Effets de la cystéine sur la rhizogenèse adventive

Cystein effects on adventitious rhizogenesis

C. MONCOUSIN, G. AUDERSET

Ecole d'ingénieurs agronomes, Haute Ecole Spécialisée de Suisse occidentale (HES)
Route de Presinge, CH - 1254 Jussy (Suisse)
Email : charles.moncousin@etat.ge.ch

Résumé : L'application de cystéine sur des boutures de *Glycine max* et sur des microboutures de *Malus communis* ou de *Daphne odora* montre un effet stimulateur sur la rhizogenèse adventive pour des concentrations allant de 10^{-6} à 10^{-8} M. Les effets possibles de la cystéine sur la physiologie cellulaire sont esquissés.

Mots clés : rhizogenèse adventive, cystéine, *Glycine max*, *Malus communis*, *Daphne odora*

Abstract : *Use of cystein solution during the rooting phase of Glycine max cuttings and Malus communis or Daphne odora microcuttings produces a dramatic increase on the adventitious rhizogenesis concentration between 10^{-6} and 10^{-8} M. Suspected effects of cystein on the cellular physiology are evoked.*

Keywords : *adventitious rhizogenesis, cystein, Glycine max, Malus communis, Daphne odora*

1 Introduction

Un certain nombre de travaux antérieurs ont montré que des substances à fonction sulfhydryle (thiol) étaient susceptibles de stimuler la rhizogenèse, en particulier la rhizogenèse adventive sur microboutures d'espèces diverses en culture *in vitro* (Auderset *et al.*, 1994, 1996).

Parallèlement, une recherche s'est développée sur l'action des substances thiol et sur leur action au niveau de la croissance cellulaire. Ces travaux ont amené à un modèle d'action éventuelle des substances à fonction thiol au niveau d'oxydases membranaires et de leur action sur la croissance, et ceci aussi bien sur des plantes ou fragments de tiges de plantes que sur des membranes isolées (Dehahn, 1997).

A la suite de travaux préliminaires sur le modèle *Glycine max* (L.) Merr., il nous a paru intéressant de continuer des essais sur la rhizogenèse secondaire du soja et sur la rhizogenèse adventive de *Malus domestica* Borkh. et *Daphne odora* Thunb. Le choix de la première plante est justifié, d'une part, par son importance dans le domaine économique, aux USA en particulier, et par le fait que les connaissances sur le comportement et les propriétés physiologiques de cette plante sont actuellement très développées. Le choix des deux autres végétaux ligneux se justifie par le fait qu'il s'agit, pour les *Malus* issus de multiplication végétative accélérée et conforme, de boutures facilement enracinables ce qui est loin d'être le cas pour les boutures produites par culture *in vitro* de *Daphne*. La première série

de travaux, concernant les deux premières substances, testées tout d'abord sur des modèles relativement simples (soja et mungbean), a été appliquée avec succès sur des variétés de *Malus* et *Daphne* (*in vitro*) ainsi que sur *Hedera helix* L. et *Mandevilla sanderi* Hemsl. Ces travaux ont abouti à deux publications (Auderset *et al.*, 1996 et 1997). Les études histologiques préalables de la rhizogenèse ont également fait l'objet d'une publication (Auderset *et al.*, 1988).

La cystéine, (acide-amino-thiolpropionique) : **HS-CH2-CH(NH2)-COOH** est un acide aminé qui présente trois groupements chimiques fonctionnels : carboxylique, amine et thiol. Les caractéristiques acido-basiques de la cystéine sont induites par ces groupes fonctionnels. Nous nous intéresserons seulement à la cystéine qui tient une place particulière au sein des protéines. Par exemple, la terminaison **-SH** permet sa réaction avec une autre cystéine, pour former une liaison **-S-S-** qui constitue donc un pont covalent entre deux régions du polypeptide (cystine). L'utilisation de la cystéine n'a été envisagée que depuis peu de temps et les données expérimentales à son sujet sont rares (Dehahn, 1997). Les explications concernant son mode d'action sont encore hypothétiques à l'heure actuelle ; elles seront évoquées plus loin.

2 Matériel et méthodes

2.1 Matériel biologique

✓ *Glycine max* L.

Le choix du modèle expérimental utilisé dans la majorité des expériences durant ces deux dernières années a porté sur les hypocotyles de soja prélevés 5 jours après la germination des graines (obscurité, 24°C) et découpés 11 cm en dessous de l'insertion des cotylédons. Ils sont mis à tremper, à raison de 12-15 tiges par traitement dans des fioles de verre contenant différentes concentrations de cystéine (de 10^{-3} à 10^{-8} M) ; les témoins sont plongés dans de l'eau distillée stérile.

