

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — Inhibition et stimulation, en culture *in vitro*, de l'embryogenèse des souches issues d'explants foliaires de Palmier à Huile. Note de Janina Hanower et Paul Hanower⁽¹⁾, présentée par Roger Gautheret.

Remise le 7 novembre 1983, acceptée le 21 novembre 1983.

Les cultures à croissance rapide (CCR) issues de fragments foliaires présentent une grande variabilité dans leur aptitude à l'embryogenèse somatique. La présence d'un inhibiteur endogène d'embryogenèse a été mise en évidence chez les CCR pas ou peu organogènes. L'apport dans le milieu des anti-auxines (OCPIB et AZI) stimule l'embryogenèse. La totipotence se généralise à l'ensemble de la souche après repiquage. Un antagoniste des cytokinines (AG) l'inhibe. Une forte activation est observée en présence d'un flavonoïde (PZ) et de son dérivé (PG). Le mode possible d'action de ces divers facteurs est discuté.

PLANT PHYSIOLOGY. — Embryogenesis Inhibition and Stimulation in Oil Palm Callus Derived from Leaf Explants.

"Fast growing" cultures (FGC) obtained from leaf fragments display a wide variability in their capability for somatic embryogenesis. The existence of an endogenous inhibitor seemed apparent in cultures incapable or only slightly capable of regeneration. The addition of anti-auxins (OCPIB and AZI) stimulates embryogenesis. Totipotency of the cells becomes generalized during the subculture. A cytokinin antagonist (AG) inhibits the embryogenesis. An important activation was observed with the addition of the flavonoid (PZ) and a related compound (PG). All these various factors are discussed.

Au cours de notre travail, qui entre dans le cadre des études sur la multiplication végétative *in vitro* du Palmier à Huile par embryogenèse somatique [(1) à (3)], nous avons obtenu, entre 1979 et 1981, une centaine de cultures à croissance rapide (CCR) issues des explants foliaires de 18 clones. Près de la moitié d'entre elles ont été soumises au traitement embryogène et de grandes différences dans l'expression de leur pouvoir organogène ont pu être constatées. A côté des CCR très organogènes depuis déjà 5 ans, il existe des souches modérément ou peu, voire pas organogènes. Ce classement est basé sur la précocité, la fréquence et l'abondance de l'embryogenèse dans nos conditions expérimentales. La raison de cette diversité de réponses est certainement multiple : génétique, physiologique, biochimique. Nous avons essayé d'aborder ce problème par : (a) l'étude d'une hypothèse de l'existence dans la souche d'un inhibiteur de l'embryogenèse; (b) en mettant en cause l'équilibre auxines/cytokinines endogène; (c) en recherchant des facteurs capables de favoriser l'expression du pouvoir embryogène.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES. — La multiplication végétative du Palmier à Huile *in vitro*, procédé réalisé pour la première fois par Martin et Rabechault [1] et sensiblement amélioré, au cours de ces dernières années, par une équipe ORSTOM-IRHO ([2], [3]), passe par la culture des tissus indifférenciés. Les explants de très jeunes feuilles cultivées sur milieux de Murashige et Skoog [4] modifiés, additionnés d'auxines (2,4-D ou (et) TCPP 0,2 à 2 mg/l) produisent des cals primaires dont la croissance et les capacités organogènes sont plutôt faibles. Maintenus sur milieux contenant des auxines (2,4-D, TCPP, ANA 0,5 à 2 mg/l), ces cals donnent naissance, après un nombre variable de subcultures, aux cals secondaires (CCR) se caractérisant par un taux de multiplication élevé. Le temps de doublement de la matière fraîche est de 10 à 20 jours. Soumis au traitement organogène (ANA 1 à 2 mg/l et BAP 1 à 3 mg/l) les CCR produisent des embryons somatiques.

CCR utilisées : 2 CCR issues du matériel non sélectionné provenant de la collection de Martin et Rabechault datant de 1977 (77-09 et 77-15A) et 13 CCR obtenues entre 1979 et 1981, représentant six clones L2T × D10D (I, VI, XII, XIII, XV et XX) et un clone D × P (65).

(a) Mise en évidence d'un inhibiteur d'embryogenèse. Les CCR classées très, modérément, peu ou pas organogènes ont été placées sur les mêmes milieux embryogènes gélosés, soit côte à côte dans les mêmes flacons, soit séparément et le développement de l'embryogenèse a été suivi journalièrement.

