrés sensibles. En effet, la fluorescence initiale (F0) est élevée chez ces deux derniers génotypes, en plus, leur rapport de la fluorescence variable sur la fluorescence maximale (Fv/Fm), indicateur de l'efficacité photosynthétique du PSII est affecté. Une relation positive est déterminée entre l'intensité de la photosynthèse et le rapport Fv/Fm puis entre l'intensité photosynthétique et la teneur des feuilles en chlorophylle.

Summary

***In vitro* Regeneration and Physiological Characterization of *Gladiolus* (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) Somaclonal Variants Tolerant to Low Temperatures**

In order to regenerate new clones of Gladiolus (Gladiolus grandiflorus Hort.) more tolerant to winter cold, somaclonal variation was undertaken in vitro through callus culture technique combined with low temperature selective pressure and/or gamma rays irradiations (cobalt 60). Amongst the 5 somaclones (R_1 , Rb_1 , Rb_2 , Rib_1 , Rib_2), variant R_1 was regenerated at 23 °C and then selected after culture at 8 °C. Rb_1 and Rb_2 were regenerated at 8 °C. Rib_1 and Rib_2 came from callus irradiated with cobalt at 20 and 40 gamma rays and cultivated at 8 °C. Low temperature tolerance was measured by the chlorophyll content, the chlorophyll fluorescence and the photosynthesis. Low temperature did not affect R_1 , Rb_1 , Rb_2 and Rib_1 somaclones while the control (T) and Rib_2 were susceptible. In fact, initial fluorescence (F0) was high in the last two genotypes and the Fv/Fm ratio, photosynthetic efficiency indicator, was affected. A positive relation was found between the photosynthesis rate and the Fv/Fm ratio and between the photosynthesis and leaf chlorophyll content.

1. Introduction

Les températures extrêmes ont une action dépressive sur l'activité photosynthétique qui est d'autant plus marquée que les températures élevées ou basses sont appliquées pendant une longue période (10). Cette action ralentit l'activité métabolique et provoque une altération des pigments et une perte de l'intégrité membranaire (13).

En hiver, la croissance du glaïeul est ralentie. Sous l'effet du froid, les inflorescences s'allongent anormalement et peuvent avorter en cours de montaison ou présenter un nombre limité de fleurons (3). Pour permettre la culture hivernale du glaïeul, la variation somaclonale peut aider à la recherche de plantes tolérant les basses températures. Cals et suspensions cellulaires constituent, en effet, des sources de variabilités originales qui se sont avérées efficaces pour la sélection de nouveaux caractères (19). Les traitements mutagènes, associés à la culture de cals, augmentent en général de façon significative le taux de variation (12). Les régénérants sont souvent de nature chimérique. Plusieurs plantes ornementales, telles que le chrysanthème, le poinsettia, le kalanchoe, irradiées aux rayons gamma ont montré de simples modifications épigénétiques ou au contraire des mutations stables pour la tolérance aux basses températures (2).

Les mesures de la fluorescence chlorophyllienne, de la photosynthèse et de la teneur en chlorophylle ont été,

souvent, utilisées dans les études d'adaptation des plantes à différentes contraintes du milieu, telles que les basses températures (21), les températures élevées (9), la salinité (20) et la déficience nutritionnelle (15). Les mesures de la fluorescence chlorophyllienne permettent d'apprécier l'intégrité fonctionnelle du photosystème II (PS II). Sous l'effet du stress, l'état fonctionnel des membranes des thylakoïdes se dégrade, l'altération des processus photosynthétiques se reflète dans les courbes d'induction de la fluorescence de la chlorophylle (1). En effet, puisque la fluorescence est une réaction compétitive de désactivation des chlorophylles excitées (14), elle constitue un indicateur intrinsèque des réactions photochimiques des chloroplastes des plantes vertes par la dissipation, dans l'antenne, des photons non utilisés par la photochimie au niveau des centres réactionnels. En l'absence de tout traitement et sous éclairage saturant, la photosynthèse est d'autant plus forte que la fluorescence est faible. Les cinétiques d'induction de fluorescence renseignent sur l'activité photochimique du PS II et peuvent servir de marqueurs univoques de l'état fonctionnel des membranes chloroplastiques (1, 14). En conditions normales, les chlorophylles absorbent la lumière dont l'énergie est utilisée dans les réactions biochimiques primaires de la photosynthèse dont une partie de l'énergie lumineuse absorbée est dissipée sous forme de fluorescence. En effet, lorsqu'une plante est préalablement placée sous

¹Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Élevage, Chott-mariem, 4042, Tunisie.

²Ecole Supérieure d'Agriculture du Kef 7119, Boulifa Kef, Tunisie.

*Dr T. Bettaieb Email: tbettaieb@yahoo.fr

*Dr M. Denden Email: dendenmounir@yahoo.fr

Reçu le 01.03.06 et accepté pour publication le 01.09.06.

l'effet d'un état de stress, puis soumise à un éclairage rouge, le rendement de la fluorescence varie suivant une cinétique différente par rapport à la même plante placée dans une condition normale. Suivant cette différence, on peut contrôler le degré de résistance des plantes à ces mauvaises conditions. Il s'agit d'une méthode avantageuse par rapport aux méthodes classiques phytotechniques qui nécessitent la mesure durant une longue durée de la croissance et de développement.

Le présent article développe, en premier lieu, les tentatives d'induction de la variation somaclonale en utilisant la culture de cals simple ou complétée par une association à l'irradiation gamma au cobalt 60 avec l'application des basses températures comme pression sélective. En second lieu, l'état des photosystèmes de cinq somaclones de glaieul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.), sélectionnés pour leur tolérance aux basses températures a été diagnostiqué par des mesures de la fluorescence chlorophyllienne, de la photosynthèse et de la teneur en chlorophylle.

2. Matériel et méthodes

2.1. Régénération de variants somaclonaux

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est constitué par des bourgeons apicaux, de 4 à 5 mm de long, prélevés à partir de cornes de glaieul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) du cultivar 'Peter pears'. Les bulbes utilisés pour le prélèvement des bourgeons ont été, préalablement, indexés à l'aide du test ELISA pour les virus les plus fréquents à savoir: le virus de la mosaïque jaune du haricot, le virus de la mosaïque du concombre et le virus de la mosaïque du tabac.

