



Effet de l'eau oxygénée (H₂O₂) sur la germination et la croissance de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) au Gabon

Alexis Nicaise LEPENGUE^{1*}, Lézin BOMISSO², Auguste BOYE MAMBE²,
Séverin AKE² et Bertrand M'BATCHI¹

¹Laboratoire de Phytopathologie, Unité de Recherche Agrobiologie, Université des Sciences et Techniques de Masuku (USTM) ; BP 067 Franceville, Gabon.

Tel/Fax : (00241) 67 77 36 / 07684362 / 06764738.

²Laboratoire de Physiologie Végétale, UFR Biosciences, Université de Cocody-Abidjan, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire.

*Auteur correspondant, E-mail : lepengue_nicaise@yahoo.fr

RESUME

Les quantités de roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) produites au Gabon ne sont pas suffisantes pour satisfaire la demande locale. Pour augmenter les productions de cette plante, un essai d'intensification des rendements a été réalisé en utilisant de l'eau oxygénée (H₂O₂). Les graines de roselle ont pour cela été traitées par trempage pendant 48 h dans différentes concentrations de ce composé, puis cultivées en serre. Les résultats obtenus ont montré qu'aux concentrations comprises entre 0,02 M et 0,1 M l'eau oxygénée réduisait tous les paramètres morphométriques mesurés, à savoir : la germination des graines, les croissances longitudinale et tangentielle des tiges et les surfaces foliaires des plantes. Aux faibles concentrations de 0,01 M, ce composé a toutefois provoqué une légère et non significative stimulation des paramètres étudiés. Dans les gammes de concentrations utilisées, l'eau oxygénée n'est donc pas recommandable pour l'amélioration des productions de roselle au Gabon.

© 2012 International Formulae Group. All rights reserved.

Mots clés : Roselle, eau oxygénée, graines, tiges, feuilles, croissance.

INTRODUCTION

La roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) est la principale plante maraîchère du Gabon. Elle y est essentiellement cultivée pour des raisons alimentaires. Les feuilles de cette plante sont en effet consommées dans diverses sauces locales, et les calices exploités pour l'extraction du jus d'oseille, une boisson rafraîchissante au goût acidulé, aussi appelé "bissap" en Afrique de l'Ouest (Lépengué et al., 2007). Les différents organes de la roselle sont également utilisés en pharmacopée pour

les traitements de scorbut, de cholestérol, et de diverses infections parasitaires (Lépengué et al., 2007). Malgré la diversité de cultivars rencontrés au Gabon (Lépengué et al., 2008), les productions de cette plante ne parviennent pas à couvrir l'ensemble des besoins des populations locales. De nombreuses et répétitives ruptures de stock sont constamment enregistrées toutes les saisons. Pour répondre à cette préoccupation, diverses solutions ont été envisagées, notamment l'augmentation des surfaces agraires et

© 2012 International Formulae Group. All rights reserved.

DOI : <http://dx.doi.org/10.4314/ijbcs.v6i3.28>

l'amélioration biologique des rendements des plantes. Si les premiers aspects (l'augmentation des aires cultivées) de ce projet ont déjà débuté avec l'accroissement des surfaces agraires périurbaines les questions liées aux intensifications des biomasses végétales n'ont jamais été abordées. Les quantités de production par plante sont restées inchangées à ce jour, et les rendements donc jamais améliorés.

La présente étude a été initiée pour répondre à cette préoccupation d'amélioration des rendements des plantes. Elle vise à augmenter les productions de la roselle, par induction artificielle de la croissance végétative. La substance inductrice utilisée dans ce travail est l'eau oxygénée (H₂O₂). Ce choix a été déterminé par les conclusions des travaux de certains auteurs (Matsunaga et Yamada, 2002 ; Nicholls, 2007), qui lui prêtent des vertus inductrices de croissance. Les paramètres morphométriques mesurés sont : la germination des graines, les croissances primaires et secondaires des tiges et la surface foliaire des plantes.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Le matériel végétal employé est la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*), une plante maraîchère de la famille des Malvaceae. Le cultivar choisi est RV2, un végétal à tiges vertes et à feuilles rouges, et particulièrement apprécié pour sa saveur acidulée caractéristique (Lépengué et al., 2009).

