

INFLUENCE RECIPROQUE DE QUELQUES SUBSTANCES DE CROISSANCE DANS LA CULTURE DE TISSU DE TOPINAMBOUR (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L. VAR. VIOLET). I. LE COMPORTEMENT DU MILIEU DE CULTURE.

Z. KULESCHA

Botanisch Laboratorium, Leiden

SUMMARY

The influence of explants from tubers of Jerusalem artichoke on the culture medium was studied.

Growth substances: indolyl-3-acetic acid (IAA), 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid (2,4-D) and naphthoxyacetic acid (NoxAA) rapidly disappeared from the medium as was shown in the ether extraction.

When labelled IAA was introduced it appeared that a long extraction period with ether (48h) is necessary. IAA-1-¹⁴C decarboxylated more rapidly than IAA-2-¹⁴C. Thus all experiments were done with IAA-2-¹⁴C.

The culturing procedure was standardized: 30 ml medium (minerals of Heller, 2% glucose, 0.8% agar) containing 10 ppm IAA and about 1.2×10^6 cpm IAA-2-¹⁴C was used. Three cylindrical pieces of Jerusalem artichoke weighing each 160–180 mg were transferred to the medium. A device was made to avoid ¹⁴CO₂ losses. The disappearance of IAA from the medium was followed during 10 days. During the first 5 days the pH of the medium increased from 4.5 to 6.5. The IAA content decreased and this decrease continued and reached 50% after 10 days. This probably explains why the tissue can be transferred, after 10 days, to a medium without auxin and can continue its development. The decarboxylation of IAA, naturally taking place, is much (10×) enhanced by the tissue. The problem now is, whether the tissue enhances the decarboxylation in the medium, or whether the tissue absorbs the intact IAA and secretes the decarboxylated product into the medium.

1. INTRODUCTION

Depuis que les cultures des tissus végétaux ont été réalisées on a continuellement cherché à améliorer leur développement. WHITE (1939), GAUTHERET (1959), HELLER (1953), MURASHIGE & SKOOG (1962) ont essayé de réaliser des milieux qui permettent d'obtenir une croissance optimale. L'action du tissu sur le milieu de culture a été beaucoup moins étudiée. Seules les sécrétions de quelques enzymes ont fait l'objet de plusieurs publications: NICKELL & BRAKKE (1954), KARSTENS & DE MEESTER-MANGER CATS (1960), JASPARS & VELDSTRA (1965), mais peu de travaux ont été réalisés sur l'utilisation par les tissus de divers composés du milieu durant les premiers jours qui suivent la mise en culture.

En utilisant des fragments de tubercule de Carotte, HELLER (1956) a constaté que la teneur en phosphate du milieu diminuait de 56% après 19 jours de cul-

ture. Par contre GORIS (comm. personnelle) ne commença à observer une diminution sensible du sucre qu'en fin de culture. Généralement on s'arrange pour que les composants du milieu se trouvent en excès.

Après avoir réalisé une combinaison de diverses substances de division JABLONSKI & SKOOG (1954) conclurent que l'acide β indolyl-acétique devait toujours être présent dans le milieu pour obtenir une croissance du tissu.

En étudiant l'ordre d'action de l'acide indolyl-3-acétique et de la kinétine, NITSCH & BUI DANG HA (1966) constatèrent qu'après 2 jours le tissu de Tabac avait absorbé suffisamment de kinétine mais pas assez d'acide indolyl-3-acétique pour permettre un développement complet.

Les fragments de rhizome de Topinambour ne peuvent se développer *in vitro* en absence d'auxine du type acide indolyl-acétique (AIA), acide naphthyl acétique (ANA), acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), acide naphthoxyacétique (ANoxA) ou autre. Mais, en étudiant la rhizogenèse de ces tissus GAUTHERET (1966) constata qu'il n'est pas indispensable que l'ANA soit présent pendant toute la durée de la culture. Si après 5 ou 10 jours il transférait les fragments sur un milieu dépourvu de cette substance le développement continuait. Cette observation suggère que les tissus en 5 à 10 jours absorbent suffisamment d'ANA pour leur développement.