Conditions de régénération

Trois étapes ont été suivies pour effectuer la régénération adventive des vitroplants. La première étape consiste en une callogenèse à 8 et à 23 °C. Le milieu nutritif de base est le milieu de Murashige et Skoog (16) additionné de 0,5 mg.l⁻¹ d'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). Les cals ont été repiqués mensuellement sur des milieux frais de même composition pendant 4 mois. L'irradiation aux rayons gamma a été pratiquée sur les cals après 1 mois de culture. Dans une deuxième étape, les cals survivants aux stress thermique et irradiatif ont été transférés sur un milieu de culture à base de MS, enrichi de 0,5 mg.l⁻¹ de benzyladénine (BA) et de 10 mg.l⁻¹ d'AgNO₃, et cultivés dans les mêmes conditions de températures en vue de régénérer des pousses. Dans une troisième étape, les pousses régénérées à partir des différents traitements ont été repiquées sur un milieu de base MS additionné de 2 mg.l⁻¹ de BA et 0,5 mg.l⁻¹ d'acide β-indole butyrique (AIB). La culture a été réalisée à 8 °C dans le but d'exercer une pression sélective au cours de la régénération pendant 8 subcultures mensuelles.

Irradiation des cals

Les cals cultivés en boîtes de Pétri ont été irradiés au cobalt 60 à l'aide d'un émetteur de type SV68 ayant un débit de 1 Gy mn⁻¹. Les différentes doses utilisées étaient de 0, 10, 20, 30, 40 et 50 Gy. Pendant 4 mois de culture, les cals ont été ensuite soumis à deux régimes thermiques différents. Une température de 23 ± 1 °C en continu a été utilisée comme témoin alors qu'une température de 8 ± 1 °C était utilisée en continu comme stress thermique. Celle-ci a été atteinte progressivement en diminuant la température de 5 °C chaque semaine. Ainsi, les cals ont été exposés à 8 °C dès la troisième semaine de la première subculture et pour la suite de la phase callogène. Les 2 régimes thermiques ont été maintenus lors de la phase de régénération. La phase callogène a été conduite à l'obscurité totale. La phase de régénération a été conduite sous une photopériode de 11 heures comparable à celle hivernale et une intensité lumineuse de 36 μmol.m⁻².s⁻¹.

Dispositifs et paramètres expérimentaux

Dans les essais de callogenèse et de régénération de pousses, un dispositif expérimental en Split Plot à 3 répétitions a été adopté. Deux facteurs ont été utilisés, à savoir la température de la chambre de culture et la dose d'irradiation aux rayons gamma du cobalt 60. Chaque unité expérimentale relative à un traitement a comporté 6 boîtes de Pétri et chaque boîte est pourvue de 5 cals, soit 90 cals par traitement. Pour la phase de régénération, le nombre de cals mis en essai a été réduit à 3 par boîte, soit 54 cals par traitement. Le test à la plus petite différence significative (PPDS) au seuil 1% a servi pour la comparaison des moyennes.

Les observations ont porté sur:

- l'évolution du poids des cals après 60 et 120 jours de culture sous les 2 régimes.

- l'aspect morphologique des cals.

- le nombre et l'aspect des pousses régénérées.

Les clones obtenus ont été identifiés comme suit:

T= Témoin (pousse régénérée à partir du cv. 'Peter pears')

R et Rb= Pousses régénérées à partir de cals non irradiés et cultivés à 23 °C (R) ou à 8 °C (Rb) ensuite sélectionnées à 8 °C.

Ri et Rib= Pousses régénérées à partir de cals irradiés et cultivés à 23 °C (Ri) ou à 8 °C (Rib) puis sélectionnées à 8 °C.

2.2. Caractérisation physiologique

Matériel végétal et conditions de culture

Le matériel végétal utilisé est constitué par des vitroplants provenant des cinq somaclones de glaieul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) (R₁, Rb₁, Rb₂, Rib₁, et Rib₂) régénérés, lors de la première phase de cette étude et d'un témoin constitué par le cultivar d'origine 'Peter pears'. Les vitroplants sont cultivés, pendant 30 jours, en chambres de culture sous deux régimes thermiques. Le premier est de 23 °C en continu, le second régime est similaire aux conditions thermiques hivernales i.e. est de 18 °C pendant une photopériode de 11 heures et de 8 °C pendant une nyctipériode de 13 heures (18/8 °C).

Mesure de la fluorescence chlorophyllienne

Les mesures de la fluorescence chlorophyllienne sont faites, sur des feuilles matures et saines, à l'aide d'un système rotatif: Fluorescence Induction Monitor (FIM 1500, Analytical Development Company Limited, ADC). L'analyse des mesures est portée sur les paramètres de fluorescence suivants:

- F0 (Fluorescence initiale). Elle correspond à la valeur minimale de la fluorescence lorsque tous les accepteurs d'électrons sont oxydés. F0 a pour origine les chlorophylles qui forment les antennes collectrices du PS II.

- Fm (Fluorescence maximale). Elle correspond à la valeur maximale de la fluorescence obtenue pour la même mesure d'intensité lumineuse. Elle reflète la réduction des accepteurs primaires (QA) d'électrons du PSII et n'est accessible que dans le cas où l'intensité lumineuse est entièrement saturante.

- Fv (Fluorescence variable). Elle est obtenue par la différence entre F0 et Fm (Fv=Fm - F0).

- Fv/Fm. Il correspond au rendement quantique maximal de la photochimie du PSII.

La période d'adaptation à l'obscurité et le niveau de la lumière saturante sont déterminés avant d'effectuer les mesures. Une série de mesures du rapport Fv/Fm est réalisée après des durées d'obscurité ascendante toutes les 5 minutes d'intervalles. Cette période d'adaptation à l'obscurité est évaluée à 40 min. Le niveau de la lumière saturante évalué à 60% est déterminé en suivant le même protocole mais en faisant varier l'intensité lumineuse.