Mise en place de l'essai

Six cent graines de roselle de bonne qualité germinative (provenant du Département de Biologie de l'Université de Sciences et Techniques de Masuku (USTM), ont été désinfectées par trempage pendant 5 min dans 1 L d'hypochlorite de sodium 1%, et desséchées entre 2 épaisseurs de papier buvard (Lépengué et al., 2010). Elles ont ensuite été divisées en 6 lots de 100 organes, et incubées dans des bécards contenant 500 ml

des solutions d'eau oxygénée de concentrations variant entre 0,01 M et 0,1 M. Un lot témoin de 100 graines a également été préparé par le même procédé, mais avec 500 ml d'eau distillée. Après 24 h d'incubation, chaque lot de graines a abondamment été rincé dans 3 L d'eau distillée, desséché entre 2 épaisseurs de papier buvard, et ensemencé dans des boîtes de culture cylindriques contenant 1 dm³ de sol de texture argilo-limoneuse, préalablement stérilisé par autoclave pendant 30 minutes à 120 °C. Quatre graines de roselle ont été semées par boîte de culture ; ce qui correspond à 25 boîtes par traitement, et à 175 unités pour tout l'échantillonnage. Les préparations ont ensuite été transférées dans une serre en polyéthylène étanche et transparente, d'épaisseur 180 µm, à armatures métalliques, de dimensions 15 x 10 x 2,5 m³ (Lépengué et al., 2007). Chaque boîte a quotidiennement été arrosée par 500 ml d'eau distillée, jusqu'à la fin de l'expérimentation au 35^e jour.

Impact de l'eau oxygénée sur la germination des graines

Pour chaque traitement, le nombre de graines germées a été déterminé 48 h après les semis, selon le protocole de Askri et al. (2007), et l'inhibition de germination (% Ig) calculée à partir de la formule suivante :

$$\% Ig = \frac{Gt - Ge}{Ge} \times 100 \quad [1]$$

Où Gt est le nombre de graines de roselle germées dans les 25 boîtes témoins, et Ge le nombre de graines germées dans les 25 boîtes d'un essai considéré quelconque.

Impact de l'eau oxygénée sur les croissances primaire et secondaire des plantes

La croissance primaire a été mesurée au 35^e jour à l'aide d'un décimètre en relevant la hauteur allant du sol à la première fourche foliaire ; et la croissance secondaire (diamètres des plantes), déterminée à l'aide d'un pied à coulisse numérique (de marque

Fisherbrand, $P \pm 0.01$ mm), au niveau du collet (Lépengué et al., 2007). L'impact de chaque traitement sur les 2 types de croissance (primaire et secondaire) a été déterminé, comme précédemment à partir des moyennes des mesures essais et témoins des plantes (équation [1]).

Impact de l'eau oxygénée sur la surface foliaire des plantes de roselle

La surface foliaire des plantes a été mesurée au 35^e jour, à l'aide d'un papier calque transparent (de rapport masse/surface égal à 80 g/m²). Celui-ci a été découpé aux dimensions de la feuille, et les répliques sectionnées, pesées à la balance (Ohaus Analytic 60). Les surfaces foliaires ont ensuite été déterminées par correspondance des masses, et leurs variations calculées par analogie à l'équation [1].

Répétitions et analyses statistiques

Toutes les expériences de ce travail ont été répétées 3 fois et les données obtenues soumises à une analyse de la variance (ANOVA), à un critère d'évaluation, au logiciel Statistica 6.0. Les moyennes des mesures ont ensuite été discriminées par les tests de comparaison multiples de Newman-Keuls, au seuil de 5%.

RESULTATS

Effet de l'eau oxygénée sur la germination des graines

Les traitements des graines de roselle à l'eau oxygénée ont donné les résultats présentés aux Figures 1A et 1B. Leur analyse a révélé que, de façon globale, ce composé inhibait la germination des graines de roselle, proportionnellement aux concentrations utilisées. Hormis une légère stimulation (non significative) observée à la concentration de 0,01 M, l'eau oxygénée a provoqué la réduction des taux de germination des graines de roselle à toutes les concentrations utilisées. Les baisses statistiquement significatives (Tableau 1) n'ont néanmoins débuté qu'à partir des concentrations de 0,04 M, avec des

valeurs de -5%. La plus forte baisse (-32%) a été enregistrée à la concentration de 0,1 M (Figure 1B).

Impact de l'eau oxygénée sur la croissance primaire des plantes de roselle

Les effets de l'eau oxygénée sur la croissance longitudinale des plantes de roselle ont été résumés aux Figures 2A et 2B. Leur examen a montré qu'après une légère hausse non significative de 2%, à la concentration de 0,01 M, les hauteurs des plantes ont globalement été abaissées par les traitements appliqués, proportionnellement aux concentrations d'eau oxygénée utilisées. Les plantes essais (traitées à l'eau oxygénée) ont alors présenté des tailles plus petites que celles des témoins. Les baisses statistiquement significatives ont été observées à partir des concentrations de 0,04 M (-20%), avec des effets exacerbés aux teneurs de 0,1M (-24%).