La disparition de l'AIA au cours de la culture des Bryophytes a été observée par SCHNEIDER *et al.* (1967). En 14 jours 95 % de cet AIA avait disparu du milieu. COLLET (1968) de son côté constata avec des cultures de racines de Pois une disparition beaucoup plus rapide. Après 8 heures presque tout l'AIA était absorbé par les racines, et un produit de décarboxylation était apparu.

J'ai entrepris ce travail dans le but d'étudier la disparition et la dégradation des substances de croissance dans le milieu, sous l'influence des colonies tissulaires provenant du rhizome de Topinambour.

2. MATERIEL ET METHODES

Les tubercules de Topinambour (*Helianthus tuberosus* L. var. Violet) furent cultivés à Voorhout à l'annexe du jardin botanique de l'Université de Leiden. L'Avoine utilisée pour le test Avoine fut Hull-less Oats var. Brighton fournie gracieusement par Canadian Agricultural Experimental Farm Scott Saskatchewan (Can.). Les milieux ont une composition simple: macro- et microéléments de la solution de HELLER (1953), 2 % de glucose, 0,8 % de gélose (Noble Difco) et une auxine telle que 2,4-D., AIA ou ANoxA. La concentration de ces substances est de l'ordre de 10^{-5} g/ml. Les milieux dont le volume est 10 ml par segment ensemencé, sont stérilisés à 110°C pendant 20 minutes.

La surface du segment ensemencé ayant une grande importance sur la croissance, tous les fragments ont une forme cylindrique de 4,8 mm de diamètre et de 15 mm de hauteur; leur poids est à peu près entre 160 et 180 mg.

Une comparaison a été faite entre les extraits étherés de milieux ayant ou non reçu un fragment tissulaire. Cette comparaison a été poursuivie pendant quelques jours.

Les auxines sont extraites du milieu, par de l'éther purifié, pendant 7 heures en changeant le solvant 4 ou 5 fois. Après réduction du volume de l'éther, l'extrait était chromatographié sur papier (Whatman nr. 1) avec de l'isopropanol: ammoniac: eau (10:1:1). La zone correspondant à ces substances est éluee par un mélange alcool: eau (9:1) selon KAPER (1958) et examinée par spectrophotométrie (Beckman DB): chaque auxine ayant une courbe très spécifique dans l'ultraviolet (entre 320 et 220 nm). (fig. 1).

Parallèlement les extraits du chromatogramme ont été dosés par un test biologique (SIROIS 1966): les graines sont mises à germer pendant 72 heures à une température de 25°C et à l'obscurité jusqu'à ce que les coléoptiles aient une longueur de 18 à 20 mm. A 3 mm en dessous de leur pointe on découpe du coléoptile des segments de 4 mm. Ce sont ces segments qui sont utilisés pour le dosage.

Etant donné que l'AIA est considéré comme une substance de croissance naturelle, la plupart des recherches ont été faites avec cette auxine et afin d'obtenir plus de précision, nous avons utilisé de l'AIA marqué au ^{14}C .

L'acide β indolyl-acétique marqué dans le carboxyle (AIA-1- ^{14}C) (activité spécifique 25,6 mCi/mM) et l'acide β indolyl-acétique marqué dans le groupe méthyle (AIA-2- ^{14}C) (activité spécifique 42,5 mCi/mM) ont été fournis par AMERSHAM (Grande-Bretagne) dans une solution de benzène acétone (9:1). La