(b) L'action d'une anti-auxine, l'acide 2-o-chlorophénoxyisobutyrique (OCPIB), d'un antagoniste de synthèse des auxines, le 7-aza-indol (AZI) et d'un antagoniste des cytokinines, la 8-aza-guanine (AG) a été éprouvée en les incorporant dans le milieu embryogène à concentration, respectivement, de 10^{-6} M, 10^{-5} M et $7 \cdot 10^{-6}$ M.

(c) L'effet sur l'embryogenèse de la phloridzine (PZ) et du phloroglucinol (PG) à concentration de 10^{-3} M a été étudié.

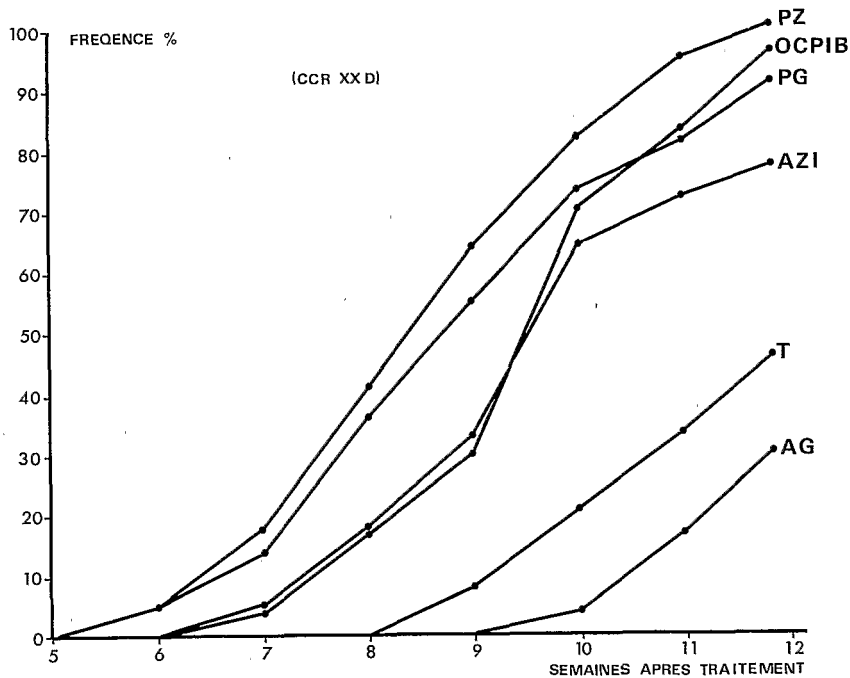
RÉSULTATS. — (a) *Présence d'un inhibiteur.* — Dans les trois séries d'essais, l'embryogenèse des CCR très organogènes a été totalement inhibée par la proximité des souches non embryogènes et partiellement inhibée par la proximité des CCR peu embryogènes.

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 16156, ex 1

Cote : B

10 DEC. 1984



Action des divers facteurs exogènes sur l'expression de l'embryogenèse.

The effect of various exogenous factors on embryogenesis

Cette inhibition partielle se traduisait par une moindre fréquence de l'embryogenèse (20% à 30% au lieu de 90 à 100%), un retard de 4 à 7 semaines dans l'apparition des embryoïdes (délais habituel pour les CCR très organogènes se situant entre la 4^e et 5^e semaine de culture sur un milieu organogène) et un nombre réduit d'embryoïdes par flacon (1 ou 2 au lieu de 10 ou plus). Tout se passait comme si un inhibiteur relâché par les CCR pas ou peu organogènes diffusait à travers le milieu gélosé vers les CCR très organogènes et entravait l'embryogenèse de ces dernières.

(b) *Action des anti-hormones : anti-auxines et anti-cytokinines.* — Leur effet a été éprouvé sur une CCR modérément organogène, issue du clone XX. Comme le montre la figure, une stimulation d'embryogenèse a été observée en présence, dans le milieu, de l'AZI 10^{-5} M, un inhibiteur de la synthèse auxinique ([5], [6]). Une autre anti-auxine, l'OCPIB 10^{-6} M, un analogue chimique des auxines [7], a également favorisé le processus. Le maximum de leur action s'est situé entre la 9^e et 10^e semaine du traitement. Après repiquage, la totipotence s'est généralisée à l'ensemble de la colonie tissulaire. On peut supposer que ces substances ont agi en abaissant le niveau des auxines endogènes dans les cultures.

