Zeitschrift: Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft = Bulletin de la Société Botanique Suisse

Herausgeber: Schweizerische Botanische Gesellschaft

Band: 74 (1964)

Artikel: Contribution à la localisation de la biogenèse des pigments anthocyaniques du méristème de la coiffe de Chrysanthemum Leucanthemum L. par la méthode de culture d'organes in vitro

Autor: Béguin, François

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-52033

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 02.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Contribution à la localisation de la biogenèse des pigments anthocyaniques du méristème de la coiffe de Chrysanthemum Leucanthemum L. par la méthode de culture d'organes in vitro

Par *François Béguin*

Institut de botanique de l'Université, Neuchâtel

Manuscrit reçu le 19 octobre 1964

Introduction

Diverses expériences récentes, concernant surtout la biogenèse des alcaloïdes, ont mis en évidence un certain degré d'autonomie physiologique de la racine (Mothes, 1953).

Le problème, très complexe, des relations physiologiques de la racine et du reste de la plante demeure cependant confus.

La présence, dans le dermato-calyptrogène de certaines plantes, d'un pigment anthocyanique très localisé a déjà retenu l'attention de nombreux auteurs. Weber (1954) y voit une preuve de l'activité biosynthétisante de la racine et surtout de ses parties les plus jeunes.

Le fait que ce pigment existe chez les racines de toutes les plantes d'une même espèce, et que cette propriété peut servir à caractériser certains groupes systématiques, montre qu'il s'agit d'un *caractère d'organisation* profond et plus ou moins indépendant des circonstances externes, contrairement à ce qu'on peut observer au niveau d'organes tels que tige et feuille. Il faut citer à ce propos les observations de Favarger (1957) qui ont révélé la présence de pigments anthocyaniques dans le dermato-calyptrogène de toutes les Saxifragacées herbacées étudiées à ce point de vue, alors qu'aucune des Saxifragacées ligneuses examinées n'en présentait. Plus récemment, le même auteur (1962) montre que toutes les *Melastomataceae* examinées en présentaient à l'exception du genre *Memecylon*.

Toutefois, les observations effectuées jusqu'à présent sur des plantes entières ne permettent pas d'évaluer l'étendue du pouvoir de synthèse du méristème radiculaire. En effet, l'apparition de l'anthocyane peut résulter simplement de la transformation d'un précurseur incolore formé ailleurs dans la plante, soit aux dépens des réserves hydrocarbonées et azotées des cotylédons, soit aux dépens des produits de la photosynthèse. C'est pourquoi il nous a paru intéressant de rechercher si la production

d'anthocyane apparaît et se maintient dans les racines isolées, cultivées en milieu synthétique.

Nous tenons à remercier M. le professeur C. Favarger. Tout au cours de ce travail, il a su éveiller notre curiosité et notre sens critique. Nous lui savons gré des innombrables conseils qu'il nous a donnés, ainsi que de la critique attentive qu'il a accordée à nos résultats et à notre manuscrit.

Matériel étudié

Nos expériences ont porté sur les akènes de *Chrysanthemum Leucanthemum* L. ssp. *heterophyllum* Willd. La radicule de cette plante peut être considérée comme relativement «grosse» par rapport à celle des autres plantes possédant de l'anthocyane dans la coiffe (Melastomatacées, Saxifragacées).

Nous avons vérifié (Blank, 1947) la nature anthocyanique du pigment étudié en soumettant les racines aux vapeurs d'ammoniaque; on observe un virage de la coloration du pigment du rouge au violet, correspondant à la transformation du sel d'oxonium en anthocyanidine libre.

Technique

Nous avons eu recours à la culture pure de méristèmes radiculaires isolés de la plantule.

Ce genre de culture est souvent utilisé et les méthodes en sont éprouvées. Cependant, un problème particulier est apparu, lié à notre travail: le pigment anthocyanique se forme dès le début de la germination. Aussi, avons-nous été obligé d'isoler la radicule très tôt, immédiatement après le gonflement des akènes, ce qui nécessite une délicate dissection d'embryon. D'autre part, la radicule doit être coupée très près de sa pointe sinon l'hypocotyle, qui se différencie, verdit très rapidement à la lumière, si bien que la racine n'est plus soustraite à l'influence des substances résultant de l'assimilation chlorophyllienne.

Nous avons donc mis au point une technique dont nous décrirons brièvement les principales opérations.

Désinfection des akènes

Elle est effectuée selon la technique décrite par Gautheret (1937). Les akènes sont immergés 12 heures dans une solution aqueuse d'hypochlorite de calcium, renouvelée toutes les heures pendant les trois premières heures. De plus, nous faisons agir le vide, ce qui active la dissociation de l'hypochlorite avec production de chlore naissant et favorise la pénétration de celui-ci dont les propriétés antiseptiques sont considérables.

Excision de l'embryon, coupe de la radicule et mise en culture des méristèmes isolés

L'excision des embryons s'effectue à l'aide de deux brucelles fines; on saisit l'akène par deux de ses côtes voisines qu'on écarte. Le fruit est ainsi fendu sur toute sa longueur, libérant l'embryon entouré de l'unique tégument de la graine. Les embryons sont immédiatement transportés hors de l'aire de dissection (inévitablement souillée par les embryons avortés et infectés, rencontrés dans certains akènes), dans un champ stérile. Il faut d'autre part veiller à ce que les plantules ne se dessèchent pas. On enlève alors le tégument de la graine, et le méristème radiculaire coupé à l'aide d'un scalpel stérile à un tiers de millimètre environ de la pointe de la radicule (fig. 1 a), est ensemencé sur le milieu de culture stérilisé.

Rappelons que toutes ces opérations sont effectuées immédiatement après le gonflement des akènes, simultané à la désinfection.

Milieux et récipients de culture

Les milieux mis au point pour la culture indéfinie des méristèmes radiculaires et contenant des éléments traces (oligo-éléments minéraux, vitamines, acides aminés) peuvent être remplacés par des milieux plus simples si l'on veut observer seulement les premiers stades de la culture.

Ainsi, la base de notre milieu est le liquide de Knop dilué de moitié, auquel nous ajoutons 2 % de gélose et la concentration voulue de glucose.

Nous avons porté notre choix sur le milieu de culture solide pour les deux raisons principales suivantes:

1. En milieu liquide, nous avons observé de nombreux méristèmes anormaux dès le deuxième jour de culture. Gautheret (1945), cherchant à réaliser la culture des tissus végétaux, avait déjà constaté l'action «toxique» d'une solution nutritive sur le fragment de végétal qui y était immergé. L'auteur attribuait ce phénomène à une «intoxication» des tissus par le contact direct de la solution. Il s'agit peut-être aussi d'un défaut d'oxygénation; l'aération des cultures en milieu liquide est difficile et nécessite soit une agitation permanente, soit le passage d'un courant d'air stérile. La pression osmotique pourrait enfin être la cause de ces anomalies.
2. La culture en milieu solide place la racine isolée dans des conditions plus voisines de celles où se trouvent les organes témoins rattachés au reste de la plante, dans le germoir. Les milieux contenant la gélose préalablement lavée sont coulés soit en boîte de Petri, soit en tubes à essais, puis stérilisés dans l'autoclave à 110 °C.

La croissance des racines est établie en mesurant leur longueur à la chambre claire après étalonnage. La pigmentation anthocyanique est suivie chaque jour à la loupe binoculaire, les méristèmes étant aussi examinés au microscope dans le liquide de Ringer.

Observations et interprétations

Nos tentatives de culture *in vitro* de méristèmes radiculaires isolés de l'embryon immédiatement après le gonflement ont donné des résultats positifs (fig. 1b).

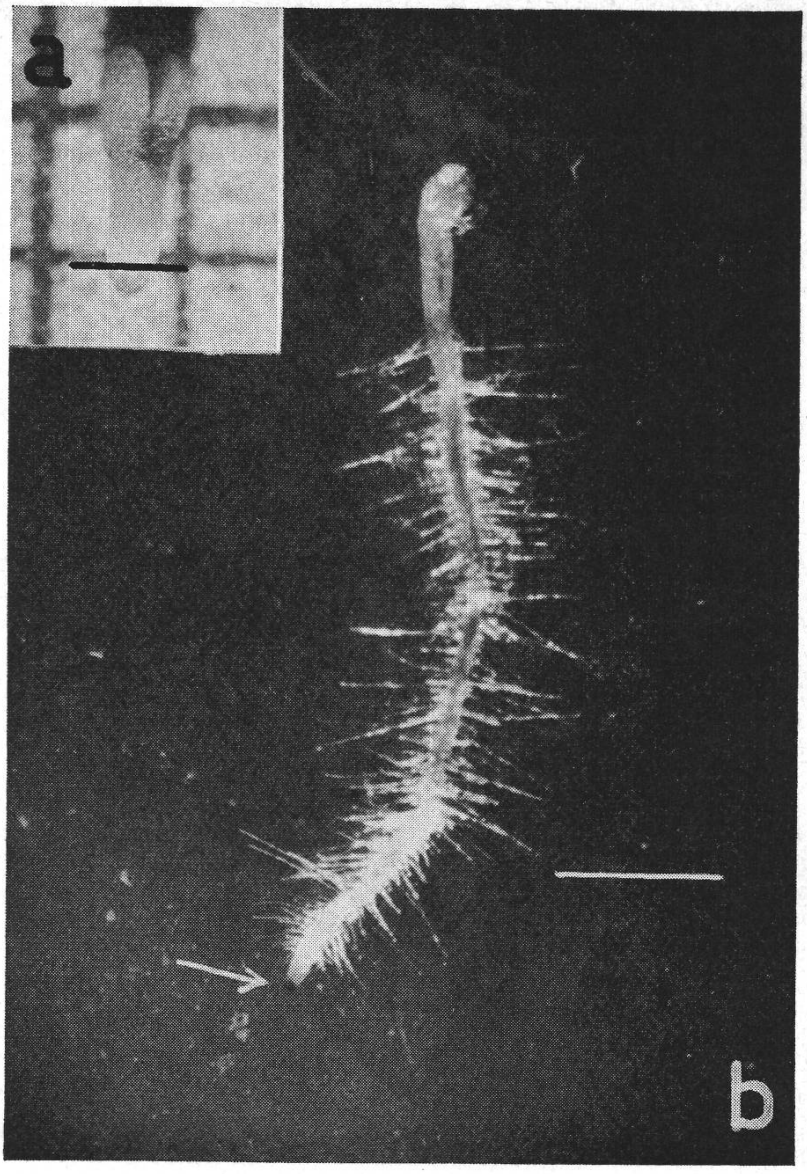

Figure 1

a) Embryon de *Chrysanthemum Leucanthemum* L. Le trait indique le niveau d'excision de la radicule

b) Racine après 12 jours de culture (21 °C, 2 % de glucose, lumière diurne). On distingue la pigmentation anthocyanique à l'extrémité de la racine (flèche). Culture en tube à essai sur couche mince de milieu gélosé, photographie à travers le verre et le milieu. Le trait correspond à 2 mm

Comportement des méristèmes radiculaires cultivés in vitro, apparition et maintien de l'anthocyane

Nous avons cultivé les méristèmes dans les conditions décrites, sur milieu gélosé contenant 2 % de glucose, à 21 °C et à la lumière diurne. Nous avons ainsi pu définir certaines conditions de l'apparition et du maintien de l'anthocyane dans les cellules du méristème de la coiffe.

Définissons:

$$T = \frac{l_n - l_o}{l_o} \times 100$$

ou:

T = taux de croissance
l_n = longueur de la racine au $n^{ième}$ jour de la culture
l_o = longueur initiale de la radicule isolée de l'embryon
$\overline{T}$ = taux moyen de croissance
s = écart type du taux de croissance

Les résultats (pour 20 racines) ont été consignés dans le tableau suivant:

Jour	$\overline{T}$	s	Anthocyane
0	0	—	0
1	0	—	0
2	30	20	+
3	120	110	+
4	390	180	+
5	600	180	+
6	870	210	+
7	1080	270	+
8	1320	300	+
9	1500	330	+
10	1710	390	+
11	1950	480	+
12	2100	480	+
13	2200	470	+
14	2250	440	+
15	2280	440	+
16	2290	420	+

Si nous reportons ces résultats sur un graphique (fig. 2) nous obtenons une courbe en S et nous pouvons mettre en évidence les faits suivants:

1. Pendant 24 à 48 heures, la croissance de la racine est nulle; les cellules du méristème sont dépourvues d'anthocyane. Ce temps de latence est général: il s'observe aussi bien sur les racines coupées et ensemencées après germination que sur les radicules isolées de l'embryon. Nous l'avons également observé en cultivant des racines de *Lupinus albus* L.

2. Après 48 heures, la croissance se manifeste *en même temps qu'apparaît le pigment anthocyanique*. Les méristèmes avortés ne présentent pas de pigmentation. Ces faits sont à mettre en rapport avec ce que l'on peut

observer lors de la germination dans les conditions habituelles, où le pigment apparaît également en même temps que commence la croissance du méristème radiculaire, et est absent des racines avortées. D'une façon générale, on peut établir une relation étroite entre l'intégrité et la croissance normale du méristème, d'une part, et l'apparition du pigment anthocyanique dans les vacuoles, d'autre part. Cette relation avait déjà été mentionnée par Favarger (1957) au sujet des Saxifragacées herbacées.

3. A partir du 3e jour la croissance est linéaire.

4. Vers le 13e jour, la croissance diminue pour cesser complètement vers le 15e jour de culture. La pigmentation s'atténue à ce moment.

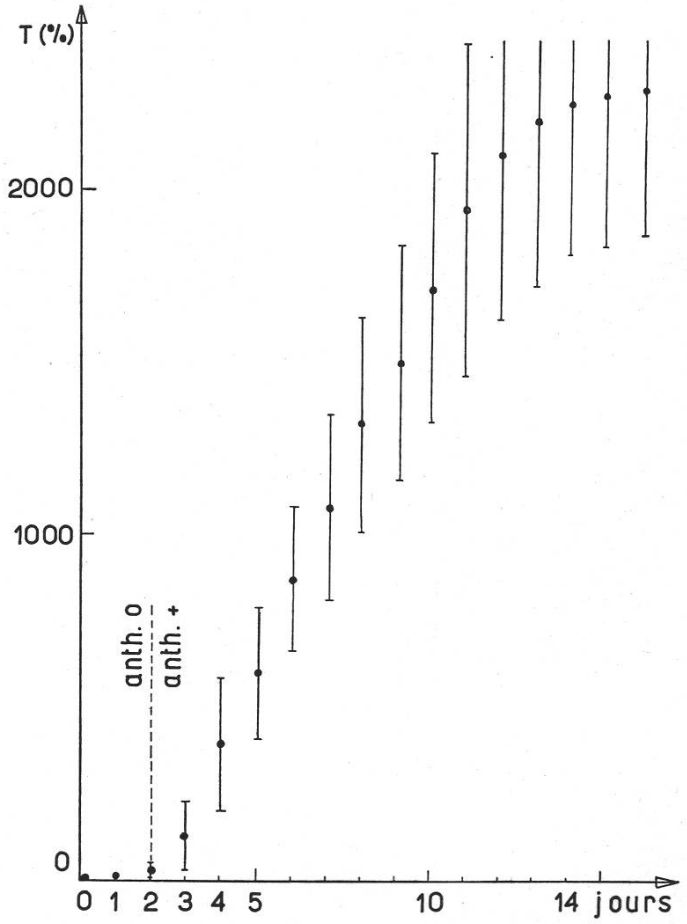

Figure 2

Courbe de croissance (en S) déterminée à partir d'un lot de 20 racines (21 °C, 2 % de glucose, lumière diurne). Les écarts types sont indiqués

Nous indiquerons maintenant brièvement l'influence de certains facteurs sur le comportement de la pigmentation anthocyanique des racines en culture pure. Nous serons très prudents dans nos affirmations en l'absence de déterminations quantitatives de la teneur des méristèmes en

anthocyane. Frey-Wyssling et Blank (1943), dans leur étude sur le chou rouge, nous rendent en effet très attentifs au fait que la coloration apparente ne correspond pas nécessairement au taux réel de pigment.

Influence de la lumière

Afin de déterminer l'influence de ce facteur, nous avons disposé des cultures de racines dans les trois conditions expérimentales suivantes: lumière permanente, lumière naturelle diurne, obscurité totale. La température est maintenue constante (21 °C), de même que la concentration de glucose (2 %).

En lumière permanente, la croissance est nulle et l'anthocyane n'apparaît pas.

Les faits observés dans les deux autres conditions autorisent les remarques suivantes:

1. Dans les deux cas, la pigmentation anthocyanique apparaît avec la même intensité et au même moment, soit, comme nous l'avons mentionné plus haut, lorsque se manifeste le début de la croissance.
2. Après une semaine, l'examen microscopique des racines exposées à la lumière naturelle diurne et abandonnées à l'obscurité pendant la nuit révèle une pigmentation sensiblement plus intense et plus étendue que chez les racines maintenues à l'obscurité totale. Nous avons pu faire les mêmes constatations sur les racines rattachées à la plantule, constatations déjà mentionnées par Weber (1954) pour *Impatiens Balsamina* L. Cette expérience permet de supposer une relation entre la formation d'anthocyane et le déroulement de réactions photochimiques. Elle montre aussi que l'assimilation chlorophyllienne, si elle joue un

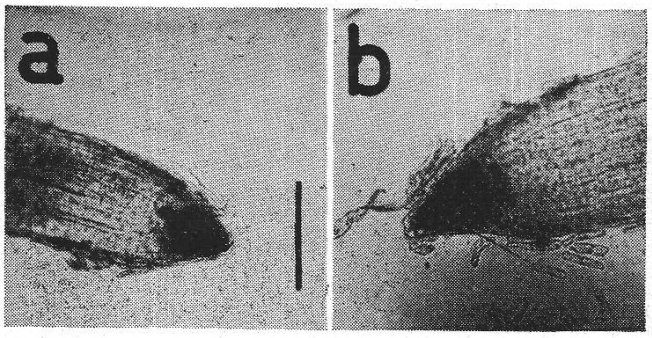

Figure 3

a) Image microscopique d'un méristème radiculaire. Racine âgée de 8 jours (21 °C, 2 % de glucose, lumière diurne)

b) Image microscopique d'un témoin de même âge. Le trait correspond à 0,2 mm

rôle, n'est pas la seule en cause parmi les phénomènes où intervient la lumière.

3. Après deux semaines, lorsque cesse la croissance, l'anthocyane disparaît dans les racines tenues à l'obscurité totale, tandis qu'elle persiste, quoique atténuée, dans les autres.

4. A la lumière du jour, l'intensité de la tache anthocyanique, observée au microscope, est la même chez les racines cultivées isolément et chez celles rattachées à la plantule (fig. 3a et b).

Influence de la concentration de glucose

L'influence de ce facteur a été étudiée en cultivant des racines dans les conditions décrites sur des milieux contenant de 0,5 % à 5,0 % de glucose. La température est constante (21 °C).

A la lumière comme à l'obscurité, nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence sensible tant dans la croissance que dans l'apparition et la localisation de l'anthocyane: le pigment apparaît toujours au même moment et avec la même intensité.

Ces observations sont en accord avec les résultats de Frey-Wyssling et Blank (1943) dans leur étude déjà mentionnée.

Influence de la température

Des cultures sont placées, outre à 21 °C, aux températures constantes de 11 °C et 33 °C. Elles sont maintenues à l'obscurité.

A 11 °C, la croissance est très lente, mais la pigmentation anthocyanique intense. Cependant, en l'absence de mesures quantitatives, nous ne saurions nous prononcer définitivement sur cette observation. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, la pigmentation anthocyanique apparente ne dépend pas seulement de la concentration du pigment, mais aussi de l'état physiologique de la cellule (PH). Ainsi, Frey-Wyssling et Blank (1943) ont déterminé une quantité égale d'anthocyane dans les plantules de chou rouge maintenues à 10 °C et dans celles maintenues à 30 °C alors que les premières présentaient une coloration plus intense.

A 33 °C, un petit nombre de méristèmes seulement (2/10) présentent une croissance normale; chez aucun de ceux-ci l'anthocyane n'apparaît à quelque moment que ce soit.

Pour terminer, nous insistons sur un point qui nous semble digne d'intérêt: la *localisation très précise du pigment*. Celui-ci est en effet localisé au

dermato-calyptrogène (les régions avoisinantes du périblème et du plérome sont toujours incolores). Par contre nous avons pu observer des traces de pigment dans la racine différenciée (au voisinage des vaisseaux), dans la région du collet et même dans l'hypocotyle. Cependant, avec Favarger (1957), nous insistons sur le fait que la région la plus fortement colorée est toujours le méristème de la coiffe. Cette remarque est en accord avec les observations de Frey-Wyssling et Blank (1943) qui observent également une localisation très précise du pigment sur la plantule du chou rouge, à savoir dans les cotylédons. Il est intéressant de remarquer que cette répartition est en quelque sorte complémentaire de celle que nous observons.

Conclusions

Le problème de la biosynthèse du pigment n'est évidemment pas résolu. Certains auteurs dont Keeble et Armstrong (1912, 1913), cités par Frey-Wyssling et Blank (1943), ont émis l'hypothèse que les pigments anthocyaniques étaient formés par oxydation de leur précurseur direct. Nos tentatives de faire apparaître la pigmentation caractéristique par action d'un oxydant (eau oxygénée) ont donné des résultats négatifs. Cependant, de tels tests ne permettent pas de fournir un diagnostic définitif en cas de réponse négative, pour des raisons de toxicité particulièrement (si les cellules sont tuées, leur membrane devient perméable et l'éventuel pigment formé se dissout dans le milieu environnant). Des essais avec un réducteur (acide ascorbique) ont également donné des résultats négatifs.

La signification physiologique du pigment n'est pas connue non plus. Constitue-t-il une substance de déchet, résultant par exemple de la désamination des acides aminés aromatiques comme le suggère Mrs. Onslow, citée par Blank (1947) ? La question se pose en tout cas de savoir à quel titre l'anthocyane accompagne la croissance du méristème et la division de ses cellules.

Notre travail permet cependant de préciser ou de confirmer les points suivants:

a) Les précurseurs de l'anthocyane et les systèmes enzymatiques nécessaires à sa formation sont présents dans la radicule de l'embryon de *Chrysanthemum Leucanthemum*. L'embryon est différencié biochimiquement à un stade précoce.

b) Au niveau du méristème, le pigment est localisé histologiquement au dermato-calyptrogène.

c) La production d'anthocyane est en relation étroite avec l'intégrité et la croissance du méristème.

d) La racine est autonome quant à la synthèse de l'anthocyane.

Résumé

La culture *in vitro* de méristèmes radiculaires, isolés avant germination de la plantule de *Chrysanthemum Leucanthemum* L., a été réalisée. Elle a permis d'aborder le problème de la différenciation biochimique de l'embryon et de déterminer, dans un cas précis de synthèse, l'autonomie physiologique de la racine.

Les relations entre l'apparition du pigment anthocyanique dans le dermato-calyptrogène et la croissance du méristème radiculaire ont été précisées.

L'influence de divers facteurs sur l'apparition et le maintien de la pigmentation étudiée a été examinée.

Zusammenfassung

Anhand von Gewebekulturen vor der Keimung isolierter Wurzeln von *Chrysanthemum Leucanthemum* L. wurde die Anthocyanbildung im Meristem der Wurzelhaube (Dermatokalyptrogen) untersucht. Der Keimling ist schon in einem äusserst frühen Stadium biochemisch differenziert, und die Wurzel ist in bezug auf die Anthocyansynthese selbständig. Die Wachstumskurve der isolierten Wurzeln verläuft S-förmig; zwischen dem Wachstum der Wurzelspitze und der Anthocyanbildung besteht ein enger Zusammenhang. Unter den hier untersuchten Aussenfaktoren (Licht, Temperatur, Zuckergehalt des Substrates) ist das Licht von besonderer Bedeutung; es besteht zweifellos ein Zusammenhang zwischen der Anthocyanbildung und dem Ablauf photochemischer Reaktionen, die mit denjenigen der Photosynthese nicht identisch sind.

Bibliographie

Blank F. 1947. The Anthocyanin Pigments of Plants. Bot. Review **13**, 241–317.

Favarger C. 1957. Sur deux critères nouveaux utilisables dans la taxinomie des Saxifragacées. Revue de Cytologie et de Biologie végétales, tome XVIII, fasc. II.

— 1962. Nouvelles recherches cytologiques sur les Mélastomatacées. Bull. Soc. bot. suisse **72**, 290–305.

Frey-Wyssling A., Blank F. 1943. Untersuchungen über die Physiologie des Anthocyans in Keimlingen von *Brassica oleracea* L. var *capitata* L. f. *rubra* L. Berichte der Schw. Bot. Ges. **53** A, 550–578.

Gautheret R.J. 1937. Remarques sur la stérilisation des graines par l'hypochlorite de calcium. CR. Soc. Biol., tome CXXVI, 408.

— 1945. La culture des tissus. Gallimard, Paris.

Mothes K. 1953. Über Wurzel-Spross-Beziehungen. Die Kulturpflanze **1**, 157–169.

Weber H. 1954. Über Anthocyanfärbung von Wurzeln. Die Pharmacie **9**, Heft 3, 256–258.