Impact de l'eau oxygénée sur la croissance secondaire des plantes de roselle

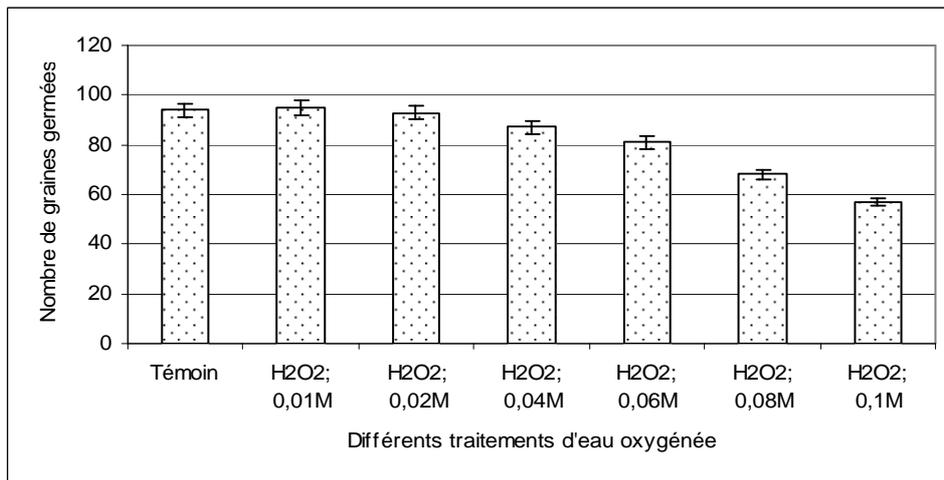
La quantification de l'impact de l'eau oxygénée sur la croissance tangentielle des tiges de roselle nous a permis de dresser les Figures 3A et 3B. Leur dépouillement a révélé qu'à l'exception de la concentration de 0,01 M, l'eau oxygénée a provoqué la réduction des diamètres des tiges de roselle, proportionnellement aux doses administrées. Les plantes traitées ont alors présenté des ports effilés, comparativement aux plantes témoins. L'analyse statistique a montré que les réductions significatives de diamètre commençaient à partir des concentrations de 0,04 M, avec des valeurs de -3,5%, et atteignaient des seuils extrêmes de -34% aux concentrations de 0,1 M (Figure 3B).

Impact de l'eau oxygénée sur la croissance des surfaces foliaires de roselle

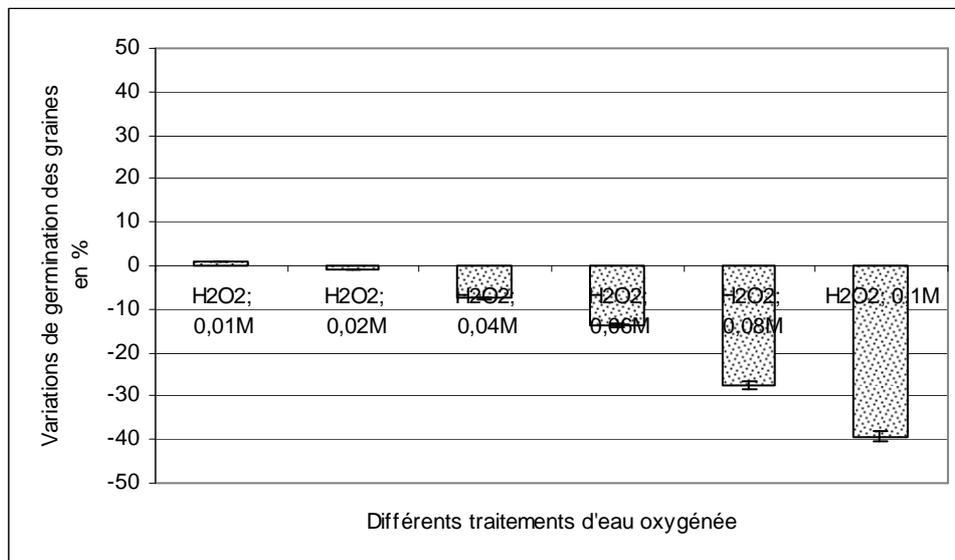
Les données de surfaces foliaires générées par les traitements des graines de roselle à l'eau oxygénée ont été synthétisées et présentées aux Figures 4A et 4B. Comme pour les autres paramètres morphométriques

analysés, l'eau oxygénée a engendré des réductions de surface foliaire proportionnellement aux concentrations appliquées. A part la concentration de 0,01 M qui a induit une légère augmentation de 1,6% (mais statistiquement non significative), toutes les autres teneurs ont provoqué des baisses de

dimensions foliaires des plantes de roselle. Les feuilles des plantes essais ont alors été plus petites que celles des témoins. Les réductions de surfaces foliaires statistiquement significatives ont été enregistrées à partir de la concentration 0,04 M (Figure 4B).