Ces résultats sont en accord avec ceux des auteurs qui ont observé un effet stimulateur des anti-auxines sur l'embryogenèse des cultures de tissu de Carotte [8], des cals anergisés

TABLEAU

Nombre moyen d'embryoïdes par tube de culture à la 12^e semaine du traitement
(CCR XXD, 24 tubes/traitement).

Average number of embryoïds per culture tube during the 12th week of treatment.

Traitement	Témoin	OCPB	AZI	AG	PZ	PG
Ensemble d'embryoïdes à divers stades de leur développement ^(a)	11	19	18	5	56	47
Embryoïdes blancs, bien développés polarisés ^(a)	6	8	10	2	24	21
Embryoïdes verts et pousses bons à isoler	0,5	1	3	-	14	12

^(a) Ces chiffres représentent les valeurs moyennes minimales, le comptage de la totalité d'embryoïdes au sein de cultures étant malaisé.

de *Citrus sinensis* [5] et des cultures d'anthers de *Nicotiana tabacum* [6]. Ils sont en opposition avec les résultats de Fujimura et Komamine qui signalent une action inhibitrice d'une anti-auxine sur l'embryogenèse somatique des cultures de suspensions cellulaires de Carotte [9].

L'addition au milieu de l'AG $7 \cdot 10^{-6}$ M a exercé un effet opposé en retardant l'embryogenèse et en diminuant sa fréquence. Cet effet inhibiteur pourrait être lié à son action antagoniste vis-à-vis des cytokinines ([5], [10]) s'exerçant au niveau du métabolisme des acides nucléiques [11]. Kochba et Spiegel-Roy [5] signalent un effet contraire de l'AG.

Ainsi, l'équilibre auxines/cytokinines dans le tissu apparaît comme facteur clé dans le processus embryogène.

(c) *Action de certains composés phénoliques.* — L'embryogenèse de la CCR XXD a été fortement stimulée par l'adjonction au milieu de la PZ 10^{-3} M. Cette stimulation a été caractérisée non seulement par un déclenchement du processus avec 3 semaines d'avance sur le témoin et une fréquence de 100% (*fig.*), jamais encore obtenue avec ce matériel modérément organogène, mais elle a revêtu un caractère massif par le nombre d'embryoïdes néoformés (tableau). La polarisation des embryoïdes, leur verdissement et leur développement ont été beaucoup plus rapides que sur les autres variantes (premières pousses feuillées un mois environ après le début de l'embryogenèse).

Le PG 10^{-3} M a agit dans le même sens en stimulant l'embryogenèse quoique à un degré moindre.

Des résultats analogues ont été obtenus dans un autre essai réalisé sur le même matériel. L'effet stimulant de la PZ sur l'embryogenèse a pu être également confirmé sur d'autres CCR, peu organogènes.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS. — La grande variabilité des réponses des CCR au même traitement organogène qui a suscité leur classement en CCR fortement, modérément, peu ou pas organogènes n'est pas liée uniquement à leur origine génétique et à l'âge des arbres-mères. Elle a été observée chez les CCR de la même lignée (divers arbres L2T × D10D) et, qui plus est, chez les CCR provenant d'un même arbre mais issues des cals primaires, voire explants foliaires, différents (rang et âge de la feuille, niveau du prélèvement par rapport à l'apex, position du fragment sur la feuille). Cette variabilité serait donc fonction de l'état physiologique du tissu et de sa composition en molécules actives (hormones, systèmes enzymatiques, inhibiteurs et effecteurs divers) impliquées dans différents cycles métaboliques. Autrement dit, la précocité et l'importance de l'embryogenèse dépendraient, dans une grande mesure, du contenu endogène du matériel traité, facteur trop souvent négligé.

Nous avons montré que les CCR non organogènes contiennent un inhibiteur puissant d'embryogenèse capable, en diffusant à travers le milieu, d'empêcher l'expression du pouvoir embryogène d'une autre CCR habituellement fortement organogène.

D'autre part, l'embryogenèse est conditionnée par un équilibre auxines/cytokinines à l'intérieur de la cellule. La suppression de tout apport d'auxines exogènes est généralement recommandée pour déclencher le processus. Dans certains cas, dont celui du Palmier à Huile, un apport des régulateurs exogènes est indispensable. Cet apport doit être modulé en qualité et en quantité en fonction du niveau endogène de la CCR considérée. Si le niveau des régulateurs endogènes est suroptimal, on peut le modifier en faisant appel aux substances antagonistes des auxines et des cytokinines. C'est, en général, le cas d'auxines. Dans nos essais un inhibiteur de synthèse auxinique, AZI, et un analogue structural d'auxines, OCPIB, ont tous les deux stimulé l'embryogenèse d'une CCR modérément organogène. Ceci semble indiquer que le niveau trop élevé de certaines auxines endogènes est un des facteurs limitant l'embryogenèse à partir de CCR.