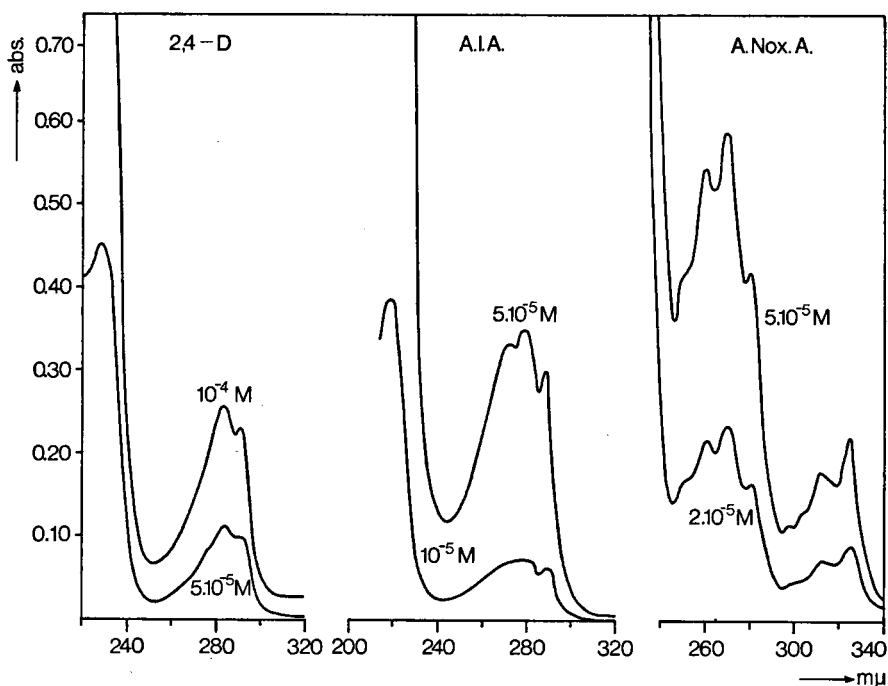


Fig. 1. Courbes obtenues par spectrophotométrie dans l'UV du Beckman DB.

chromatographie de ces substances montre que 100% de l'activité de l'AIA-1- ^{14}C et 93% de celle de l'AIA-2- ^{14}C se trouvent localisé sur la tache spécifique de l'AIA.

L'AIA-2- ^{14}C a été purifié avant usage selon la méthode de LARSEN (1955). Les impuretés passent dans la fraction neutre et l'AIA-2- ^{14}C dans la fraction acide. L'AIA-2- ^{14}C est repris par une solution de benzène: acétone. Si l'on garde cette solution plus de 10 jours une impureté réapparaît ce qui semble indiquer que cette impureté est un produit de dégradation de l'AIA-2- ^{14}C .

Lorsqu'on chromatographie l'AIA-2- ^{14}C ainsi dégradé avec différents solvants (isopropanol: ammoniacque: eau = 10:1:1; acétate d'éthyl: méthanol: diéthylamine = 45:35:20 ou acétate de méthyl: isopropanol: ammoniacque = 70:20:5) le R_f est toujours 0.85-1.0. Afin d'éviter que le $^{14}\text{CO}_2$ ne se dégage dans l'atmosphère, un dispositif permet son absorption par du KOH (fig. 2).

Au cours de la stérilisation, l'AIA-1- ^{14}C dégage une quantité de $^{14}\text{CO}_2$ environ 300 fois plus élevée que celle dégagée par l'AIA-2- ^{14}C . Ce n'est que lors du développement des cultures et durant quelques jours que la quantité de $^{14}\text{CO}_2$ devient plus importante, mais elle reste insignifiante par rapport à la quantité de AIA-2- ^{14}C utilisée.

Pour normaliser les expériences, 3 fragments de tissus de 160 à 180 mg sont ensemencés sur 30 ml de milieu gélosé dont la composition a été décrite plus haut. La concentration de l'AIA est de l'ordre de 10^{-5}g/ml et correspond dans la majeure partie des expériences à 1,200,000 dpm (désintégrations par minute) de l'AIA-2- ^{14}C .

Une solution de 25% de KOH, 0.5 ml environ, est introduite dans le support. A la fin de l'expérience la solution de KOH est diluée jusqu'à un volume final de 15 ml afin d'obtenir une concentration voisine de 1.5 à 1%. De cette dilution

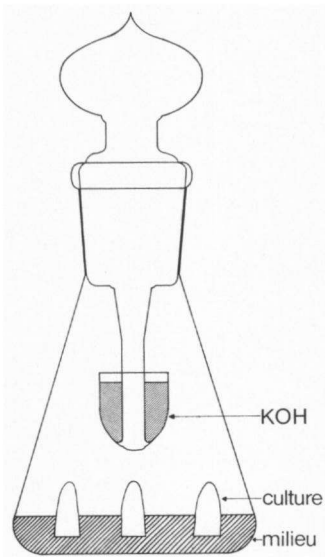


Fig. 2. Dispositif utilisé afin de normaliser la culture de tissu de Topinambour en présence d'AIA marqué.

0.5 ou 1 ml est introduite dans une fiole de comptage, le liquide de scintillation est ajouté (dioxane, naphthalène, PPO) ainsi que de l'aérosil (fourni gracieusement par la Maison NETHE). On procède au comptage dans un compteur à scintillation liquide (Nuclear Chicago Mark I.).

Afin de doser la quantité totale de radioactivité contenu dans le milieu de culture, celui-ci est liquéfié et 0.5 ml est utilisé pour la détermination.

Les substances radioactives contenues dans le milieu sont extraites par l'éther. Ensuite on liquéfie de nouveau le milieu afin de doser la quantité de dpm qui n'a pas été extraite.

L'extrait étheré est évaporé à sec sous un courant d'azote à la température ambiante. Le résidu est repris par un mélange de benzène-acétone. C'est à partir de cette solution que les chromatogrammes sur couche mince et les comptages sont effectués.

Le gel de silice G d'une épaisseur de 0.25 mm a été utilisé pour les chromatogrammes sur couche mince. Le solvant est également l'isopropanol: ammoniaque: eau (10:1:1). L'AIA est chromatographié en même temps. Après examen de la plaque en lumière UV, on procède à la détermination de la radioactivité. Pour cela le gel de silice est gratté de la plaque de verre et introduit directement dans le liquide de scintillation (ici généralement du toluène et du PPO).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

La dissolution des substances de croissance dans le milieu de culture montre déjà à quel point leur stabilité semble différente. La quantité d'auxine dissoute est toujours 100 µg/10 ml de milieu, mais la quantité extraite par la méthode mentionnée varie avec la substance utilisée. Le 2,4-D est récupéré à 100%, l'ANoxA à 50% et l'AIA à seulement 20%. La stérilisation ne semble pas avoir une grande influence sur les quantités récupérées après extraction.

Après la mise en culture du tissu les auxines diminuent rapidement (*fig. 3*).

Ces résultats ont été confirmés par le test biologique.

Des résultats plus précis furent obtenus en utilisant les substances de croissance marquées. Lorsque le milieu a reçu de l'AIA-1-¹⁴C, surtout après stérilisation, la potasse contient un nombre de dpm très élevé. Ceci prouve que la décarboxylation est importante. Si l'on ajoute 750,000 dpm au milieu, après stérilisation, on trouve 650,000 dpm dans le milieu et 25,000 dpm dans la potasse.

Si l'on emploie de l'AIA-1-¹⁴C, la radioactivité retrouvée dans l'extrait correspond à la molécule d'AIA intacte. Mais en raison des pertes signalées nous avons préféré utiliser l'AIA-2-¹⁴C, purifié préalablement. Lorsqu'il y a décarboxylation, la radioactivité reste dans le milieu. En dosant cette radioactivité, on a une indication de la partie non utilisée par les tissus.

La même méthode d'extraction décrite plus haut, s'est avérée insuffisante. Il fallait en effet opérer pendant 48 heures, en agitant, à température ambiante, pour extraire 85% de la radioactivité introduite dans le milieu. Or 40 ml d'éther sont utilisés par 10 ml de milieu, ce qui explique peut-être les grandes pertes obtenues au cours des premières expériences.

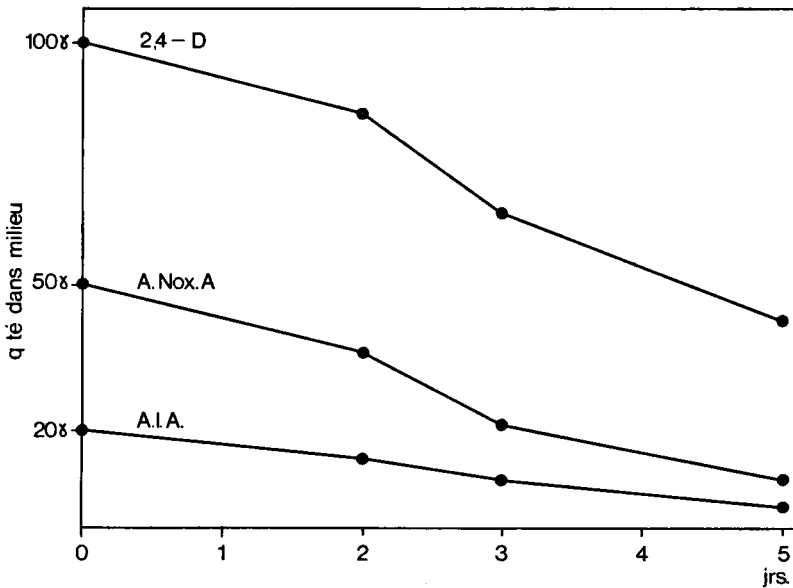


Fig. 3. Courbes illustrant la disparition de diverses substances de croissance au cours de la culture. En ordonnée la quantité extraite du milieu. En abscisse durée de la culture en jours. Les quantités ont été dosées en se servant des courbes obtenues dans l'UV.

Comme indiqué précédemment, la trame du travail était la suivante: après une période plus ou moins longue de culture, on détermine la quantité totale de dpm contenue dans le milieu. Ensuite on extrait ce milieu par de l'éther et en fin d'extraction on dose le nombre de dpm non extrait. Les résultats sont résumés dans le *tableau 1*.

Tableau 1. Disparition de la radioactivité du milieu au cours de la culture. Toutes les valeurs sont exprimées en dpm $\times 10^{-4}$.

Durée de la culture en jours	0	3	6	10
nombre total	123	110	94	59
quantité extraite	113	69	37	25
nombre après extraction	4	14	29	

L'examen de ce tableau montre:

1. qu'il y a toujours des pertes pendant l'extraction, mais celle-ci est indispensable puisque sans elle nous n'avons aucune indication sur les produits présents dans le milieu.
2. que plus la durée de la culture est longue, plus le nombre de dpm qui restent dans le milieu après extraction est élevé. Immédiatement après dissolution il est possible d'extraire 93% des dpm, après 3 jours 73%, après 6 jours 49% et après 10 jours seulement 44%.

Au cours de la culture le pH du milieu change. Au moment de la mise en culture il est de 4.5, après 3 jours de 5.8, après 5 jours de 6.5. Ensuite il reste stable.

En raison du fait que durant la purification de l'AIA cette substance passe dans le fraction acide, on pouvait supposer qu'avec un changement du pH du milieu, l'extraction entraînerait d'autres substances.

Le tableau 2 résume les résultats obtenus.

Tableau 2. Extraction de la radioactivité du milieu après modification du pH. Toutes les valeurs sont exprimées en dpm $\times 10^{-4}$.

Durée de la culture en jours	0	3	5	10
nombre total	114	88	77	49
extraction par l'éther sans modification du pH	81	68	51	17
nombre après extraction	11	14	26	29
extraction à pH 7	8	7	6	2
nombre après extraction	102	70	75	41
extraction à pH 3-4	81	70	67	30
résidu dans milieu après extraction	11	6	9	12

Ce tableau nous montre que le pH joue un rôle important dans l'extraction. Plus on abaisse le pH plus l'activité extraite est importante.