Dans ce modèle, la difficulté qui apparaît parfois est celle d'une contamination bactérienne portant préjudice aux plantes de certains lots. Ceci nécessite de nombreuses répétitions afin d'éviter les lacunes statistiques. Manifestement, les hypocotyles étiolés sont d'une grande sensibilité aux infections occasionnelles. Pour éviter ceci, nous avons adopté du matériel provenant d'une même source mais exposé durant 48 heures à la lumière blanche (40 µmol/m²/s). Ces plantes, devenues chlorophylliennes, sont beaucoup plus résistantes aux bactéries et les boutures obtenues donnent exactement le même type de réponse rhizogène que le matériel étiolé.

✓ *Malus domestica* Borkh Jork 9 et *Daphne odora* Thunb.'variegata'

Le choix du modèle expérimental utilisé dans la majorité des expériences a porté sur des microboutures issues de subcultures âgées de 6 semaines. Elles sont mises, dès le bouturage, à tremper à raison de 10 à 12 boutures par traitement dans des fioles en verre contenant différentes concentrations de cystéine (de 10^{-3} à 10^{-8} M) ; les témoins sont plongés dans l'eau distillée stérile et pendant les 5 jours qui suivent le bouturage les tiges sont placées à l'obscurité et à 24°C.

2.2 Applications de substances sulfhydryles

✓ Applications sur boutures d'hypocotyles de soja

Pour déterminer les conditions d'utilisation de ces composés, concentrations efficaces et temps d'application, nous avons utilisé le modèle « hypocotyle de soja (*Glycine max*) ». Sur une période de deux ans, près de 100 séries expérimentales ont été pratiquées. En ce qui concerne la cystéine, nous avons procédé de la façon suivante :

Temps d'application en continu durant 14 jours :
La base des hypocotyles est plongée dans 3-5 cm de liquide. Durant nos premières séries expérimentales, nous nous sommes rendus compte que les différentes solutions de cystéine avaient tendance, après 2 à 3 jours, à présenter des floculats. Nous avons décidé, en conséquence, de renouveler toutes les 48 heures ces solutions afin d'éviter la formation éventuelle de cystine.

✓ Applications sur des microboutures de *Malus domestica* et *Daphne odora*

Pour déterminer les conditions d'utilisation de ces composés, concentrations efficaces et temps d'application, nous avons mis en place 60 séries expérimentales. En ce qui concerne l'application de la cystéine, nous avons procédé de la façon suivante :

Temps d'application en continu durant 14 jours :
La base des boutures est plongée dans 0.5 cm de liquide et les solutions sont renouvelées toutes les 48 h.

2.3 Méthodes d'analyse

✓ Statistiques :

Les racines adventives apparues sont comptées 7, 10 et 14 jours après le début du traitement. On tient compte du pourcentage de plantes manifestant une rhizogenèse et du nombre moyen de racines différenciées par plante. Nous avons, dans certains cas, effectué des comptages plus fréquents, dès le 3ème-4ème jour afin d'observer s'il y avait un effet accélérateur de la rhizogenèse selon les concentrations.

✓ Etude morphologique :

Dans le cas des plantes entières (bacs ou champs) les différences de croissance apparues entre les plantes traitées à la cystéine (de l'ordre de 20% en plus) et celles qui ne l'étaient pas, nous ont porté à étudier plus particulièrement le système racinaire, manifestement plus développé chez les plantes traitées par la cystéine ; une étude anatomique et histologique est en cours.

3 Résultats

Nous pouvons constater que la rhizogenèse aussi bien adventive que secondaire est stimulée à certaines concentrations de cystéine et ceci avec un effet "dose". Nous présentons ici quelques résultats encore non complètement exploités, et traitant de la rhizogenèse adventive. Nous avons pu déterminer avec les hypocotyles de soja que pour une concentration de

10^{-2} M : il y avait destruction de la base de l'hypocotyle
10^{-3} M : il y avait inhibition plus ou moins marquée de la rhizogenèse
10^{-4} M : il y avait peu de différence par rapport au témoin
10^{-5} M : il y avait début de stimulation de la rhizogenèse
10^{-6} à 10^{-8} M : il y avait moyenne à forte stimulation de la rhizogenèse

Avec les microboutures de *Malus* et de *Daphne*, nous avons constaté que pour une concentration de

10^{-2} M : il y avait destruction de la base des microboutures
10^{-3} M : il y avait peu de différence par rapport au témoin
10^{-4} M : il y avait début de stimulation de la rhizogenèse
10^{-5} M : il y avait stimulation moyenne de la rhizogenèse
10^{-6} à 10^{-8} M : il y avait forte stimulation de la rhizogenèse

En ce qui concerne la concentration de 10^{-2} M, rapidement abandonnée, et dans une moindre mesure celle de 10^{-3} M, il faut prendre en compte une très forte acidification de la solution (pH 2-3) par la cystéine. Mais quelques essais menés avec de la cystéine à 10^{-3} M solubilisée dans un tampon 0.05 M de phosphate de potassium, ont montré que les effets destructeurs n'étaient pas liés directement au pH des solutions. En ce qui concerne les autres concentrations de cystéine, les pH varient peu ; ils sont compris entre 5.8 et 6.1.