Mesure de la photosynthèse

Les mesures de la photosynthèse nette sont effectuées à

l'aide d'un système portatif CI-301PS de CID Inc. (Portable photosynthesis System) sur les mêmes feuilles utilisées pour les mesures de la fluorescence chlorophyllienne. Le niveau d'intensité lumineuse sous lequel les mesures sont faites est fixé à $36 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, ceci correspond à l'intensité lumineuse dans la chambre de culture des vitroplants.

Détermination de la teneur en chlorophylle

La détermination de la teneur en chlorophylle est réalisée selon le principe de dosage utilisé par Arnon et cité par Hannachi (8).

$$\text{Ca} = 10,05 \text{DO}_{663} - 1,97 \text{DO}_{645} \quad \text{Cb} = 16,36 \text{DO}_{645} - 2,43 \text{DO}_{663}$$

Ca= Concentration en chlorophylle a
Cb= Concentration en chlorophylle b

DO= Densité optique en nm

Les teneurs en chlorophylle sont exprimés en mg.g^{-1} de matière fraîche.

Les mêmes feuilles utilisées pour les mesures de la fluorescence chlorophyllienne et de la photosynthèse ont servi pour le dosage de la chlorophylle. Le protocole d'extraction est le suivant:

Deux grammes de feuilles vertes découpées sont broyées dans un mortier en présence de 1,5 g de carbonate de calcium et 25 g de sable pur. Le broyat obtenu est additionné de 7,2 ml d'acétone pure et 40 ml d'acétone 80%. Après un deuxième et troisième décantation, le mélange est filtré et les extraits ont servi pour le dosage par spectrophotométrie à 663 et 645 nm.

Dispositif expérimental

L'essai est conduit selon un dispositif en Split Plot à 3 répétitions. Le premier facteur correspond aux régimes thermiques. Le second correspond aux génotypes testés. Chaque unité expérimentale relative à un traitement dans un bloc est constituée de 6 vitroplants homogènes.

3. Résultats et discussion

3.1. Régénération de variants somaclonaux

Callogenèse

Les traitements aux rayons gamma affectent la croissance des cals. Sous les deux régimes thermiques, le poids frais des cals diminue progressivement avec l'augmentation de la dose d'irradiation reçue (Tableau 1).

Aux doses 10 et 20 Gy, les poids diffèrent peu de ceux enregistrés chez les témoins. Aux doses plus élevées, la croissance du cal est significativement inhibée et atteint son minimum pour les irradiations de 40 ou 50 Gy. Selon Ghosh *et al.* (6), la sensibilité des cals aux irradiations gamma varie en fonction de la dose appliquée et, aussi, de la nature du matériel végétal irradié. En général, les cals, tissus non organisés, sont moins radiosensibles que les plantules.

La croissance la plus faible a été enregistrée à 8°C mais l'effet inhibiteur du rayonnement qui se quantifie par rapport à la croissance du témoin est plus marqué pour les cals de 23°C . Dans ces conditions, les cellules semblent avoir une activité mitotique limitée et se nécrosent progressivement.

Après 60 jours de culture, les cals témoins, non irradiés et cultivés à 23°C , présentent une couleur claire et une structure friable. Les cals irradiés présentent un brunissement partiel de massifs cellulaires qui évolue en une nécrose parfois totale. En effet, les radiations ionisantes peuvent aussi entraîner des dommages physiologiques se manifestant par un retard de croissance et par la mortalité des massifs cellulaires (5). Ce phénomène a été observé à des degrés différents dans tous les traitements aux rayons gamma. Les cals irradiés à faibles doses (10, 20 ou 30 Gy) échappent parfois à la nécrose et évoluent sans différence apparente avec les cals témoins.

Le froid provoque aussi la nécrose des massifs cellulaires. La fréquence des nécroses à 23°C est plus limitée qu'à 8°C (Figure 1). Cependant, sur les cals partiellement ou totalement nécrosés et globalement après 3 mois de culture des massifs cellulaires d'aspect normal apparaissent et se développent en un nouveau cal de couleur claire. Ces nouveaux massifs cellulaires apparus pourraient dériver de cellules tolérantes au froid. Dogbe *et al.* (4) ont observé ce phénomène chez le riz après la culture de cals à basses températures et à partir de tels massifs, ils ont régénéré des vitroplants tolérants les basses températures.

Régénération

La néoformation de bourgeons sur les cals varie d'une façon significative avec la température de culture et la dose d'irradiation aux rayons gamma (Tableau 2). Le nombre de pousses le plus élevé (23 pousses) a été observé chez le témoin non irradié et cultivé à 23°C . A 8°C , la caulogénèse est limitée (0 à 3,5 pousses/cal). Les rayons gamma administrés aux cals cultivés sous les deux régimes thermiques semblent inhibiteurs de la régénération de pousses. Plusieurs auteurs ont rapporté des effets semblables des rayons gamma sur le développement de cals, des boutures, des bulbes ou des plantules (17). Ils observent un effet inhibiteur en fonction de la dose d'irradiation, du stade de développement du matériel végétal et de l'espèce.

La majorité des pousses régénérées à partir des cals cultivés à 8°C présentent un aspect hyperhydrique contrairement à celles apparues sur les cals témoins. Ce phénomène peut être expliqué par la combinaison de plusieurs facteurs notamment une pression osmotique élevée due à l'accumulation de sucres et d'acides aminés (18). D'autres pousses ayant des feuilles effilées et

Tableau 1

Poids frais des cals mesuré après 60 et 120 jours de culture en fonction de la dose d'irradiation aux rayons gamma et de la température

Rayonnement gamma cobalt 60 (Gy)	Température de culture ($^\circ\text{C}$)	Poids frais mesuré après 60 jours de culture (g)	Poids frais mesuré après 120 jours de culture (g)
0	23	$1,41 \pm 0,15$ a	$4,02 \pm 0,27$ a
	8	$0,76 \pm 0,11$ b	$0,90 \pm 0,10$ c
10	23	$1,27 \pm 0,18$ a	$3,87 \pm 0,21$ a
	8	$0,59 \pm 0,07$ bc	$0,84 \pm 0,06$ c
20	23	$1,25 \pm 0,06$ a	$3,91 \pm 0,18$ a
	8	$0,62 \pm 0,06$ b	$0,83 \pm 0,08$ c
30	23	$0,75 \pm 0,08$ b	$1,83 \pm 0,15$ b
	8	$0,43 \pm 0,07$ cd	$0,72 \pm 0,09$ cd
40	23	$0,46 \pm 0,04$ cd	$0,95 \pm 0,10$ c
	8	$0,39 \pm 0,06$ d	$0,53 \pm 0,07$ d
50	23	$0,39 \pm 0,09$ d	$0,90 \pm 0,06$ c
	8	$0,37 \pm 0,07$ d	$0,45 \pm 0,05$ d

- Les moyennes, avec écarts types, de la même colonne suivies de la même lettre sont statistiquement équivalentes selon le test de la ppds au seuil de 1%.

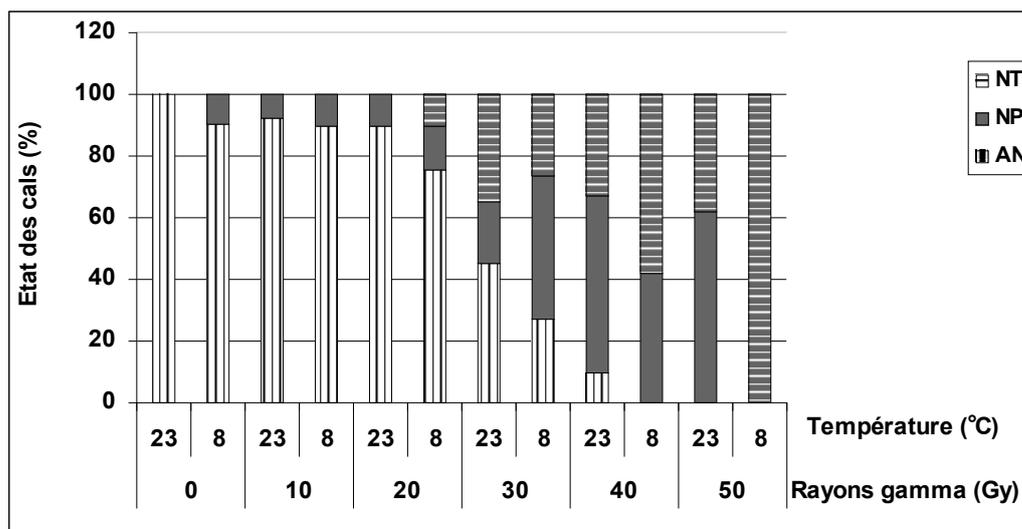


Figure 1: Evolution nécrologique de cals provenant de bourgeons apicaux, prélevés à partir de bulbes de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) cv. 'Peter pears', suite aux irradiations aux rayons γ ^{60}Co (0, 10, 20, 30, 40 et 50 Gy) et culture pendant 60 jours sous deux régimes thermiques (23 et 8 °C).

AN: Absence de nécrose, NP: Nécrose partielle, NT: Nécrose totale.

lancéolées se dessèchent progressivement et meurent. D'après Shewfelt et Purvis (18), le mécanisme de base qui mène au dessèchement des plantes exposées au froid est probablement lié à l'altération de l'activité de certaines enzymes comme la catalase, l'invertase, la superoxyde dismutase... Les enzymes associées aux membranes cellulaires sont plus affectées que les enzymes solubles, ce qui peut mener à des déséquilibres métaboliques. L'amidon et les sucres s'accumulent. Les membranes cellulaires sont endommagées, ce qui cause une fuite de solutés des cellules. Les lipides des membranes cellulaires sont peroxydés par les radicaux libres qui s'accumulent en conditions de stress comme le froid.

A partir de tous les lots cultivés à 8 °C, 128 pousses ont été régénérées. Après la sélection de 4 subcultures, seules 4 pousses vertes ont échappé à l'hyperhydricité et au dessèchement. Les pousses Rb_1 et Rb_2 proviennent des lots non irradiés alors que Rib_1 et Rib_2 proviennent des lots irradiés à 20 et 40 Gy respectivement. Ces pousses ont été retenues pour la suite de nos essais.

A partir des lots cultivés à 23 °C le nombre de pousses régénérées *in vitro* a été de 2676 (Tableau 2). Deux mille cinq cent quarante pousses vertes régénérées ont été retenues pour le test de tolérance à 8 °C pendant 4 mois. Au terme de cette étape, une seule pousse (R_1) a survécu; elle provient du lot témoin. L'ensemble des pousses retenues a été multiplié *in vitro* à 8 °C pour constituer un stock de plantes.

3.2. Caractérisation physiologique Fluorescence chlorophyllienne

Les mesures de la fluorescence chlorophyllienne sont rapportées dans la figure 2. Elles montrent une réponse différente pour chacun des clones en fonction du niveau de la température de culture. Les vitroplants exposés à un régime thermique 18/8 °C, montrent une fluorescence initiale (F_0) légèrement plus élevée que ceux exposés à 23 °C à l'exception du témoin et Rib_2 qui montrent une différence importante significative (Figure 2A). L'augmentation des valeurs de F_0 chez tous les génotypes soumis au stress thermique traduit une diminution de la faculté de capture des

Tableau 2

Effets de la dose d'irradiation aux rayons gamma et de la température de culture sur la néoformation de bourgeons à partir de cals de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) cv. 'Peter pears'

Température de culture (°C)	Rayonnement gamma cobalt 60 (Gy)	Cals avec pousses (%)	Nombre de pousses par cal	Nombre total de pousses régénérées
23	0	100	23 ± 0,31 a	1242
	10	100	15,18 ± 0,24 b	820
	20	100	4,14 ± 0,16 c	224
	30	100	3,64 ± 0,17 c	197
	40	100	1,81 ± 0,09 d	98
	50	100	1,75 ± 0,10 d	95
				2 676
8	0	40,74	3,50 ± 0,24 c	77
	10	22,22	3,58 ± 0,17 c	43
	20	9,25	1,00 ± 0,05 d	5
	30	3,70	1,00 ± 0,00 d	2
	40	1,85	1,00 ± 0,00 d	1
	50	00	00	0
				128

Les moyennes, avec écarts types, de la même colonne suivies de la même lettre sont statistiquement équivalentes selon le test de la ppps au seuil de 1%.

électrons et de transfert d'énergie aux centres réactionnels et un début de dénaturation des accepteurs primaires de la photosynthèse. Ainsi, le stress thermique de basses températures ne semble pas altérer le fonctionnement photosynthétique chez les obtentions sélectionnées. Ces résultats sont les mêmes que ceux obtenus par Smillie et Hetherington (21) qui montrent, en cas de stress thermique de basses températures, une relation inverse entre la performance photosynthétique et la fluorescence chlorophyllienne.

La fluorescence maximale (Fm) ne diffère pas chez Rb₂, Rib₁ et Rib₂ sous les deux régimes thermiques. Par contre, elle diminue significativement à basse température chez le témoin et chez les clones R₁ et Rib₂ (Figure 2B); ces derniers présentent dans ces conditions un léger jaunissement de leur feuillage. Bounaqba (1) a observé une stabilité de Fm chez le triticale et le blé seulement chez les feuilles vertes, photosynthétiquement actives. La perte de chlorophylle dans les feuilles qui présentent un début de jaunissement se traduit dans les cinétiques de la fluorescence chlorophyllienne par une diminution de Fm et du rendement photochimique maximum (Fv/Fm).

Le niveau de fluorescence variable (Fv= Fm - F0) est peu différent chez Rb₁, Rb₂ et Rib₁ quand les plantes sont exposées à des températures plus basses; mais il diminue sensiblement chez le témoin, et chez les somaclones R₁ et Rib₂ diffèrent significativement (Figure 2C). Ceci suggère que l'installation du stress thermique de basses températures s'accompagne chez les clones sensibles d'une diminution du nombre de centres réactionnels actifs et le transfert

d'électrons est de plus en plus bloqué. La diminution de Fv observée chez le glaïeul présente les mêmes comparaisons avec d'autres observations du même paramètre chez d'autres plantes cultivées sensibles au froid, comme le riz et le maïs (21). Pour Hakam *et al.* (7), lorsque la température est abaissée, la fluorescence Fv diminue chez les génotypes de rosiers les plus sensibles, alors qu'elle demeure plus stable en affichant une diminution graduelle chez les génotypes moins sensibles. D'ailleurs, dès 1983, Hetherington *et al.* (11) proposent des méthodes fondées sur la variation de la fluorescence Fv pour évaluer la tolérance relative des plantes cultivées au froid.

Le rapport Fv/Fm indicateur de l'efficacité photochimique du photosystème II ne baisse significativement qu'aux niveaux du témoin et de R₁ alors qu'il reste invariable chez les autres clones (Figure 2D). Chez le témoin la diminution de ce rapport atteint 0,65 alors qu'elle est moins importante chez R₁ (0,75). Ces résultats montrent que les feuilles du témoin sont très sensibles aux basses températures et présentent une altération de leurs processus photosynthétiques, contrairement à celles des clones qui maintiennent des valeurs de Fv/Fm proches de 0,8 à un régime thermique de 18/8 °C. Cette valeur est habituellement rencontrée dans les conditions optimales de croissance en l'absence de toute contrainte environnementale (1).

Photosynthèse

Pour la photosynthèse, les somaclones de glaïeul, suivant leurs caractéristiques adaptatives aux basses températures ont montré une réponses différentes au niveau de la température de culture (Figure 3). Le témoin a un taux faible

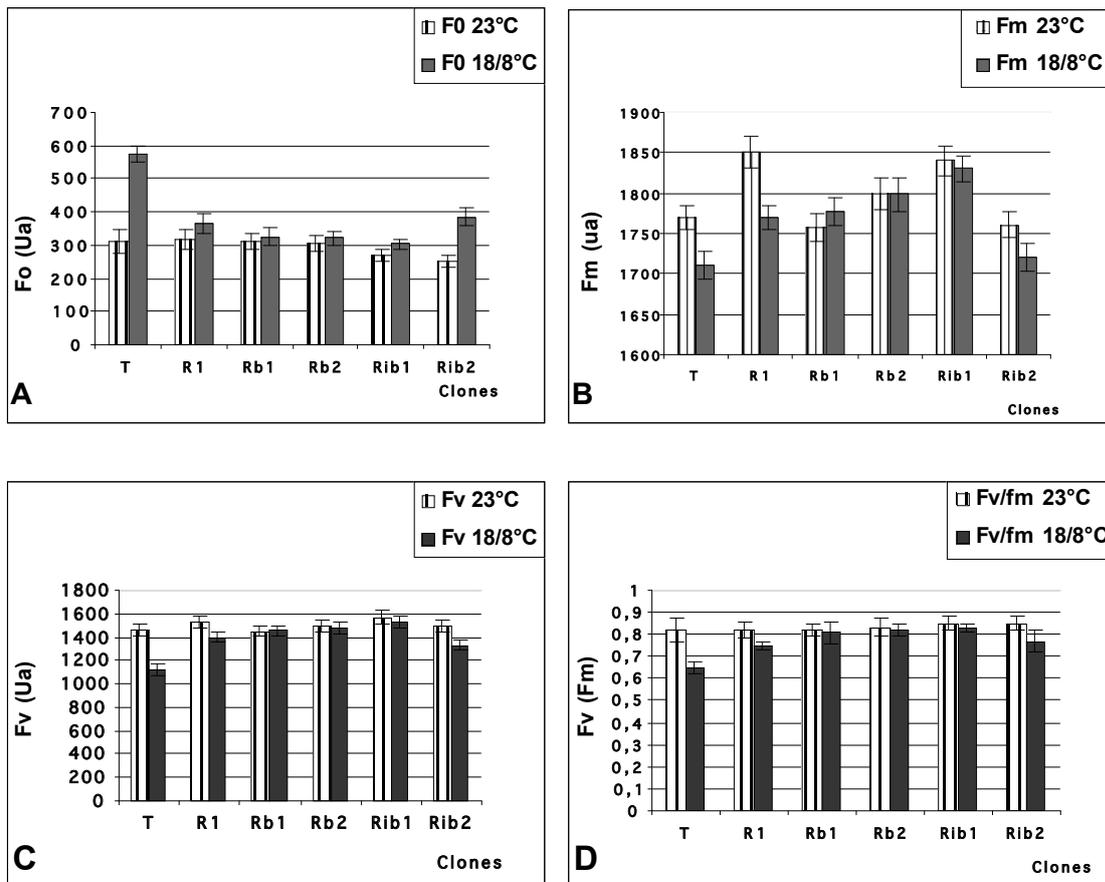


Figure 2: Fluorescence chlorophyllienne chez les clones de glaïeul (R₁, Rb₁, Rb₂, Rib₁ et Rib₂) de et chez le cv. 'Peter pears' (témoin) en fonction de la température de culture (23 °C ou 18/8 °C).

A: Fluorescence initiale (F0); B: Fluorescence maximale (Fm); C: Fluorescence variable (Fv= Fm-F0); D: (Fv/Fm).

Les valeurs présentées représentent les moyennes de 3 répétitions. Les barres représentent l'écart type estimé correspondant à leur moyenne.

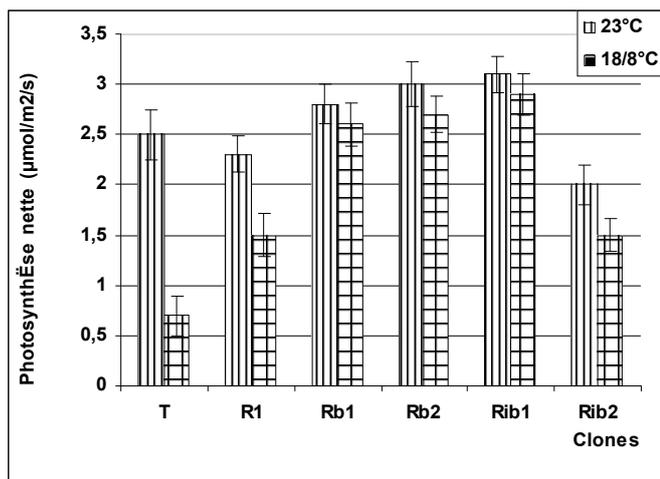


Figure 3: Photosynthèse nette chez des clones de glaïeul R_1 , Rb_1 , Rb_2 , Rib_1 et Rib_2 et chez le cv. 'Peter pears' (témoin) cultivés, pendant 60 jours, sous deux régimes thermiques (23 °C ou 18/8 °C).

Les valeurs présentées représentent les moyennes de 3 répétitions. Les barres représentent l'écart type estimé correspondant à leur moyenne.

par rapport aux nouveaux clones; les somaclones Rb_1 , Rb_2 et Rib , n'ont pas montré une diminution importante de la photosynthèse et ont conservé une activité photosynthétique proche de celle observée à 23 °C, les clones R_1 et Rib_2 occupent une position intermédiaire avec une réduction photosynthétique moins nette que chez le témoin. Ces résultats sont dans le même sens d'explication avec d'autres travaux qui montrent que le stress thermique entraîne, généralement, une diminution de l'activité photosynthétique (11,7).

Teneur en chlorophylle

Pour la teneur en chlorophylle rapportée dans la figure 4, trois types de réactions ont été observés. Pour le témoin, la baisse des teneurs en chlorophylle est très substantielle (60%), chez Rib_2 la diminution, quoique significative, n'est que de 30%; alors que chez les clones R_1 , Rb_1 , Rb_2 et Rib_1 les teneurs ont été identiques. D'après Impens (13), dans une cellule chlorophyllienne saine et dans des conditions favorables de croissance, de nouvelles molécules de chlorophylles sont synthétisées au fur et à mesure que d'autres sont dégradées. Dans les situations de stress, cet équilibre est dérégulé et les chlorophylles sont détruites plus rapidement qu'elles ne sont élaborées. La stimulation de la respiration de la cellule épuise rapidement les réserves

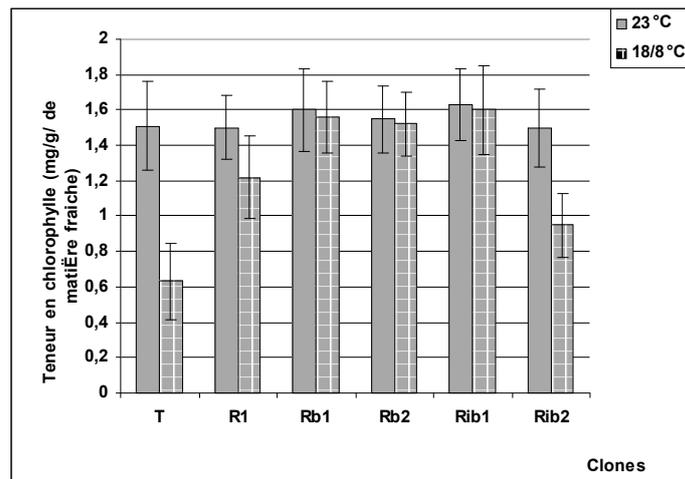


Figure 4: Teneur en chlorophylle chez des clones de glaïeul R_1 , Rb_1 , Rb_2 , Rib_1 et Rib_2 et chez le cv. Peter pears (témoin) cultivés, pendant 60 jours, sous deux régimes thermiques (23 °C ou 18/8 °C).

Les valeurs présentées représentent les moyennes de 3 répétitions. Les barres représentent l'écart type estimé correspondant à leur moyenne.

disponibles de la cellule; celle-ci limite ses synthèses, notamment celles des pigments, ce qui explique les résultats obtenus.

Relations obtenues entre les paramètres mesurés

La relation entre la teneur de la feuille en chlorophylle et l'activité photosynthétique mentionnée dans la figure 5 est significative ($R^2 = 0,92$). La baisse de la concentration en chlorophylle a été accompagnée chez tous les clones par une diminution de l'activité photosynthétique. Les mêmes résultats sont obtenus par Mehouachi (15) qui montre que la réduction de l'assimilation photosynthétique, chez la pomme de terre, est associée à une baisse de la teneur des feuilles en chlorophylle

Une corrélation positive ($R^2 = 0,80$) est observée entre la photosynthèse et l'indicateur de l'efficacité photochimique Fv/Fm (Figure 6). Le taux le plus faible de photosynthèse, rencontré chez le témoin, est accompagné par le rapport le plus faible de Fv/Fm ; les taux les plus élevés, enregistrés chez les somaclones, ont été accompagnés par les rapports les plus élevés. La relation entre la fluorescence chlorophyllienne et la photosynthèse nette a été étudiée par plusieurs chercheurs. Krause et Weis (14) et Mehouachi (15) ont trouvé une relation entre ces deux paramètres.

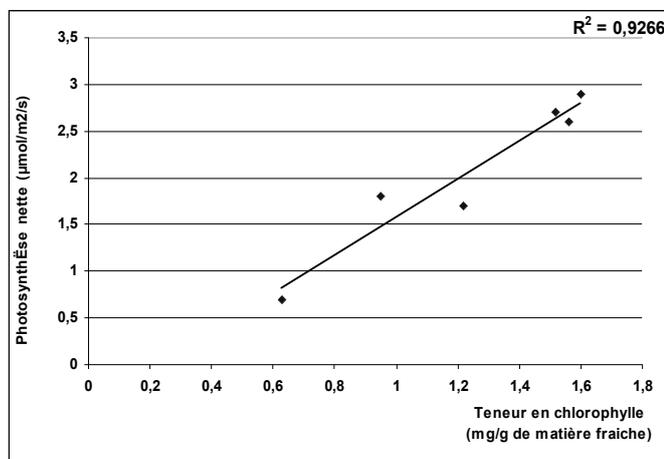


Figure 5: Relation entre le taux de photosynthèse nette et la teneur en chlorophylle chez des clones de glaïeul (R_1 , Rb_1 , Rb_2 , Rib_1 et Rib_2) et chez le cv. 'Peter pears' (témoin) soumis à un régime thermique 18/8 °C.

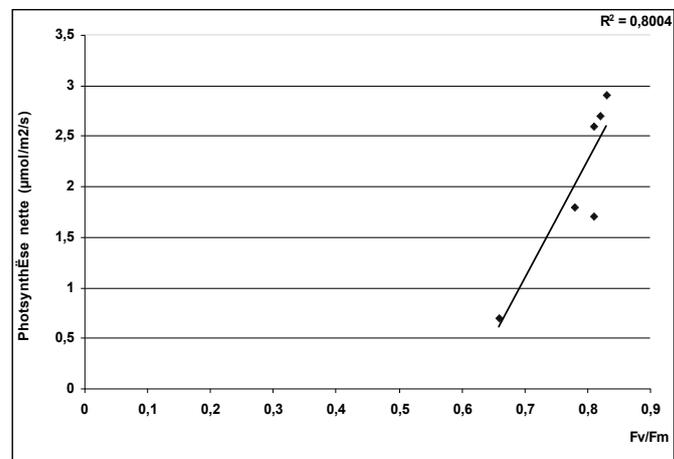


Figure 6: Relation entre le taux de photosynthèse nette et le rapport Fv/Fm chez des clones de glaïeul (R_1 , Rb_1 , Rb_2 , Rib_1 et Rib_2) et chez le cv. 'Peter pears' (témoin) soumis à un régime thermique 18/8 °C.

Chez les plantes soumises à une contrainte du milieu, les faibles taux de photosynthèse nette sont associés à une fluorescence initiale (F0) élevée et un faible rapport Fv/Fm. L'accroissement des valeurs de F0 est la conséquence d'un faible transfert d'électrons photosynthétiques au complexe protéique QA-QB (plastiquinones) dans les chloroplastes et la proportion d'énergie d'excitation réémise comme fluorescence devient de plus en plus importante avec l'augmentation de l'intensité et de la durée du stress. Le rendement quantique des processus photochimiques exprimé par le rapport Fv/Fm montre une étroite relation avec la photosynthèse. Dans les conditions non stressantes, ce rendement est, généralement, voisin de 0,8 et il diminue dans les situations de stress (1, 14).

4. Conclusion

Dans le but de régénérer des variants somaclonaux de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) tolérants aux basses températures, un processus de variation somaclonale a été mis en œuvre comportant une callogenèse suivie d'une sélection des régénérants à basses températures (8°C) et/ou associée ou non à une irradiation aux rayons gamma. Ces facteurs de variation ont permis d'obtenir, à partir de bourgeons apicaux de cormes de glaïeul, des pousses viables à basses températures (8 °C). Les essais entrepris ont abouti aux observations suivantes:

- l'irradiation associée ou non aux basses températures ralentissent la croissance des cals et provoquent des nécroses surtout aux fortes doses de rayons gamma (40 ou 50 Gy);
- des cals, partiellement ou totalement nécrosés, sont des massifs cellulaires en division active;
- la néoformation de bourgeons est aussi limitée par les basses températures et les fortes irradiations gamma (40 et 50 Gy);

- bien que, la majorité des pousses obtenues dans ces conditions présentent un aspect hyperhydrique alors que d'autres ont une forme effilée, se dessèchent progressivement et meurent, 5 pousses (R₁, Rb₁, Rb₂, Rib₁ et Rib₂) sur un total de 2804 ont surmonté les contraintes thermiques et de l'irradiation. Elles ont été clonées en conditions stressantes. Il n'est toutefois possible de dégager une origine particulière des régénérants présentant la tolérance recherchée quant au processus de variation somaclonale à adapter;

- la croissance végétative de nouveaux clones semble normale et aucun signe de flétrissement ou de dessèchement n'affecte les pousses.

L'évaluation de l'activité photosynthétique des somaclones de glaïeul obtenus T, R₁, Rb₁, Rb₂, Rib₁ et Rib₂ en relation avec la température de culture a montré que le stress thermique n'affecte pas sensiblement la fluorescence F0 chez les clones Rb₁, Rb₂, Rib₁ alors que le témoin est sensible en montrant une fluorescence F0 élevée. Le rapport Fv/Fm, indicateur de l'efficacité photosynthétique du PSII, demeure stable chez Rb₁, Rb₂ et Rib₁ alors qu'il diminue chez le témoin et à un degré moindre chez R₁ et Rib₂.

La photosynthèse nette est plus élevée chez Rb₁, Rb₂ et Rib₁ par rapport aux autres génotypes sous les deux régimes thermiques, mais elle est plus faiblement chez le témoin et légèrement chez les clones R₁ et Rib₂ en présence des basses températures.

Le stress thermique n'affecte pas la teneur en chlorophylle des feuilles chez les clones R₁, Rb₁, Rb₂ et Rib₁. Son action est plutôt remarquable chez le témoin et Rib₂.

Une relation positive est obtenue entre le taux de photosynthèse nette et le rapport Fv/Fm et entre la photosynthèse nette et les teneurs des feuilles en chlorophylle.

Références bibliographiques

1. Bounaqba S., 1998, 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. Thèse de Doctorat en physiologie végétale. Faculté des Sciences de Tunis. 230 p.
2. Broertjes C., Koene P. & Pronk T., 1983, Radiation-induced low-temperature tolerant cultivars of *Chrysanthemum morifolium* Ram. Euphytica, 32, 97-101.
3. Cohat J., 1993, *Gladiolus*. In: A. Dehertog and M. Le Nard (eds). The physiology of flower bulbs. Elsevier, Amsterdam, 297-320.
4. Dogbe S.Y., Gbadamassi Y. & Dantsey H., 1992, Etude de la variation somaclonale chez le riz. Rapport final STD, 15 p.
5. Dubuc-Lebreux M.A. & Vieth J., 1987, Effets des rayons γ ⁶⁰Co sur des tigelles de *Gerbera jamesonii* irradiées *in vitro*. Can. J. Bot. 65, 261-267.
6. Ghosh P., Mitra G.C. & Sharma A., 1979, Effect of γ irradiation on callus growth of *Vigna sinensis* L. Savi. Curr. Sci. 48, 731-732.
7. Hakam N.S., Khanizadeh J.R., De Eil & Richter C., 2000, Accessing chilling in roses using chlorophyll fluorescence. Hort Science, 35,2, 184-186.
8. Hannachi C., 1997, Amélioration de la tolérance de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) à la salinité (NaCl) par voie biotechnologique. Thèse de doctorat en sciences agronomiques. Faculté d'agronomie. Université de Gent. Belgique. 152 p.
9. Havaux M., Ernez M. & Lannoye R., 1988, Sélection de variétés de blé dur (*Triticum sativum* Desf.) et de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) adaptées à la sécheresse par la mesure de l'extinction de la fluorescence de la chlorophylle *in vivo*. Agronomie, 8, 193-199.
10. Heller R., Esnault R. & Lance C., 1993, Physiologie végétale. Vol. I. Nutrition, 5^{ème} édition. Masson. Paris: 293 p.
11. Hetherington S.E., Smillie R.M., Hardacre A.K. & Eagles H.A., 1983, Using chlorophyll fluorescence *in vivo* to measure the chilling tolerance of different populations of maize. Austr. J. Plant Physiol. 10, 247-256.
12. Horn W., 1984, Treating *in vitro* cultures of floriculture crops with mutagens. Mutation Breeding Newsletter, 24, 13-45.
13. Impens R., 1989, Les causes non parasitaires des maladies. In: J. Semal (ed). Traité de pathologie végétale. Les presses agronomiques de Gembloux. ASBL, 39-83.
14. Krause G.H. & Weis E., 1991, Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42, 313-349.
15. Mehouchi T., 1993, Evaluation de la croissance et de l'activité écophysiological de la pomme de terre en relation avec le stress nutritif. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Agronomiques de Gand, Belgique. 204 p.
16. Murashige T. & Skoog F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiol. plant. 15, 473-497.
17. Seilleur P., 1975, Analyse de la descendance de bulbes de glaïeuls à grandes fleurs, cultivar 'Hawaï', irradiés aux rayons gamma et mutants apparentés. Thèse de Doctorat. Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux, Belgique. 288 p.
18. Shewfelt R.L. & Purvis A.C., 1995, Toward a comprehensive model for lipid peroxidation in plant in plant tissue disorders. Hort. Sci. 30, 213-218.
19. Sibi M., 1995, Vitrovariation et potentialités nouvelles. In: Y. Demarly et E. Piquard (eds) Vitrovariation, potentialités nouvelles et sélection *in vitro*. AUPELF-UREF, 5-54.
20. Smillie R.M. & Nott R., 1982, Salt tolerance in crop plants monitored by chlorophyll fluorescence *in vivo*. Plant Physiol. 70, 1049-1054.
21. Smillie R.M. & Hetherington S.E., 1983, Stress tolerance and stress-induced injury in crop plants measured by chlorophyll fluorescence. Plant Physiol. 72, 1043-1050.

T. Bettaieb, Tunisien, Ingénieur, Titulaire d'un doctorat en Sciences agronomiques de l'Institut National Agronomique de Tunisie. Maître-assistant à l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Élevage Chott-Mariem, Tunisie.

M. Denden, Tunisien, Ingénieur, Titulaire d'un doctorat en Sciences agronomiques de la Faculté des Sciences Agronomiques et Biologiques appliquées de Gand-Belgique en 1996, Maître de conférences à l'Ecole Supérieure d'Horticulture et d'Élevage Chott-Mariem, Tunisie.

M. Mhamdi, Tunisien, Ingénieur, Titulaire d'un doctorat en Sciences agronomiques de la Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux-Belgique. Maître-assistant à l'Ecole Supérieure d'Agriculture du Kef Boulifa. Kef. Tunisie.