Examinons maintenant les chromatogrammes de ces extraits éthers. Sur le chromatogramme de l'extrait témoin toute la radioactivité se trouve localisée sur l'AIA: il n'y aurait pas eu de dégradation. Ceci semble peu probable si l'on compare avec les données fournies à l'aide de l'AIA-1- ^{14}C .

Si le pH du milieu est ajusté à 7 le nombre de dpm contenu dans l'extrait baisse, mais sur le chromatogramme 20% de la radioactivité a le même Rf que le produit de dégradation de l'AIA. Ceci a été contrôlé à l'aide de trois solvants. Ce pourcentage de dégradation est quand-même insignifiant par rapport à la radioactivité totale puisque 20% de 80,000 dpm = 16,000 dpm, ce qui ne fait par rapport au total (1,140,000 dpm) que 1.5%. Le Rf de ce produit (0.85-1.0) laisse supposer qu'il y a eu décarboxylation, mais elle est beaucoup plus faible que lorsque l'on utilise l'AIA-1- ^{14}C .

En laissant reposer ce milieu témoin pendant 10 jours, on observe une dégradation qui peut atteindre 3% et cela sans changement de pH.

Lorsqu'un fragment est placé durant 3 jours sur ce milieu, le produit de dégradation peut atteindre 6% du total, il est de 10% après 5 jours, et de 34% après 10 jours.

Plusieurs auteurs ont essayé d'identifier ce produit. PILET (1966) suppose que c'est du scatol. MORRIS *et al.* (1969) suggèrent la présence d'aldéhyde indolyl-3-acétique mais jusqu'à présent je n'ai pu identifier ni l'une ni l'autre de ces substances.

Une dégradation en methoxyindolyl est encore possible. COLLET (1968) a extrait de grandes quantités d'un produit semblable du milieu de culture de racines de Pois même lorsque le pH était de 2.5.

Comparons maintenant ces résultats avec les observations de GAUTHERET

(1966) où il constate qu'en 5 à 10 jours les tissus de Topinambour peuvent absorber suffisamment d'ANA pour continuer leur développement en absence de cette substance. La disparition de la radioactivité du milieu est de 18 % après 3 jours, 30 % après 6 jours et 50 % après 10 jours. La radioactivité dans le KOH est insignifiante par rapport à la quantité totale. On peut donc supposer que tout cet AIA-2- ^{14}C a été absorbé par le tissu. D'après NITSCH & BUI DANG HO (1967) la quantité absorbée en deux jours serait insignifiante mais en 5 jours elle deviendrait importante.

Les recherches de GAUTHERET ont été faites avec l'ANA et l'étude poursuivie ici avec l'AIA. Si l'on compare la rapide disparition de substances très différentes comme le 2,4-D. et l'ANoxA on peut supposer que ce procédé est général. Un autre fait est à constater: l'augmentation du produit de dégradation. J'avais déjà signalé sa formation spontanée. Mais sa quantité reste alors sensiblement inférieure à celle en présence de la culture. Il est probable que le tissu absorbe seulement la molécule intacte de l'AIA ce qui augmenterait le pourcentage de la molécule dégradée mais ceci n'explique pas la valeur élevée obtenue après 10 jours de culture.

Deux autres hypothèses peuvent être émises:

1. le tissu accélère la dégradation de l'AIA dans le milieu
2. le tissu absorbe l'AIA et sécrète le produit dégradé

Dans une prochaine publication j'espère pouvoir apporter une réponse à ce problème.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie Monsieur le Professeur Karstens pour son intérêt manifesté au cours de ce travail. Elle remercie également Mademoiselle van Laar pour son assistance technique, Mademoiselle Cool pour la préparation des milieux et Mademoiselle Richez pour la correction du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- BENNET-CLARK, T. A. & N. P. KEFFORD (1953): Chromatography of the growth substances in plant extracts. *Nature (London)* **171**: 645.
- COLLET, G. F. (1968): Métabolisme intracellulaire et extracellulaire de l'acide-3-indolylacétique dans les cultures aseptiques ou non aseptiques de pointes de racine du *Pisum sativum*. *Canad. J. Bot.* **46**: 969-978.
- GAUTHERET, R. J. (1959): *La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation*. Masson et Cie. Paris.
- (1966): Recherches sur la rhizogenèse des tissus de Topinambour cultivés in vitro. *Les Phytohormones et l'Organogenèse*. **38**: 83-94.
- HELLER, R. (1953): Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés in vitro. *Ann. Sc. Nat. Bot. série 11*. **14**: 1-219.
- HELLER, F. (1956): Absorption et migration du phosphore dans des fragments de racines de Carotte. *Rev. Gén. Bot.* **63**: 105-125.
- JABLONSKI, J. R. & F. SKOOG (1954): Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant* **7**: 16-24.
- JASPARS, E. M. J. & H. VELDSTRA (1965): An α -amylase from tobacco crown-gall tissue cultures. II Measurements of the activity in media and tissues. *Physiol. Plant*. **18**: 626-634.

- KAPER, J. M. (1957): *Over omzettingen van tryptophaan door Agrobacterium tumefaciens*. Thèse, Leiden.
- KARSTENS, W. K. H. & V. DE MEESTER-MANGER CATS (1960): The cultivation of plant tissues in vitro with starch as a source of carbon. *Acta Bot. Neerl.* **9**: 263–274.
- KULESCHA, Z. (1968): Influence réciproque de 2,4-D. (et de quelques autres substances) sur la culture du Topinambour. *Colloque national C.N.R.S.* nr 920 à Strasbourg 5–7 mai 1967: 231–249.
- LARSEN, P. (1955): On the separation of acidic and non acidic auxins. *Physiol. Plant.* **8**: 343–357.
- MORRIS, D. A., R. E. BRIANT & P. G. THOMSON (1969): The transport and metabolism of ^{14}C -labelled indoleacetic acid in intact pea seedlings. *Planta (Berl.)* **89**: 178–197.
- MURASHIGE, T. & F. SKOOG (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497.
- NICKELL, L. G. & M. K. BRAKKE (1954): Secretion of α -amylase by Rumex virus tumors in vitro. Biological studies. *Amer. J. Bot.* **41**: 390–394.
- NITSCH, J. P. & D. BUI DANG HA (1967): Effet de l'ordre d'application de l'acide indolyl-3-acétique et de la kinétine sur la division cellulaire. *C. R. Acad. Sc. série D.* **264**: 288–291.
- PILET, P. E. (1966): Un effet de rétroaction (feedback) auxine-oxydasique. *C. R. Acad. Sc. série D* **263**: 864–867.
- POSTUMUS, A. C. (1967): *Crown-gall en indolazijnzuur*. Thèse, Leiden.
- SCHNEIDER, M. J., R. F. TROXLER & P. D. VOTH (1967): Occurrence of indoleacetic acid in the Bryophytes. *Bot. Gaz.* **128**: 174–179.
- SIROIS, J. C. (1966): Studies on growth regulators. I Improved Avena coleoptile elongation test for auxin. *Plant Physiol.* **41**: 1308–1312.
- VEEN, H. (1966): Transport, immobilization and localization of naphthyl acetic acid-1- ^{14}C in Coleus explants. *Acta Bot. Neerl.* **15**: 419–433.
- & W. P. JACOBS (1969): Transport and metabolism of indole-3-acetic acid in Coleus petiole segments of increasing age. *Plant Physiol.* **44**: 1157–1162.
- WHITE, PH. R. (1939): Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Amer. J. Bot.* **26**: 59–64.