3.1 Pourcentage de boutures présentant une rhizogenèse adventive

Le pourcentage de boutures présentant un début de rhizogenèse ou une rhizogenèse adventive complète a été déterminé après 14 jours. Les résultats pour *Glycine max* sont présentés dans le tableau n°1, ceux relatifs aux *Malus* et *Daphne* respectivement dans les tableaux n°2 et 3.

	Moyenne en %	**Ecart-type**
Eau (Témoin)	65	9.7
Cystéine 10^{-3} M	61	11.0
Cystéine 10^{-4} M	66	3.9
Cystéine 10^{-5} M	73	6.5
Cystéine 10^{-6} M	84	6.2
Cystéine 10^{-7} M	93	5.0
Cystéine 10^{-8} M	80	4.8

Tableau n°1 : Pourcentage de rhizogenèse de Glycine max après 14 jours d'application de cystéine (Moyenne et écart-type entre 3 séries expérimentales)

	Moyenne en %	Ecart-type
Eau (Témoin)	22	4.2
Cystéine 10^{-3} M	24	8.6
Cystéine 10^{-4} M	33	5.2
Cystéine 10^{-5} M	62	5.0
Cystéine 10^{-6} M	75	7.5
Cystéine 10^{-7} M	82	5.4
Cystéine 10^{-8} M	86	7.2

Tableau n°2 : Pourcentage de rhizogenèse de Malus domestica après 14 jours d'application de cystéine (Moyenne et écart-type entre 5 séries expérimentales)

	Moyenne en %	Ecart-type
Eau (Témoin)	6	5.3
Cystéine 10^{-3} M	11	9.3
Cystéine 10^{-4} M	23	5.2
Cystéine 10^{-5} M	36	9.3
Cystéine 10^{-6} M	51	8.5
Cystéine 10^{-7} M	65	6.3
Cystéine 10^{-8} M	57	9.3

Tableau n°3 : Pourcentage de rhizogenèse de Daphne odora après 14 jours d'application de cystéine (Moyenne et écart-type entre 5 séries expérimentales)

3.2 Evolution temporelle de la rhizogenèse

Pour estimer le pouvoir accélérateur de la cystéine sur l'installation de la rhizogenèse, le nombre de boutures présentant des symptômes rhizogènes a été estimé après 7, 10 et 14 jours pour *Glycine max* (cf Tableau n°4) et 7, 10, 14 et 21 jours pour *Malus domestica* et *Daphne odora* (cf Tableaux n°5 et 6).

Nb de jours	7	10	14
Eau (Témoin)	41	58	59
Cystéine 10^{-3} M	0	33	73
Cystéine 10^{-4} M	45	50	70
Cystéine 10^{-5} M	46	50	83
Cystéine 10^{-6} M	77	85	91
Cystéine 10^{-7} M	69	92	93
Cystéine 10^{-8} M	64	64	85

Tableau n°4 : Pourcentage de boutures de Glycine max enracinées au cours des 14 premiers jours

Nb de jours	7	10	14	21
Eau (Témoin)	0	3	5	15
Cystéine 10^{-3} M	0	4	4	7
Cystéine 10^{-4} M	0	9	12	15
Cystéine 10^{-5} M	0	12	49	54
Cystéine 10^{-6} M	0	14	66	73
Cystéine 10^{-7} M	0	10	75	82
Cystéine 10^{-8} M	0	16	80	83

Tableau n°5 : Pourcentage de microboutures enracinées de Malus domestica au cours des 21 premiers jours (Au 7ème jour, les éventuelles racines comptées figurent sous forme de très petites ébauches, de l'ordre du mm)

Nb de jours	7	10	14	21
Eau (Témoin)	0	0	4	6
Cystéine 10^{-3} M	0	0	9	9
Cystéine 10^{-4} M	0	0	10	11
Cystéine 10^{-5} M	0	2	18	22
Cystéine 10^{-6} M	0	5	45	47
Cystéine 10^{-7} M	0	9	50	62
Cystéine 10^{-8} M	0	7	61	64

Tableau n°6 : Pourcentage de microboutures enracinées de Daphne odora au cours des 21 premiers jours (Au 7ème jour, les éventuelles racines comptées figurent sous forme de très petites ébauches, de l'ordre du mm)

De ces données, choisies à titre d'exemple, si l'on prend uniquement le pourcentage de boutures manifestant une rhizogenèse significativement différente des témoins, il ressort que la cystéine, aux doses de 10^{-6} à 10^{-8} M exerce une action stimulatrice. Cet effet se manifeste aussi bien sur le nombre de plantes induites que sur la vitesse d'évolution rhizogène en particulier à 10^{-6} et 10^{-7} M de cystéine pour *Glycine* et de 10^{-6} et 10^{-7} M pour *Malus* et *Daphne*.

3.3 Evolution du nombre de racines par plante

A l'exception des quelques expériences perturbées par des infections, la majorité d'entre elles montre un effet stimulateur de la cystéine sur le nombre de racines adventives apparues sur les boutures des trois espèces travaillées. L'effet semble lié à la dose et manifeste une stimulation significative entre 10^{-5} et 10^{-8} M. Les résultats les plus significatifs ont été obtenus en application constante de cystéine pendant les 6 à 7 premiers jours et au-delà. En dessous de cette durée limite d'application, les données statistiques deviennent non significatives.

4 Discussion - Conclusion

Le mode d'action des substances thiol est encore loin d'être élucidé, en particulier en ce qui concerne la rhizogenèse adventive où cette action a été démontrée. Nous en sommes, pour l'instant, réduits aux hypothèses.

Un certain nombre de publications mentionne une action activatrice et/ou régulatrice de substances thiol au niveau enzymatique. Une voie qui paraît intéressante est celle de l'activation de la glucose-6-phosphate déshydrogénase mentionnée par Kranner et Grill (1994 et 1996) dans le cas de la réhydratation du lichen. Cette enzyme a depuis longtemps été caractérisée comme étant un marqueur de la différenciation chez les végétaux.

D'autres activités enzymatiques thiol-sensibles sont également envisagées, en particulier une NADH-oxydase localisée au niveau du plasmalemme de la cellule végétale par Morré *et al.* (1987) et Morré (1994). Dans ce cas, une intervention de cette enzyme sur la croissance cellulaire a été démontrée : elle est sensible aux auxines et l'application de substances thiol donne une réponse comparable à celles-ci.

Dans le cas de la rhizogenèse adventive, le processus est plus complexe que celui de la croissance cellulaire : il implique tout d'abord une dédifférenciation de cellules potentielles puis une activation de leur cycle cellulaire et enfin l'histogenèse et l'organogenèse racinaires (Auderset *et al.*, 1988). Dans ce cas, l'intervention éventuelle des substances thiol au niveau de la NADH-oxydase membranaire n'est que suggérée à cause du parallélisme de réponse entre l'auxine et la cystéine qui, toutes deux, activent la rhizogenèse adventive. Il serait intéressant de pouvoir poursuivre ces travaux, en particulier dans la voie histochimique enzymatique afin d'essayer de détecter quelles sont les enzymes associées à la rhizogenèse et qui sont sensibles aux substances thiol.

Bibliographie

Auderset G., Gavillet S., Micheli J., O'Rourke J., Ribaux M., Moncousin C., 1994, Histological analysis and the evolution of biochemical markers during the *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. Jork 9, *Adv. Hort. Sci*., 8, 5-10

Auderset G., Moncousin C., O'Rourke J., Morré J., 1996, Stimulation of root formation by thiol compounds, *HortScience*, 31 (2), 140-242

Auderset G., Moncousin C., O'Rourke J., Morré J., 1997, Stimulation of root formation in difficult-to-root woody cuttings by dithiothreitol, *Int. J. O. Plant Sci*., 158 (2), 132-135

Auderset G., O'Rourke J., Moncousin C., 1988, Etude sur la rhizogenèse adventive *in vitro* chez *Malus domestica* Jork 9, *Saussurea*, 29, 77-96

Dehahn T. B., 1997, The effect of Cystein and Auxin on plant growth, Thesis, Purdue University, 145 p

Kranner I., Grill D., 1994, Rapid changes of the glutathione status and the enzymes involved in the reduction of glutathione disulfide during the initial stage of wetting of Lichens, *Crypt. Bot*., 4, 203-206

Kranner I., Grill D., 1996, Significance of thiol-disulfide exchanges in resting stages of plant development, *Bot. Acta*, 109, 8-14

Morré D. J., 1994, Hormone - and growth factor - stimulated NADH oxidase, *Journ. Bioenerg. Biomembr*., 26, 421-433

Morré D.J., Auderset G., Penel C., Canut H., 1987, Cytochemical localization of NADH-ferricyanide oxido-reductase in hypocotyl segments and isolated membrane vesicles of soybean, *Protopl.,* 140, 133-140