

Culture de protonémas de *Polytrichum* en milieu liquide

Autor(en): **Naef, Jaques / Misset, Marie-Thérèse**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **83 (1973)**

Heft 3

PDF erstellt am: **03.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-58449>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Culture de protonémas de *Polytrichum* en milieu liquide

par Jaques Naef et Marie-Thérèse Misset

Département de Biologie végétale,
Université de Genève

Manuscrit reçu le 6 juillet 1973

On sait que les protonémas de mousses sont sensibles à l'action des cytokinines au point d'être utilisés dans des tests de croissance. En effet, *Funaria hygrometrica* est l'espèce la plus sensible, et elle peut répondre en moins de 24 heures à l'action d'une cytokinine ajoutée au milieu de culture en produisant de nombreux bourgeons gamétophytiques.

A la suite des travaux de Gorton et al. (1957); Kofler (1959); Mitra et Allsopp (1959); Bopp (1962), Sweykowska (1962) a étudié l'effet de la kinétine sur les protonémas de *Funaria hygrometrica*. La stimulation de la formation de bourgeons n'est pas le fait de la seule kinétine. Bopp et al. (1967) ont trouvé qu'il existe une relation entre la kinétine et le nombre de bourgeons formés. Certains auteurs dont Gorton et Eakin (1957) ont essayé plusieurs dérivés de la purine N-6 substituée sur *Tortella caespitosa* et ont trouvé que ces substances sont actives sans toutefois montrer qu'il existe une relation quantitative. Hahn et Bopp (1968) puis Sweykowska (1970) ont mis au point un test cytokinine basé sur l'induction de bourgeons néoformés par les protonémas de *Funaria*. Gorton et al. (1957) ont montré que la diphenylurée était sans effet dans leurs conditions expérimentales. Simon (communication personnelle) a obtenu un effet synergique avec le 2iP en utilisant la phenylureidopurine dans des cultures de *Funaria*.

Parmi les mousses assez répandues dans nos régions, *Polytrichum* n'a pas fait l'objet d'études sur la culture in vitro en milieu liquide des spores, sur le bourgeonnement des protonémas et leur stimulation sous l'effet des cytokinines. Il nous semblait que la taille des sporanges et la relative abondance de ce genre dans certains biotopes devraient permettre de réaliser assez facilement des cultures en milieu liquide.

Matériel et méthodes

Des capsules de *Polytrichum formosum* Hedw. ont été récoltées à la fin de l'été et maintenues au sec et à l'obscurité pendant 4 mois avant la mise en culture des spores. Les spores sont libérées aseptiquement des sporanges après la stérilisation de ces derniers selon le procédé de Sweykowska (1965), puis recueillies sur un fil de platine et transférées dans le récipient où l'on réalise la préculture.

Les subcultures expérimentales sont réalisées dans des erlenmeyers d'un litre contenant 500 ml de milieu.

Les cultures sont réalisées dans le milieu liquide de Kofler (1959) en chambre climatisée à 22° C. L'éclairage est fourni par les tubes lumineux Philips TL 40 no 55 pendant 14 heures, suivi d'une période d'obscurité de 10 heures. On mesure 2300 lux à 20 cm.

Tous les flacons sont munis d'un tube d'aération relié à une pompe qui permet simultanément de réaliser une bonne oxygénation et de mettre constamment les protonémas en suspension afin d'éviter qu'ils s'agglomèrent ou adhèrent au verre.

Abréviation: 2iP = N6-(Δ^2 -isopentenyl)adénine.

Légendes de la planche

Protonémas de *Polytrichum* cultivés en milieu liquide.

Fig. 1:

28 jours. Témoin. Agrandissement: x 145. Remarquer l'absence de bourgeons.

Fig. 2:

28 jours dont 18 dans 2iP 0,05 μ M. Agrandissement: x 145. Remarquer la présence de ramifications courtes.

Fig. 3:

28 jours dont 18 dans 2iP 0,5 μ M. Agrandissement: x 145.
Remarquer deux bourgeons en formation.

Fig. 4:

28 jours dont 18 dans 2iP 5 μ M. Agrandissement: x 145.
Remarquer la formation des feuilles.

Fig. 5:

28 jours. Témoin. Agrandissement: x 50.

Fig. 6:

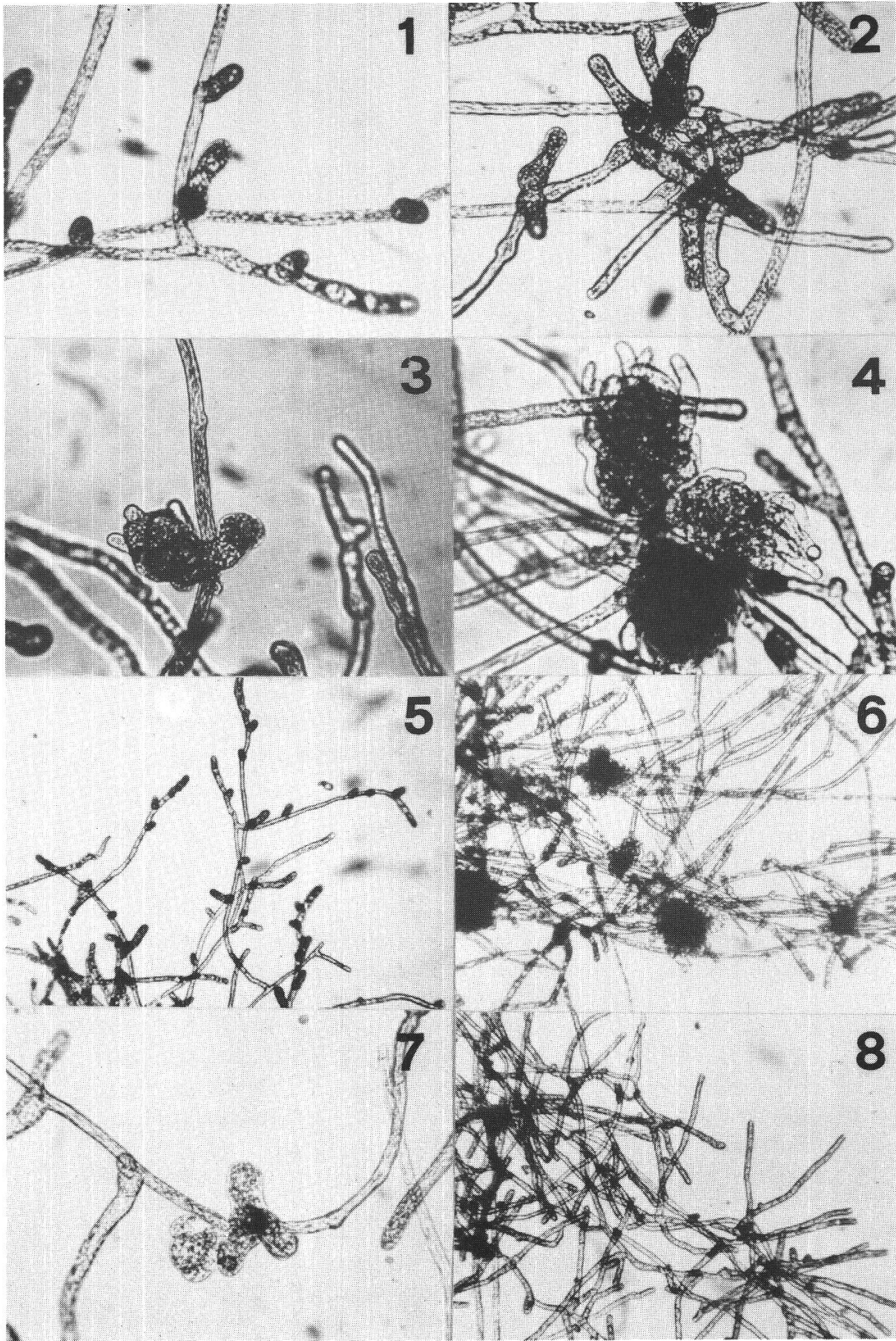
28 jours dont 18 dans 2iP μ M. Agrandissement: x 50.
Remarquer la présence de plusieurs bourgeons bien formés.

Fig. 7:

21 jours dont 11 dans 2iP 5 μ M. Agrandissement: x 145.
Remarquer les stades initiaux de la formation des bourgeons.

Fig. 8:

21 jours dont 11 dans du glucose 0,5%. Agrandissement: x 50.
Remarquer la croissance homogène sans bourgeons.



Résultats:

a) Culture en milieu minéral

Les spores de *Polytrichum* germent tout à fait normalement dans les conditions expérimentales décrites. Toutefois le temps de germination est plus long que celui qui est nécessaire pour *Funaria*. La spore germe le plus souvent en formant deux tubes de germination opposés, ce qui est rarement le cas chez *Funaria*.

Les protonémas formés dès le 13^{ème} jour après la mise en culture présentent des cellules de dimensions très variables et la ramification qui est très régulière chez *Funaria* paraît être assez désordonnée chez *Polytrichum*.

Il arrive fréquemment que dans la même culture on trouve un grand nombre de cellules globuleuses. Ces cellules sont visibles chez *Funaria* seulement après un temps de culture assez long et lorsque le pH du milieu s'est abaissé de 6,5 environ à 4, c'est à dire dans des conditions assez défavorables qui causent d'ailleurs un brunissement des cellules. Toutefois, chez *Polytrichum* les cellules restent normalement vertes et le pH ne s'est pas abaissé fortement, car nos expériences n'ont pas dépassé 34 jours de culture.

Le nombre de protonémas formés est moins élevé chez *Polytrichum* que chez *Funaria* et il est assez irrégulier. Cela peut provenir du nombre de spores qui germent.

Dans nos conditions nous n'avons pas observé la formation spontanée de bourgeons. (fig. 1 et 5)

Après 20 jours de culture, on observe assez fréquemment une prolifération de cellules rayonnant à partir d'un centre dans plusieurs directions opposées avec des ramifications courtes, ce que nous n'observons pas dans nos cultures de *Funaria*.

b) Effet du glucose

Le glucose favorise la croissance des protonémas de *Funaria* (Sweykowska, 1962). Comme la masse de protonémas formés dans nos cultures paraissait assez faible, nous avons alors cultivé les spores dans un milieu additionné de glucose à raison de 0,25%; 0,5%, 1%.

Les spores ont été tout d'abord précultivées en milieu minéral pendant 10 jours puis transférées pendant 14 jours dans un milieu frais glucosé. Cela a pour effet d'accroître considérablement la masse des protonémas formés dans les conditions les plus favorables. La concentration la plus efficace est 0,5%. On obtient ainsi 0,710 mg de tissus frais par ml, c'est à dire environ 10 fois plus que dans la culture témoin. A la concentration de 0,25% de glucose on obtient 3 fois plus de matière fraîche que dans la culture témoin soit 0,213 mg par ml, et à la concentration de 1% on obtient une légère augmentation du poids de matière fraîche qui n'est pas significative.

Si le glucose favorise la croissance des protonémas il ne modifie pas la structure de ces derniers et n'en change pas la morphogenèse. (fig. 8)

c) Effet du 2iP

Le 2iP a été ajouté au milieu de culture à raison de 0,05; 0,5; 5 μM . Sur des protonémas âgés de 34 jours le 2iP a manifesté son effet en stimulant la formation de bourgeons 72 heures après leur transfert dans le nouveau milieu. Il s'agit dans ce cas d'un stade de développement bien différencié et non pas du premier qui est difficile à reconnaître avec certitude. Ce temps est environ trois fois plus long que celui requis par les protonémas de *Funaria*. Il y a eu un nombre peu élevé de bourgeons formés et nous avons renoncé à faire une estimation quantitative car elle était aléatoire. De plus, nous n'avons pas constaté une très nette différence en fonction des doses fournies, ce qui semble indiquer en complément que ces protonémas sont assez peu sensibles.

Dans une autre expérience, les protonémas ont tout d'abord été précultivés pendant 10 jours en milieu minéral simple, puis transférés dans un milieu additionné de 2iP. Nous avons pu constater que la période d'induction est assez tardive et qu'elle ne se situe pas avant le 21^{ème} jour de culture (10 jours de préculture + 11 jours 2iP) (fig. 7). Au 28^{ème} jour, des bourgeons ont été nettement formés sous l'effet des deux plus fortes concentrations de 2iP (fig. 3 et 4). La plupart des bourgeons formés sous l'effet de 5 μM de 2iP ne sont pas normaux. Ils se présentent comme de petites masses pluricellulaires entourées de filaments très courts que l'on peut considérer comme des pseudofeuilles. Par contre d'autres présentent une structure normale. Ils sont tous plus gros et plus nombreux que ceux que l'on obtient avec une concentration 10 fois plus faible de 2iP.

Discussion

La mousse du genre *Polytrichum* semble être un matériel favorable à l'étude du développement. Un certain nombre d'autres espèces ont été utilisées dans ce sens par Gorton et al. (1957); Kofler (1959); Sweykowska (1962); Bopp et Brandes (1964); Nebel et Naylor (1968).

L'initiation de la formation de bourgeons dépend beaucoup des conditions expérimentales (Nebel et Naylor, 1968), de sorte que les résultats que nous avons obtenus jusqu'à maintenant sont susceptibles d'être modifiés par la suite. Il faut aussi noter, comme l'a justement démontré Sweykowska (1968), que les caulonemas typiques à partir desquels se forment normalement les bourgeons (Brandes et Kende, 1968) apparaissent rarement ou irrégulièrement en milieu liquide. Cela peut donc influencer le type de réponse morphogénétique recherché.

Dans certaines de nos expériences la masse totale des protonémas n'a pas donné des valeurs toujours comparables. A la suite des travaux de Larpent-Gouraud (1968) nous pensons que des différences dans le nombre de spores peut en être l'origine.

Sweykowska (1968) a montré que la kinétine permet d'accélérer l'apparition des bourgeons. L'importance du rôle joué par le 2iP et de composés voisins a été mentionnée par Sweykowska (1969), Skoog et Armstrong (1970), Berthier (1970) et Naef (1972). Nous avons pu mettre en évidence la réponse des protonémas de *Polytrichum* au 2iP qui se traduit par la formation de bourgeons après une période d'induction particulièrement longue. La sensibilité est environ 10 fois plus faible que celle que l'on note chez *Funaria*. (Sweykowska, 1969; Simon, 1970). Il nous paraît intéressant de relever que nous obtenons des bourgeons sous l'effet du 2iP alors que nous n'en avons pas obtenu dans la culture témoin. On peut se demander dans ce cas si le „facteur H“ défini par Bopp et Klein (1963) est synthétisé par les protonémas de *Polytrichum* placés dans nos conditions de culture.

Il nous semble important de noter aussi la présence simultanée de bourgeons normaux et de bourgeons formant ultérieurement des masses cellulaires ressemblant à des cals. En effet, Spiess et al (1971) ont obtenu de telles masses lorsque les protonémas étaient cultivés en présence de fortes concentrations de kinétine. Nous avons remarqué enfin qu'un séjour prolongé des protonémas dans le milieu contenant la cytokinine ne change pas le temps de latence nécessaire à l'induction des bourgeons et qu'après un certain temps (34 jours au moins), les protonémas répondent à des doses de cytokinine sans présenter un rapport étroit avec la concentration de cette substance.

L'effet du glucose sur le poids de matière fraîche formée nous a incité à comparer nos premiers résultats avec ceux que l'on peut obtenir en ajoutant simultanément du glucose et de 2iP au milieu de culture. Des expériences actuellement en cours nous permettront d'améliorer le rendement de la culture des protonémas et de préciser les effets du 2iP sur le développement des bourgeons.

Résumé

Le développement des spores de *Polytrichum formosum* cultivées en milieu liquide est étudié et comparé à celui que l'on observe chez *Funaria*. L'influence du glucose sur la croissance des protonémas est recherchée et l'effet d'une cytokinine (2iP) sur la formation des bourgeons est démontrée.

Zusammenfassung

Die Entwicklung der in Nährlösung gezüchteten Sporen von *Polytrichum formosum* wird mit derjenigen von *Funaria* verglichen. Es wird der Einfluss von Glukose auf das Wachstum der Protonemata untersucht und die Wirkung eines Cytokinins (2iP) auf die Knospenbildung nachgewiesen.

Summary

The development of *Polytrichum formosum* spores cultured in liquid medium is compared to that observed in *Funaria* cultures. The influence of glucose on protonematal growth is examined and the budding response to a cytokinin (2iP) is demonstrated.

Nous exprimons notre gratitude au Prof. Folke Skoog (Université de Wisconsin) pour le 2iP qu'il nous a remis et au Dr. Ch.-Ed. Bonner (Conservatoire botanique, Genève) pour la détermination de la mousse.

Bibliographie

- Berthier J. 1970. Organogenèse foliaire et axillaire de l'*Aulacomnium palustre*. Régularisation de la caulogenèse par la photosynthèse et l'action locale des substances du type kinine. C.R. Acad. Sc. Paris 270, 2174.
- Bopp M. 1961. Morphogenese der Laubmoose. Biol. Rev. 36, 237.
- 1968. Control of differentiation in Fern-allies and Bryophytes. Ann. Rev. Pl. Physiol. 19, 361–380.
- et H. Brandes. 1964. Versuche zur Analyse der Protonemaentwicklung der Laubmoose. II. Rev. Bryol. Lichen, 33, 219–233.
- et H. Kende. 1968. Studies on cytokinin-controlled bud formation in moss protonema. Plant physiol. 43, 827–837.
- Brandes H. et B. Klein. 1963. Versuche zur Analyse der Protonemaentwicklung der Laubmoose. I. Port. Acta Biol. (sér. A) 7, 95–110.
- Gorton B.S. et al. 1957. Activity of some 6-substitued purines on the development of the *Tortella caespitosa*. Arch. Biochem. Physiol. 66, 493–496.
- Hahn H. et Bopp M. 1968. A cytokinin test with high specificity. Planta 83, 115–118.
- Kofler L. 1959. Contribution à l'étude biologique des mousses cultivées in vitro. Rev. Bryol. Lichen, 28, (1&2) 1–202.
- Larpent-Gouraud M. 1968. Importance de l'inoculum (nombre de spores) et croissance du protonéma de *Ceratodon purpureus*. C.R. Acad. Sc. Paris, 267, 66–69.
- Mitra G.C. et Allsopp A. 1969. The effects of various physiologically active substances on the development of the protonema and bud formation in *Pohlia nutans*. Phytomorphology 9, 55–63.
- Naef J. 1972. Néoformation de bourgeons par une souche de tissu médullaire de tabac cultivée en présence de cytokinine. Saussurea 3, 111–117.
- Nebel J.B. et Naylor A.W. 1968. Initiation and development of shoot-buds from protonemata in the moss *Physcomitrium turbinatum*. Amer. J. Bot. 55 (1), 33–37.
- Simon H. 1971. MS thesis. University of Wisconsin.
- Skoog F. et D. Armstrong. 1970. Cytokinin. Ann. Rev. Pl. Physiol. 21, 359–384.
- Spiess L. et al. 1971. Development and gametophore initiation in the moss *Pylaisiella Sewynii* as influenced by *Agrobacterium tumefaciens*. Amer. J. Bot. 58 (8), 726–731.
- Sweykowska A. 1962. The effect of kinetin and IAA on shoot development in *Funaria hygrometrica* and *Ceratodon purpureus*. Acta Soc. Bot. Polon. 31, 553–557.
- et al. 1968. Studies on the activity of kinetin in cultures of *Funaria hygrometrica*. I. Acta Soc. Bot. Polon. 37, 145–155.
- et al. 1969. Studies on the specificity and sensitivity of bud-induction response to cytokinins in the protonema of *Funaria hygrometrica*. Acta Soc. Bot. Polon. 38, 139–142.
- et al. 1970. A cytokinin bioassay based on bud induction in the protonema of *Funaria hygrometrica*. Zesz. Nauk. Uniwers. Mikolaja Kopernica W. Toruniu. Zeszyt 13, 289–292.

Jaques Naef
Département de Biologie végétale
Université de Genève
1211 Genève 4