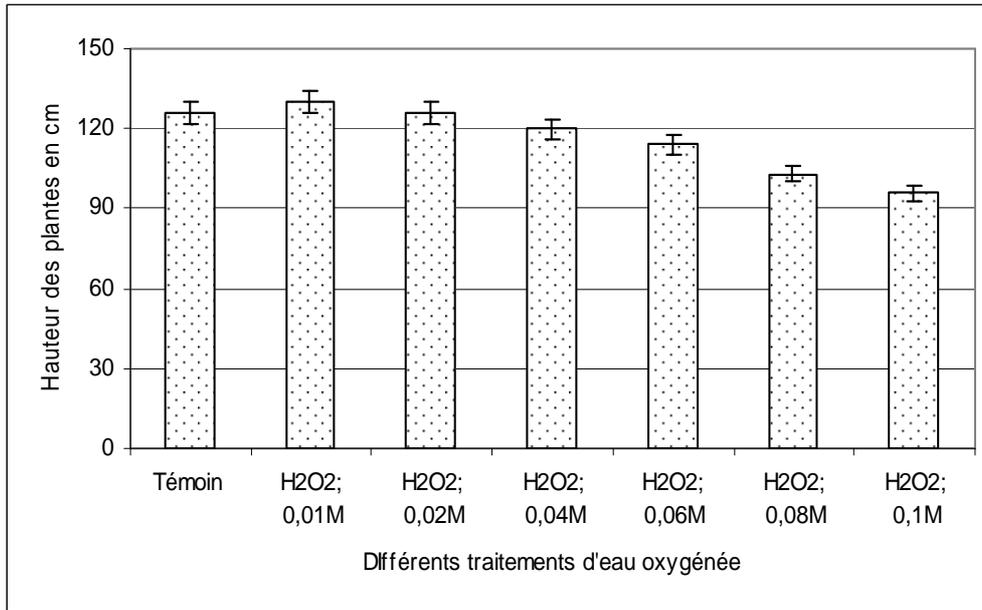
(A)



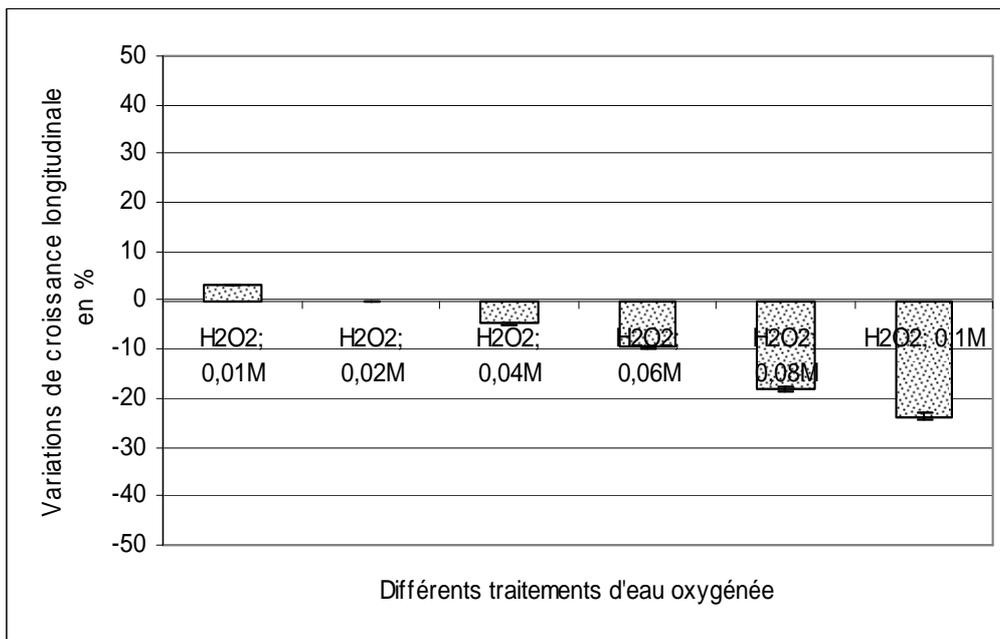
(B)

A : Nombre de graines germées dans chaque traitement ;
 B : Taux de germination des graines traitées par rapport aux témoins.

Figure 1: Effet de l'eau oxygénée sur la germination des graines de roselle.



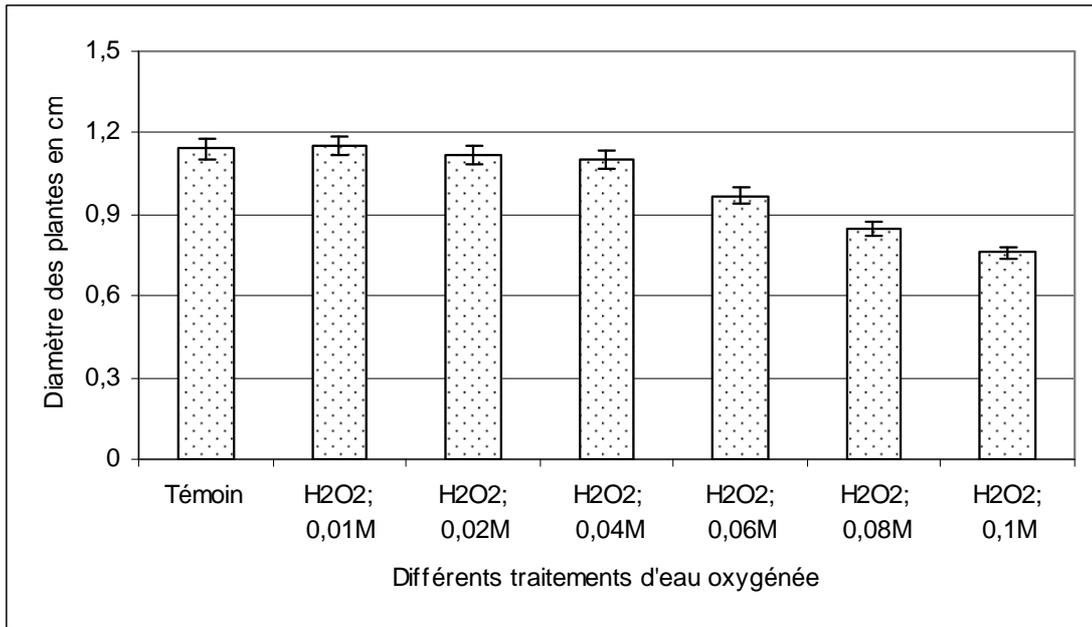
(A)



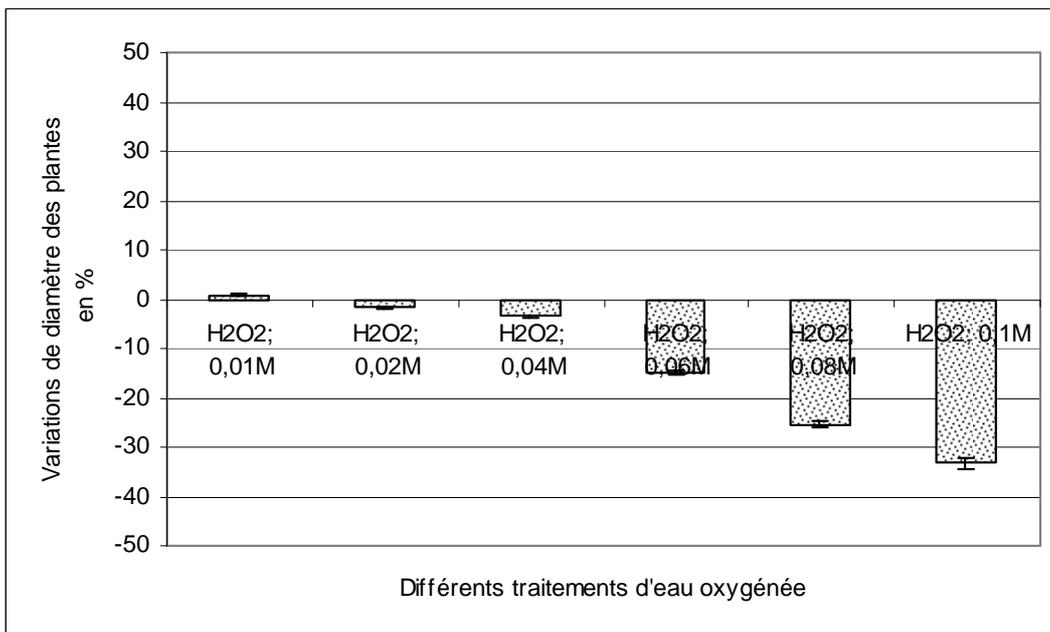
(B)

A : Hauteur des plantes au bout de 35 jours de culture ;
B : Taux de croissance longitudinale des plantes traitées par rapport aux témoins.

Figure 2: Effet de l'eau oxygénée sur la croissance primaire des plantes de roselle.



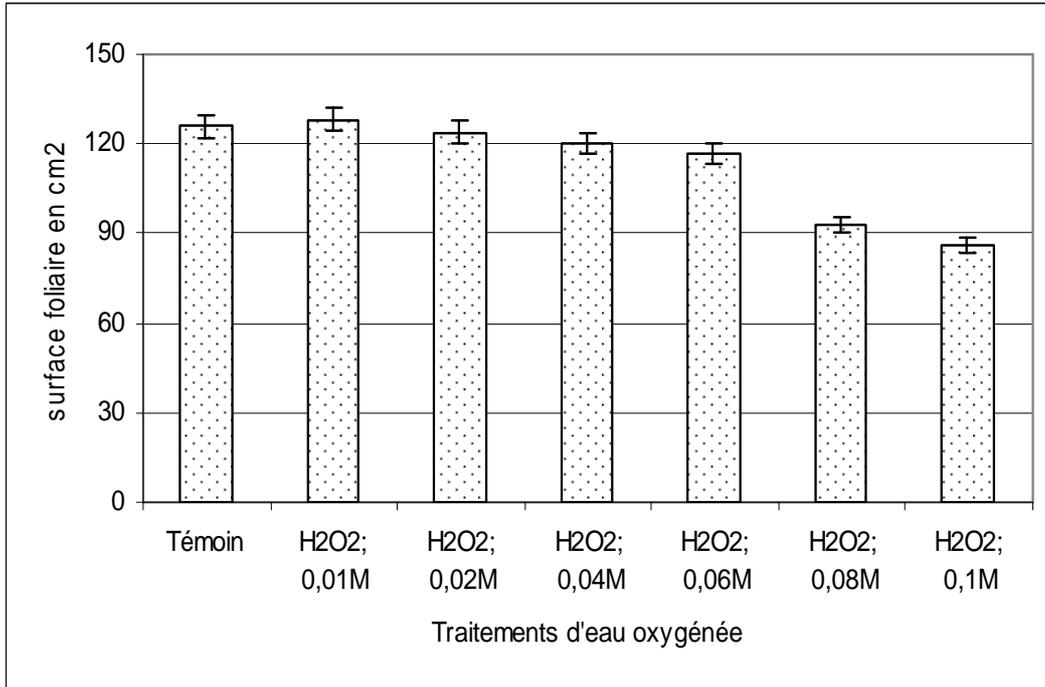
(A)



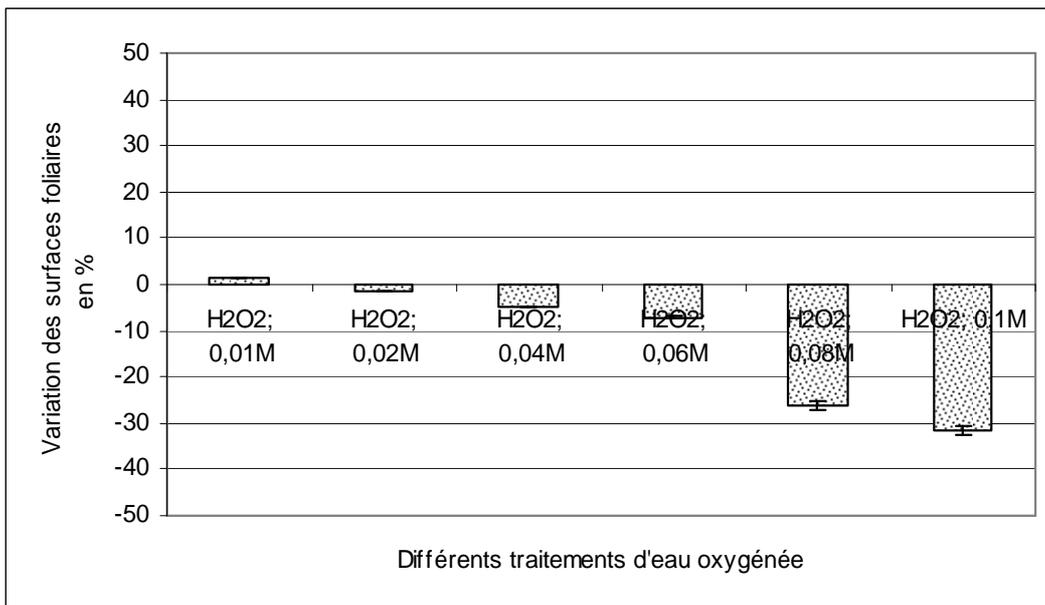
(B)

A : Diamètre des plantes au bout de 35 jours de culture ;
B : Taux de croissance diamétrale des plantes traitées par rapport aux témoins.

Figure 3: Effet de l'eau oxygénée sur la croissance secondaire des plantes de roselle.



(A)



(B)

A : Surfaces foliaires des plantes au bout de 35 jours de culture ;
B : Taux de croissance foliaire des plantes traitées par rapport aux témoins.

Figure 4: Effet de l'eau oxygénée sur la croissance des limbes foliaires des plantes de roselle.

Tableau 1: Effet de différents traitements d'eau oxygénée sur la germination des graines de roselle, cultivar RV2.

Test de Newman-Keuls : Différence significative marquée à p < 0,005							
	Témoin M =94,00	H₂O₂ 0.01M M= 95,000	H₂O₂ 0.02M M= 93,000	H₂O₂ 0.04M M=87,000	H₂O₂ 0.06M M=81,000	H₂O₂ 0.08M M=68,000	H₂O₂ 0.1 M M=57,000
Témoin	-	0,550263	0,550263	0,002165*	0,000199*	0,000151*	0,000158*
H₂O₂ 0.01M	0,550263	-	0,458818	0,001332*	0,000153*	0,000158*	0,000174*
H₂O₂ 0.02M	0,550263	0,458818	-	0,002655*	0,000186*	0,000196*	0,000151*
H₂O₂ 0.04M	0,002165*	0,001332*	0,002655*	-	0,002655*	0,000181*	0,000196*
H₂O₂ 0.06M	0,000199*	0,000153*	0,000186*	0,002655*	-	0,000177*	0,000181*
H₂O₂ 0.08M	0,000151*	0,000158*	0,000196*	0,000181*	0,000177*	-	0,000182*
H₂O₂ 0.1M	0,000158*	0,000174*	0,000151*	0,000196*	0,000181*	0,000182*	-

* : La baisse de germination des graines de la roselle induite par l'eau oxygénée (H₂O₂) est significative au seuil de 5%.

DISCUSSION

Les résultats de ce travail ont montré qu'à part les doses de 0,01M, toutes les autres concentrations d'eau oxygénée utilisées ont induit des baisses de germination des graines, des croissances longitudinale et diamétrale des tiges, et des surfaces foliaires des plantes de roselle. Les effets statistiquement significatifs ont été notés à partir des concentrations de 0,04 M, et les affections les plus sévères enregistrées aux teneurs de 0,1 M. Ces résultats sont en total désaccord avec ceux rapportés par Baeza et Vallejo (2006), qui ont plutôt révélé le caractère inducteur de ce composé. Les mécanismes physiologiques de stimulation de l'eau oxygénée ne sont pas encore bien élucidés ; Aujourd'hui, 3 modes d'action sont suggérés, à savoir : la stérilisation, la macération et la nutrition (Nicholls, 2007).

L'action stérilisante de l'eau oxygénée consiste à l'élimination de divers agents pathogènes de la flore microbienne du milieu qui entravent généralement les processus germinatifs des graines (Lee et al., 2007). Cet effet bénéfique d'amélioration de la germination a notamment été observé chez plusieurs graines de plantes, dont *Pseudotsuga menziesii* et *Terminalia ivorensis* (Matsunaga et Yamada, 2002).

La macération est une action de perméabilisation des enveloppes tégumentaires des tissus des graines (Heller et al., 2006). Elle facilite l'entrée des molécules d'eau ou d'oxygène jusqu'au niveau de l'embryon, et permet l'enclenchement des mécanismes de germination des graines traitées. Des illustrations de ce phénomène sont observées dans les travaux de Limami et al. (2008).

L'action nutritionnelle de l'eau oxygénée est liée à sa formulation moléculaire. En effet, par la nature de ses atomes structuraux, l'eau oxygénée constitue un substrat potentiel de plusieurs enzymes, notamment les catalases, les cytochromes P450, les flavines monooxygénases et les peroxydases (Matsunaga et al., 2002 ; Nicholls, 2007). Son oxydation permet de libérer des molécules d'eau (H₂O) et d'oxygène (O₂), nécessairement vitales aux

graines en voie de germination (Heller et al., 2006).

Au vu de toutes ces actions de stimulation, la baisse globale des taux de germination des graines de la roselle traitées à l'eau oxygénée dans notre travail apparaît donc surprenante. Il pourrait découler d'un effet de toxicité de cette molécule vis-à-vis des cellules de l'embryon des graines. En effet, le recours à l'eau oxygénée est généralement préconisé dans les traitements des graines à germination difficile, notamment celles à téguments subérisés en coques coriaces (noix de palme ou de coco) (Baeza et Vallejo, 2006). Dans ces conditions, l'eau oxygénée perméabilise les enveloppes tégumentaires par macération tissulaire, et libère l'embryon, qui exposé aux conditions favorables, enclenche rapidement les processus de germination. Dans le cas de la roselle, les épaisseurs des enveloppes tégumentaires, relativement fines et de constitution structurale visiblement simple, n'exigeraient pas des traitements particuliers pour germer. L'eau oxygénée franchirait donc facilement les barrières tégumentaires et macérerait directement les cellules de l'embryon, entraînant la mort des graines. Un tel mécanisme pourrait expliquer les baisses de germination des graines de roselle obtenues dans cette étude.

Du point de vue physiologique, l'action toxique de l'eau oxygénée paraît découler de la libération des radicaux libres de OH⁻ et de O₂ qui désarticulent les structures lipidiques cellulaires (Matsunaga et Yamada, 2002). Les membranes cellulaires du fait de leur composition en double couche lipidique (Maillet, 2002), en constituent les principales cibles. Les faibles augmentations de germination observées aux concentrations de 0,01 M confortent cette hypothèse. Elles proviendraient dans ces conditions du fait que les concentrations d'eau oxygénée assez faibles après la perméabilisation des téguments, ne détruiraient pas les cellules de l'embryon, qui (libérées) entameraient normalement les processus de germination des graines. C'est ce phénomène physiologique de stimulation qui se répercuterait sur les autres paramètres morphométriques mesurés, à

savoir, les croissances longitudinales et diamétrales des tiges et les surfaces foliaires.

Conclusion

Les traitements d'eau oxygénée provoquent globalement les réductions de germination des graines, des croissances longitudinales et diamétrales des tiges, et celles des surfaces foliaires des plantes de roselle. Les effets statistiquement significatifs ont été notés à partir des concentrations de 0,04 M. L'eau oxygénée n'est donc pas recommandable comme agent de stimulation de la croissance des roselles. Toutefois, les légères inductions enregistrées à 0,01 M méritent d'être analysées plus profondément, car ils pourraient révéler un mauvais choix initial de gamme de concentrations efficaces. Des effets significatifs de stimulation pourraient donc survenir à de très faibles concentrations de H₂O₂. Des travaux à venir avec des doses beaucoup plus faibles devraient permettre d'éprouver cette présomption.

REFERENCES

- Askri H, Rejeb S, Jebari H, Nahdi H, Rejeb MN. 2007. Effet du chlorure de sodium sur la germination des graines de trois variétés de pastèque (*Citrus lanatus* L.). *Science et Changements Planétaires/Sécheresse*, **18**(1): 51-55.
- Baeza MJ, Vallejo VR. 2006. Ecological mechanisms involved in dormancy breakage in *ulex parviflorus* seeds. *Plant Ecology*, **183**: 191-205.
- Heller R, Esnault R, Lance C. 2006. *Physiologie Végétale. Développement* (6^e édn de l'Abrégé). Edition Dunod: Paris ; 144-145.
- Lee BR, Kim KY, Jung WJ, Avice JC, Ourry A, Kim TH. 2007. Peroxidase and lignification in relation to intensity of water deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany*, **58**: 1271-1279.
- Lépengué AN, M'batchi B, Aké S. 2007. Impact de *Phoma sabdariffae* Sacc. sur la croissance et la valeur marchande de la roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) au Gabon. *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*, **10**: 207-216.
- Lépengué AN, M'batchi B, Aké S. 2008. Production, caractérisation et utilisation des composés toxiques de *Phoma sabdariffae* Sacc. dans la sélection des cultivars résistants de roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. var. *sabdariffa*) au Gabon. *Agronomie Africaine*, **20**(1): 59-67.
- Lépengué AN, Mouaragadja I, M'batchi B, Aké S. 2009. Etude de quelques caractéristiques physicochimiques du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc., agent pathogène de la roselle. *Science et Nature*, **6**(2): 95-105.
- Lépengué AN, Mouaragadja I, Camara B, Kone D, M'batchi B, Aké S. 2010. Impact du filtrat de culture de *Phoma sabdariffae* Sacc. sur quelques paramètres physiologiques des graines de roselle au Gabon. *Revue du Cames, Sciences et Médecine*, **10**: 41-45.
- Limami AM, Glevarec G, Ricoult C, Cliquet JB, planchet E. 2008. Concerted modulation of alanine and glutamate metabolism in young *Medicago truncatula* seedlings under hypoxic stress. *Journal of Experimental Botany*, **59**: 2325-2335.
- Maillet M. 2000. *Biologie Cellulaire : Médecine, Pharmacie 1^{ère} et 2^e année*. Edition Masson: Paris; 304 p.
- Matsunaga L, Yamada A. 2002. Enzymatic reaction of hydrogen peroxide-dependent peroxygenase cytochrome P450s: kinetic deuterium isotope effects and analyses by resonance Raman spectroscopy. *Biochemistry*, **41**(6): 1886-1892.
- Nicholls P. 2007. The Oxygenase-peroxidase theory of bach and chodat and its modern equivalents: change and permanence in scientific thinking as shown by our understanding of the roles of water, peroxide, and oxygen in the functioning of redox enzymes. *Biochemistry*, **72**(10): 1039-1050.