Un autre groupe de substances pouvant agir sur l'embryogenèse sont les composés phénoliques, substances très hétérogènes par leur structure et fonction. D'où la diversité de leur action biologique, inhibitrice ou stimulatrice des divers processus vitaux ([12] à [15]). Ils peuvent ainsi moduler la croissance et l'organogenèse [16]. C'est le cas de la PZ, flavonoïde naturel du Pommier et de son dérivé, le PG, qui jouent un rôle positif dans la rhizogenèse et aussi dans le développement des bourgeons axillaires chez le Pommier et le genre *Prunus* ([16] à [19]). Les deux ont fortement stimulé l'embryogenèse des CCR.

En conclusion, le choix et l'efficacité des facteurs exogènes nécessaires à l'expression des capacités embryogènes est en relation étroite avec le contenu cellulaire. Sans connaissance des facteurs endogènes, de leur rapport avec l'état physiologique et biochimique du matériel étudié et son histoire biologique, de véritables progrès dans ce domaine ne pourront pas être accomplis.

(¹) Assistance technique de Geneviève Cas, Pierre Trouslot, Christian Varechon et Laurence Zuckerman.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] H. RABECHAULT et J. P. MARTIN, *Comptes rendus*, 283, série D, 1976, p. 1735.
- [2] J. AHEE, P. ARTHUIS, G. CAS, Y. DUVAL, G. GUENIN, J. HANOWER, P. HANOWER, D. LIEVOUX, C. LIORET, B. MALAURIE, C. PANNETIER, D. RAILLOT, C. VARECHON et L. ZUCKERMAN, *Oléagineux*, 36, n° 3, 1981, p. 113.
- [3] C. PANNETIER, P. ARTHUIS et D. LIEVOUX, *Oléagineux*, 36, n° 3, 1981, p. 119.
- [4] T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plant.*, 15, 1962, p. 473.
- [5] J. KOCHBA et P. SPIEGEL-ROY, *Z. Pflanzenphysiol.*, 81, 1977, p. 283.
- [6] H. J. DOLLMANTEL et J. REINERT, *Protoplasma*, 103, 1980, p. 115.
- [7] N. CHANDRA, T. H. LAM et H. E. STREET, *Z. Pflanzenphysiol.*, 86, 1978, p. 55.
- [8] W. NEWCOMB et D. F. WETHERELL, *Bot. Gaz.*, 131, 1970, p. 242.
- [9] T. FUJIMURA et A. KOMAMINE, *Z. Pflanzenphysiol.*, 95, 1979, p. 13.
- [10] F. MOEWUS, *Science*, 130, 1959, p. 921.
- [11] M. Kh. CHAILAKHYAN, in *Plant Growth Substances*, D. J. CARR éd., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1972, p. 745.
- [12] J. P. NITSCH et C. NITSCH, *Ann. Physiol. vég.*, 4, 1962, p. 211.
- [13] V. I. KEFELI et R. H. TURECKAYA, *Usp. Sovrem. Biol.*, 57, 1963, p. 99.
- [14] J. BRZOWSKA et P. HANOWER, *Ann. Univ. Abidjan*, série C, 12, 1976, p. 65.
- [15] G. FRIBORG, M. PEDERSEN, L. LANDSTRÖM et T. ERIKSSON, *Physiol. Plant.*, 43, 1978, p. 104.
- [16] O. P. JONES, *Nature*, 262, 1976, p. 392.
- [17] O. P. JONES, C. A. PONTIKIS, M. E. HOPEGOOD et E. M. INGLIS, *J. Hort. Sc.*, 54, 1979, p. 155.
- [18] O. P. JONES et M. E. HOPEGOOD, *J. Hort. Sc.*, 54, 1979, p. 163.
- [19] L. CH. MOSELLA, J. J. MACHEIX et R. JONARD, *Physiol. Vég.*, 18, 1980, p. 597.

Laboratoire de Physiologie végétale de l'O.R.S.T.O.M.,
70-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy.