

## UTILIZATION OF "IN VITRO" TEST AS AN EARLY SCREENING TECHNIQS FOR DROUGHT STRESS EVALUATION IN SUNFLOWER.

H.S. AZPIROZ, P.VINCOURT, H. SERIEYS .

Institut National de la recherche Agronomique. Station d'Amélioration des plantes. Domaine de Melgueil 34130 Manguio, FRANCE.

### SUMMARY

From an interspecific hybrid between H. annuus and H. anomalus, F4 progenies were selected for their resistance level to a drought stress induced by mannitol.

Three days old plantlets obtained by "in vitro" culture of immatures embryos and fifteen days old embryos were submitted to an "in vitro" drought stress from the F2 to F4 generations.

Hydic potentials between -10 to -34 bars were used in this test. We observe that when it was applied to the F4 seedlings, the breeding reponse favoured the H. anomalus phenotype.

In the other hand the mannitol test seamed to be too drastic when applied to fifteen days old embryos.

### UTILISATION D'UN TEST "IN VITRO" POUR LA SELECTION PRECOCE DE TOURNESOL RESISTANT AU STRESS HYDRIQUE.

#### RESUME

A partir d'un hybride interspécifique, obtenu par croisement entre H. annuus et H. anomalus, nous avons sélectionné des individus F4 présentant des degrés variables de résistance à un stress hydrique induit par du mannitol.

De jeunes plantules issues de culture "in vitro" d'embryons immatures d'une part, et d'autre part des embryons âgés de 15 jours ont été soumis au test mannitol "in vitro" pendant les générations F2, à F4.

Des potentiels hydriques de l'ordre de -10 à -34 bars ont été appliqués dans ce test. Nous avons constaté que lorsque le stress est appliqué aux plantules, la sélection au niveau F4 a favorisé les phénotypes proches d'H. anomalus.

D'autre part, il semble que le test mannitol appliqué aux embryons de 15 jours est trop sévère et provoque un taux de mortalité élevé.

#### INTRODUCTION

Actuellement, le Tournesol est largement cultivé en Europe Centrale dans des zones où le climat est assez sec afin d'éviter l'attaque des maladies cryptogamiques auxquelles il est sensible.

Cependant, cette espèce est grosse consommatrice d'eau (Robelin, 1967; Rollier, 1970; Puech et Hernandez 1973); malgré cette particularité, le Tournesol a une rusticité caractéristique qui lui permet de s'adapter à des conditions hydriques déficitaires dans lesquelles il peut donner des rendements en graines appréciables comparé à d'autres cultures.

Blanchet et al (1974) ont démontré que la production de matière sèche et de graines chez le Tournesol est moins directement proportionnelle à la consommation d'eau que chez d'autres espèces comme le Maïs et le Sorgho. Cependant, Cauderon (1976), a signalé que le Tournesol n'est pas vraiment adapté à la sécheresse et qu'il est nécessaire d'améliorer chez cette plante plusieurs caractères d'adaptation.

Plusieurs auteurs (Blanchet, 1978; Serieys, 1980; Gelfi, 1980) soulignent que la transpiration foliaire est un caractère important dans l'adaptation à la sécheresse. En effet, ils démontrent l'existence d'une transpiration inférieure chez certaines espèces sauvages du genre Helianthus par rapport au Tournesol cultivé.

Par conséquent, l'adaptation du Tournesol à des milieux secs devrait bénéficier de l'apport du matériel sauvage présentant des caractères de résistance aux pertes d'eau foliaire (Blanchet, 1978). L'hybridation interspécifique pourrait fournir des combinaisons génotypiques dont les propriétés hydriques foliaires et / ou racinaires permettent l'économie d'eau.

L'espèce H. anomalus présente des caractéristiques morphologiques vraisemblablement liées à son adaptation aux conditions désertiques (Heiser, 1969); pour cette raison elle a été utilisée comme géniteur potentiel de résistance à la sécheresse dans un programme de sélection.

Les techniques de culture "in vitro" sont maintenant largement utilisées en amélioration des plantes. Des tolérances aux maladies et à la salinité, au niveau cellulaire ou des organes juveniles ont été étudiées chez différentes espèces cultivées (Liu, 1982; Kurtz, 1982; Handa, 1982).

Nous rapportons ici, les résultats d'une tentative de sélection pour la résistance au déficit hydrique, mettant en oeuvre la culture d'embryons immatures ou de jeunes plantules issus d'un croisement entre H. annuus et H. anomalus.

#### MATERIELS ET METHODES

L'hybride F1 "H. annuus x H. anomalus" est issu de la pollinisation de la lignée femelle de Tournesol "Cms 80" par l'espèce sauvage H. anomalus (code INRA 525).

Dans la descendance F1, une plante sur trois cents seulement a présenté à la fois production pollinique et autofertilité. La descendance F2 de cet individu a été cultivée en serre et subdivisée sur la base de la présence ou de l'absence de ramification. Chaque groupe a été ensuite pollinisé par un mélange de pollen de plantes de même phénotype.

Deux modalités de sélection "mannitol" ont été appliquées, l'une sur des embryons immatures âgés de 15 jours et l'autre sur des plantules développées à partir de ces embryons immatures.

Dans chacun des deux groupes de plantes F2 précédemment définis nous avons prélevé 240 embryons immatures, qui ont été cultivés dans des conditions rigoureuses d'asepsie sur un milieu nutritif de Murashige et Skoog modifié par Alissa (1986). Ce milieu a été additionné de mannitol aux concentrations de 0, 2, 4, 6, 8, et 12 pour cent, auxquelles correspondent respectivement les potentiels hydriques de -3.3, -10, -13, -22.7, -24.8 et -34.1 bars (valeurs obtenues avec un équipement Wescord).

De la même façon, 240 autres embryons immatures ont été préalablement cultivés dans un milieu de culture sans mannitol, pendant 3 jours pour donner de jeunes plantules. Ensuite ces plantules, ont été transférées dans des flacons de 100 ml contenant les mêmes milieux que précédemment (0, 2, 4, 6, 8, et 12 % de mannitol).

Le matériel végétal (embryons et plantules) a séjourné 15 jours dans les milieux de culture, correspondant aux différents traitements (25°C sous un éclairage de 6000 lux avec une photopériode de 16 h). Après quoi, les plantules survivantes et les embryons développés ont été repiqués dans des jiffypots contenant du terreau, puis acclimatées pendant 8 jours en salle climatisée (avec une photopériode de 16 h à 20°C et une obscurité de 8 h à 15°C). Enfin, les plantules ont été transférées en plein champ.

L'ensemble des plantes F3 a été autofécondé. Les individus mâle stériles et / ou autoincompatibles ont été éliminés, afin de conserver seulement les lignées autofécondes sur lesquelles nous avons prélevé des embryons, 15 jours après la pollinisation.

Les embryons immatures obtenus ont été repiqués, soit sur un milieu de base sans mannitol (M0), s'ils provenaient des embryons F3 élevés sur milieu sans mannitol, soit sur un milieu contenant 6% de mannitol (M6) dans les autres cas. Ils peuvent être classés en 8 groupes correspondant aux combinaisons des trois facteurs suivants:

- 1 -Type de ramification au niveau F2 : ramifié (R) et non ramifié(NR).
- 2 -Nature du matériel testé: embryon (E) et plantule (P).
- 3 -Type de milieu de culture: avec (M6) ou sans mannitol (M0)

Après un séjour de 15 à 18 jours dans le milieu de culture, les plantules ou les embryons F4 développés ont été transférés en jiffypots et élevés durant 8 jours en chambre climatisée avant repiquage au champ.

Afin d'évaluer l'effet de la sélection "mannitol in vitro" les caractéristiques suivantes ont été recueillies au cours du cycle végétatif F4:

\_ Sur plantule en fin de séjour "in vitro" d'une part;

- longueur de la tige
- longueur de la racine

\_ Sur plante adulte d'autre part;

- taille
- diamètre de capitule
- type de ramification (ramifié, peu ramifié, non ramifié)
- l'angle de la base de la feuille
- type d'angle (3 classes:  $<120^\circ$ ,  $120^\circ < X < 175^\circ$ ,  $>175^\circ$ )
- type morphologique (type Tournesol, type sauvage)

## RESULTATS

La présence de mannitol dans le milieu de culture a provoqué une mortalité comprise entre 10 % et 80 % dans la génération F2 de l'hybride interspécifique H. annuus x H. anomalus selon les concentrations en mannitol (-10 à -34 bars) utilisées.

Dans la F3, où une seule concentration du mannitol a été employée (-22.7 bars) la mortalité en fin de séjour "in vitro" a été de l'ordre 60%. Dans le cas des embryons d'origine non ramifiés soumis au même traitement, la perte a été totale.

La présence du mannitol a un effet significatif sur les différentes caractéristiques des plantules comme des plantes adultes mais interagit en général avec le type de matériel soumis au traitement "in vitro" (tableaux 1. et 2)

Ainsi, les plantes adultes issues des embryons dont le développement avait été inhibé par le mannitol ont une vigueur égale ou supérieure à celles issues des embryons témoins. Par contre, les plantules élevées sur le milieu contenant du mannitol donnent des plantes adultes moins développées que les plantes témoins (tableau 3.).

En outre, les plantes adultes provenant des sous-populations sélectionnées par mannitol au stade jeune plantules, présentent davantage le phénotype H. anomalus que celles qui proviennent des sous-populations témoins ou sélectionnées par mannitol au niveau embryons (tableau 4).

TABLEAU 1. Analyse de variance: effet des facteurs mannitol, nature du matériel et ramification sur quelques caractéristiques morphologiques liés au développement en fin de séjour "in vitro".

SOURCE DE VARIATION	V A R I A B L E S									
	L O N G U E U R									
	TOTALE			TIGE		RACINE		TIGE/RACINE		
	DL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	
SELECM	1	273.63	31.09 **	101.11	36.80 **	42.07	9.40 **	18.39	14.13 **	
NATMATVE	1	25.24	2.87 NS	4.20	1.53 NS	8.83	1.97 NS	4.65	3.58 *	
RAF2	1	98.99	11.25 **	10.62	3.87 *	44.75	10.00 **	9.45	7.26 **	
SELECM*NATMATVE	1	139.34	15.83 **	16.24	5.91 **	60.42	13.50 **	6.47	4.97 *	
NATMATVE*RAF2	1	68.37	7.77 **	6.56	2.39 NS	32.56	7.28 **	1.05	0.81 NS	
SELECM*NATMATVE*RAF2	1	7.28	0.83 NS	1.63	0.59 NS	2.02	0.45 NS	0.19	0.15 NS	
ERREUR	80	8.80		2.74		4.47		1.30		

\*\* Significatif à 1%

\* Significatif à 5%

NS Non significatif.

SELECM : facteur mannitol (présence ou absence)

NATMATVE: facteur nature du matériel (embryon ou plantule)

RAF2 : facteur ramification en F2 (avec ou sans)

TABLEAU 2. Analyse de variance: effets des facteurs mannitol, nature du matériel, ramification sur quelques caractères agro-morphologiques au stade adulte

SOURCE DE VARIATION	V A R I A B L E S									
	JOURS A FLORAISON			ANGLE FOLIAIRE		TAILLE		DIAMETRE		
	DL	CM	F	CM	F	CM	F	CM	F	
SELECM	1	2063.90	149.43 **	761.38	0.68 NS	764.90	1.77 NS	27.69	3.87 *	
NATMATVE	1	1188.08	86.02 **	7163.23	6.39 *	2110.87	4.88 *	16.66	2.33 NS	
RAF2	1	184.51	13.36 **	6245.93	5.57 *	227.54	0.53 NS	0.01	0.00 NS	
SELECM*NATMATVE	1	1747.85	126.54 **	4024.28	3.59 *	6771.62	15.65 **	2.71	0.38 NS	
NATMATVE*RAF2	1	32.86	2.38 NS	2232.41	2.04 NS	229.10	0.53 NS	2.59	0.36 NS	
SELECM*NATMATVE*RAF2	1	376.94	27.29 **	4167.94	3.72 NS	794.26	1.84 NS	33.86	4.73 *	
ERREUR	80	13.81		1120.37		432.60		7.16		

\*\* Significatif à 1%

\* Significatif à 5%

NS Non significatif.

TABLEAU 3. Comparaison des moyennes de sept variables étudiées sur les F4 dérivées de l'hybride *H. annuus* x *H. anomalous* après sélection "in vitro"

VARIABLES	T R A I T E M E N T S						
	PRMo	PRM6	PNRMo	PNRM6	ERMo	ERM6	ENRMo
OBSERVATIONS EN FIN DE SEJOUR "IN VITRO"							
Longueur Tige	3.82	2.08	3.37	1.51	5.09	0.53	3.35
Longueur Racine	3.89	3.88	3.73	3.37	8.15	2.88	6.05
Tige/Racine	1.23	0.85	1.08	1.04	0.78	0.31	1.34
OBSERVATIONS SUR PLANTE ADULTE							
Jours à Floraison	52.89	51.84	54.97	61.08	52.11	76.17	59.62
angle Feuille	117.77	115.08	138.51	111.19	106.36	168.71	130.81
hauteur	54.57	46.45	69.31	48.58	53.53	112.67	76.42
diamètre	5.80	5.30	6.94	4.94	6.37	8.21	6.54

PRMo = Plantules issues de F2 ramifiées/ milieu "de base"

PRM6 = Plantules issues de F2 ramifiées/ milieu complétement en "mannitol"

PNRMo = Plantules issues de F2 non ramifiées/ milieu "de base"

PNRM6 = Plantules issues de F2 non ramifiées/ milieu complétement en "mannitol"

ERMo = Embryons issus de F2 ramifiées/ milieu "de base"

ERM6 = Embryons issus de F2 ramifiées/ milieu complétement en "mannitol"

ENRMo = Embryons issus de F2 non ramifiées/ milieu "de base"

TABLEAU 4. Analyse de dépendance des variables qualitatives par rapport au type de milieu de culture et la nature du matériel végétal.

SOURCE DE VARIATION	VARIABLES			
		DL	KHI 2	P
MILIEU DE CULTURE (Mo, M6)	PHENOTYPE	1	14.72	**
	RAMIFICATION	2	6.30	*
	TYPE D'ANGLE	2	6.07	*
NATURE DU MATERIEL (E, P)	PHENOTYPE	1	4.18	*
	RAMIFICATION	2	25.60	**
	TYPE D'ANGLE	2	5.78	*

\*\* Significatif 1%

\* Significatif 5%

## DISCUSSION ET CONCLUSION

La pression de sélection "mannitol" appliquée "in vitro" a pour conséquence d'affecter la croissance et le développement des organes jeunes étudiés. Ce comportement a déjà été constaté chez d'autres espèces au niveau cellulaire, des organes jeunes ou des plantes adultes soumis à un déficit hydrique ou à une sélection pour la résistance à la salinité. (Richards, 1952; Liu, 1982; Kurtz, 1982).

Les différences de réponse à la sélection selon le type de matériel sélectionné ( plantule ou embryon ) peuvent être attribuées à une interaction entre leurs aptitudes au développement "in vitro" et leur origine génétique (Alissa, 1986).

La modification conjointe des caractéristiques physiologiques et de l'aspect phénotypique des plantes adultes sous l'effet de la pression de sélection, permet de faire l'hypothèse d'un linkage entre ces caractères par un faible taux de recombinaison entre les génomes d'H. annuus et d'H. anomalus.

Il conviendrait cependant de vérifier que ces modifications se répercutent au champ par une amélioration de la tolérance au déficit hydrique ou par une meilleure valorisation de l'eau.

## BIBLIOGRAPHIE

- ALISSA A., JONARD R., SERIEYS H., ET VINCOURT P., 1986. La culture d'embryons isolés "in vitro" dans un programme d'amélioration du Tournesol. C.R. Acad. Sc. Paris, t 302, Serie III No.5 161-164.
- BLANCHET R., MAERTENS C., MARTY J.R., PUECH J., 1974. Principaux facteurs déterminant la conduite et l'efficacité de l'irrigation. *Agrochimica*, 18, 288-307.
- BLANCHET R., GELFI N., et MERRIEN A. 1978. Rôle de la structure des feuilles dans la consommation d'eau du Tournesol. *CETIOM*, N° 63 12-22 juillet-décembre.
- CAUDERON A., 1976. Sur l'utilisation de l'eau pour le Tournesol. Proc. 7th. International Sunflower Conference Krasnodar. (USSR) 37-44.
- GELFI N., BLANCHET R., 1980. Structure foliaire, transpiration et efficacité de l'eau consommée pour quelques espèces d'Helianthus à tendance xérophytique. Proc. 9th. International Sunflower Conference, Torremolinos, (Spain) 81-92.
- HANDA A.K., BRESSAN R.A., HANDA S. and HASEGAWA P.M. 1982 Tolerance to water and salt stress in cultured cells. Proc. 5th. International Congress Plant Tissue and Cell Culture. Plant Tissue Culture 471-474.
- HEISER C.B. Jr., SMITH M.D., CLEVINGER S.B. and MARTIN W.C Jr. 1969. The North American Sunflower (Helianthus) memoirs of the Torrey Botanical Club, 22 (3) : 1-218.
- LIU M. C., and YEN H. S. 1982. Selection of NaCl tolerant live though stepwise salinized sugarcane cell cultures. Proc. 5th. International Congress Plant Tissue and Cell Culture. Plant Tissue Culture 477-478.
- PUECH J., HERNANDEZ M. 1973. Evapotranspiration comparée de différentes cultures et étude de quelques facteurs influençant les rythmes de consommation. *Annales d'Agronomie* .24 437-455.
- RICHARD L.A., WADLEIGH C.H., 1952. Soil water and plant growth. In *Soil Physical conditions and Plant Growth*. American Society of Agronomy. Monograph no 2.
- ROBELIN M., 1967. Action et arrière action de la sécheresse sur la croissance et la production du Tournesol. *Annales d'Agronomie*. 18, 579-599.

ROLLIER M. 1970. Besoins en eau du Tournesol. CETIOM, N° 47 9p.

SERIEYS H. 1980. Utilisation des espèces sauvages d'Helianthus pour l'amélioration du Tournesol cultivé. Proc. 9th. International Sunflower Conference, Torremolinos, (Spain) 107-112.

KURTZ S.M. 1982. In vitro response of Lycopersicum esculentum to sodium chloride. Proc. 5th. International Congress Plant Tissue and Cell Culture 479-478.

YASUDA T., MAEGAWA H., and YAMAGUCHI T. 1982. The selection for the tolerance of mineral stress in tropical plants tissue culture. Proc. 5th. International Congress Plant Tissue and Cell Culture, 479-480.