

Effets de deux sources lumineuses sur la croissance et sur le contenu glucidique et gibbérellinique des feuilles de *Cichorium intybus* L cultivé *in vitro*

MC Lancry, JP Couillerot

Université des sciences et techniques de Lille Flandres-Artois, laboratoire de physiologie de la différenciation et biotechnologies végétales, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

(Reçu le 13 mars 1990; accepté le 29 novembre 1990)

Résumé — Des plantules de *Cichorium intybus* L (cv Flash) cultivées *in vitro* sont exposées à la lumière fournie soit par des lampes Cool-White, soit par des lampes Gro-Lux. Le développement du feuillage, de même que son contenu en gibbérellines et en glucides alcool-solubles sont modifiés par le type d'éclairage. Les lampes Cool-White permettent d'obtenir des feuilles plus grandes et plus riches en gibbérellines. Sous lumière Gro-Lux, les limbes qui contiennent davantage de glucides sont toujours moins développés.

***Cichorium intybus* L = endive / lumière / croissance / glucide / gibbérelline**

Summary — Effects of two illumination sources on growth and on carbohydrate and gibberellin leaf contents of *in vitro* grown *Cichorium intybus* L. Fourteen-d old seedlings of *Cichorium intybus* L (cv Flash) were grown *in vitro* under a 16-h photoperiod ($15 \pm 1 \text{ W m}^{-2}$). Two different spectral emissions (fig 1) were obtained by using Cool-White and Gro-Lux fluorescent lamps. Differences in the growth (table I), of gibberellin (fig 2) and carbohydrate (table II) contents of leaves were observed. Plantlets grown under Cool-White lamps developed larger leaves with a high level of gibberellin-like activity. Carbohydrate content increased in the Gro-Lux illuminated leaves.

***Cichorium intybus* L = endive / light / growth / carbohydrate / gibberellins**

INTRODUCTION

Le rôle de la lumière sur le contrôle du développement des plantes cultivées *in vitro* a été souligné par différents auteurs (Kalkade, 1984; Seabrook, 1987; Siebert *et al*, 1975; Young et Cameron, 1985). La qualité de la lumière influe non seulement sur l'activité photosynthétique mais aussi sur la synthèse et le métabolisme des gibbérellines du feuillage (Sembdner *et al*, 1980; Railton *et al*, 1984), ces dernières étant elles-mêmes capables de modifier l'équilibre glucidique des limbes (Couillerot, 1986).

Au laboratoire, nous avons remarqué que la croissance des plantules d'endive est variable selon la qualité de la lumière qui leur est fournie. Dans ce travail, nous analysons les effets de 2 sources lumineuses sur le développement et sur le contenu glucidique et gibbérellinique des plantules d'endive cultivées *in vitro*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Les semences commerciales d'endive (*Cichorium intybus* L var Witloof) hybride F₁ Flash® – obtention INRA – nous ont été fournies par les établissements L Goddyn, (59700 Marcq en Barœul).

Elles sont composées d'un mélange d'akènes de couleur marron et d'akènes de couleur claire. Elles sont désinfectées 2 min dans le mercryl laurylé à 10%, puis 10 min dans le chlorure mercurique à 0,1%. Après 3 rinçages avec de l'eau stérile, les akènes sont mis à germer en boîte de Petri sur la solution minérale de Heller gélosée (6 g d'agar.l⁻¹). L'ajout de saccharose dans ce milieu nous permet de déceler les akènes mal désinfectés et mis en culture (3 j à l'obscurité; 24 °C). Dans le cadre de notre étude, nous n'avons utilisé que les akènes de couleur claire dont la capacité germinative voisine de 65% après la désinfection est nettement supérieure à celle des akènes de couleur marron (environ 15%). Les plantules sont repiquées en tube sur un

milieu de composition identique et se développent en chambre climatisée (photopériode 16/8 g : thermopériode 24 °C/20 °C).

Deux types de lampes fluorescentes Cool-White F400 WX De luxe et Gro-Lux F40W GRO ont été utilisées; ces dernières émettent davantage de radiations rouges (fig 1). Les plantules reçoivent dans les 2 cas $15 \pm 1 \text{ W.m}^{-2}$ et sont utilisées 17 j après le semis.

Mesure de la surface foliaire

Elle nous permet de déterminer la croissance des feuilles au moment de leur prélèvement. Les limbes sont étalés entre 2 feuilles transparentes et leur image obtenue par photocopie est découpée, puis pesée. La surface foliaire est déterminée en fonction du poids constant de l'unité de surface du papier.

Extraction et dosage des glucides dans les feuilles

Les limbes sont broyés. Les glucides simples représentés par les monosaccharides et les oligosaccharides de degré de polymérisation < 7 , sont solubilisés dans l'alcool éthylique (10 ml.g^{-1} de matière fraîche – MF –) à température ambiante. Après centrifugation (20 min à $10\,000 \text{ g}$) le surnageant est récupéré. Le culot est rincé 2 fois avec de l'alcool éthylique, puis les 3 surnageants sont réunis. L'alcool est évaporé à 40 °C et les glucides recueillis sont repris dans une solution de sorbitol (1 mg.ml^{-1}), le sorbitol constituant un standard externe. L'identification et le dosage des glucides sont effectués par chromatographie liquide à haute pression au moyen d'une colonne Waters Sugar Pak 1 (diamètre 6,5 mm; longueur 300 mm), maintenue à 85 °C . La phase mobile constituée par de l'eau bidistillée additionnée de 200 mg.l^{-1} de Na N_3 , est délivrée par une pompe Shimatzu L 6-6A ($0,6 \text{ ml.min}^{-1}$). Les différents glucides sont détectés par un réfractomètre différentiel (Knauer). Les teneurs en glucides sont exprimées en valeur absolue.

Extraction et dosage des gibbérellines

Les feuilles sont broyées et les gibbérellines sont extraites à 4 °C avec du méthanol à 80% puis de l'acétate d'éthyle, selon le protocole décrit par Couillerot

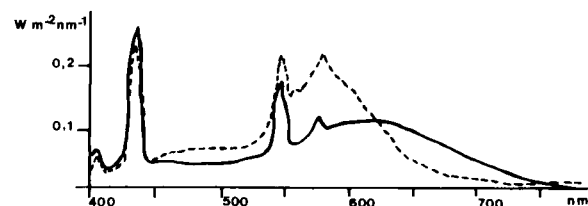


Fig 1. Courbes d'émissions spectrales des lampes fluorescentes Cool-White (---) et Gro-Lux (—).

(1986). Les gibbérellines sont séparées sur gel de silice 60 F254 Merck parcouru par le solvant isopropanol-ammoniaque-eau (80; 0,05; 19,95 v/v). Leur activité est mesurée par le test biologique hypocotyle de laitue, CV Batavia dorée de printemps (Couillerot, 1986). Les teneurs sont exprimées par rapport à des quantités connues de GA_3 (équivalent GA_3).

RÉSULTATS

La croissance des plantules d'endive varie selon la qualité de la lumière fournie. Ainsi après 17 j de culture, les plantules éclairées par des lampes Cool-White ont une surface foliaire significativement (loi de l'écart réduit, niveau de probabilité de 0,05) plus importante que celle des plantules éclairées par des lampes Gro-Lux (tableau I). Dans ces dernières, les glucides alcool-solubles ne sont représentés que par du glucose et du fructose; leur teneur est nettement plus importante que dans les limbes de plantules cultivées sous lumière Cool-White qui renferment aussi un peu de saccharose.

Au moins 3 groupes de composés ayant une activité gibbérellinique sont mis en évidence chez les 2 types de plantes (fig 2). Dans les feuilles cultivées sous lumière Cool-White, l'activité gibbérellinique représente $350 \text{ ng (d'équivalent } \text{GA}_3\text{).g}^{-1}$ (MF), répartis aux zones de Rf 0,4; 0,6; 0,7 et 1,0. Par contre sous lumière Gro-Lux l'activité totale, décelée pour l'essentiel au Rf 1,0, ne représente que $140 \text{ ng (d'équivalent } \text{GA}_3\text{).g}^{-1}$ (MF).

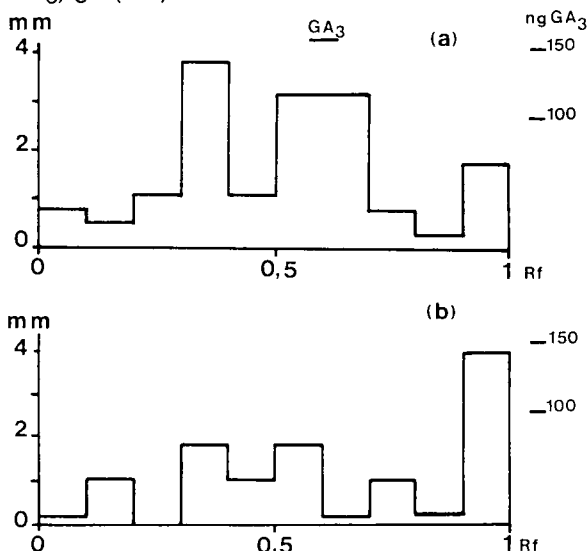


Fig 2. Activités gibbérelliniques mesurées par le test hypocotyle de laitue dans les 2 premières feuilles vraies de plantules d'endive cultivées 14 j sous des lampes Cool-White (a) ou Gro-Lux (b). La stimulation de l'allongement des hypocotyles de laitue est exprimée en mm sur l'axe des ordonnées (extrait chromatographié, témoin solvant). Rf = coefficient de mobilité relative.

Tableau 1. Effet des sources lumineuses Cool-White et Gro-Lux sur le développement et sur le contenu en gibbérellines et en glucides alcool-solubles des 2 premières feuilles vraies de plantules d'endive âgées de 17 j. Moyenne \pm erreur standard de la moyenne; 0,05 (^a $n = 13$ plantes; ^b $n = 3$ répétitions).

Source lumineuse ($15 \pm 1 \text{ W.m}^{-2}$)	Cool-White	Gro-Lux
Surface des limbes (mm^2) ^a	476 \pm 26	313 \pm 39
Activité gibbérellinique (ng (équivalent GA_3). g^{-1} (MF))	350	140
Glucides (mg.g^{-1} (MF)) ^b		
Saccharose	0,2 \pm 0,1	néant
Glucose	0,5 \pm 0,3	2,9 \pm 1,8
Fructose	0,7 \pm 0,2	1,5 \pm 0,8

DISCUSSION ET CONCLUSION

La croissance des feuilles de plantules d'endive cv Flash® est modifiée selon la source lumineuse. Nous constatons qu'avec des éclairagements équivalents ($15 \pm 1 \text{ W.m}^{-2}$) le feuillage se développe davantage sous des lampes fluorescentes Cool-White que sous des lampes Gro-Lux. Ce dernier type de lumière entraîne une réduction notable des surfaces foliaires et l'épaississement des limbes. Nos observations rejoignent celles de Seabrook (1987) sur des tiges de pomme de terre cultivées *in vitro* : la lumière Cool-White permet, là aussi, d'obtenir des plantes avec des tiges et des feuilles plus développées qu'avec la lumière Gro-Lux.

Les teneurs élevées en gibbérellines biologiquement actives dans le feuillage des plantules cultivées sous lumière Cool-White peuvent en partie expliquer la croissance plus importante. En effet, l'accumulation de gibbérellines endogènes ou exogènes s'accompagne d'un accroissement des surfaces foliaires chez la tomate par exemple (Couillerot, 1986); l'activité photosynthétique y est également plus intense (Arteca et Dong, 1981) tout comme chez un certain nombre d'espèces (Brenner, 1987). Chez le pois, Romanowska *et al* (1984) signalent que les radiations rouges réduisent fortement la photosynthèse des plantes, même si celles-ci reçoivent du GA_3 exogène.

L'accumulation d'hexoses dans les feuilles éclairées avec la lumière Gro-Lux provoque l'épaississement des limbes et limite leur développement.

Les mono- et les disaccharides peu abondants dans les feuilles des plantes éclairées avec la lumière Cool-White sont vraisemblablement davantage utilisés. L'exportation vers d'autres organes est peut-être aussi plus intense comme c'est le

cas chez le soja (Brenner *et al*, 1986) où les gibbérellines stimulent non seulement la synthèse de saccharose – forme glucidique transportée – mais aussi sa prise en charge par le phloème.

Ces résultats soulignent l'importance du conditionnement des plantules d'endive, en particulier lorsque nous les utilisons pour obtenir des protoplastes (Saksi *et al*, 1986; Wali Alami-Fathi, 1987; Lancry et Couillerot, 1989). En effet chez la pomme de terre, Karp *et al* (1984) signalent que ce sont les feuilles les plus grandes qui permettent d'obtenir davantage de protoplastes viables, tandis que Watts *et al* (1974) constatent que l'accumulation de glucides dans les limbes de tomate rend les protoplastes ultérieurement isolés extrêmement fragiles à manipuler.

RÉFÉRENCES

- Arteca RN, Dong CN (1981) Increased photosynthetic rates following gibberellic acid treatment to the roots of tomato plant. *Photosynth Res* 2, 243-249
- Brenner ML (1987) The role of hormones in photosynthate partitioning and seed filling. *In: Plant hormones and their role in plant growth and development* (Davies PJ, ed) Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 474-493
- Brenner ML, Brun WA, Schussler J, Cheikh N (1986) Effects of endogenous and exogenous plant growth substances on development and yield of soybeans. *In: Plant growth Substances 1985* (M Bopps, ed) Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, 380-386
- Couillerot JP (1986) Croissance et développement de la Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) : Transport et rôle des gibbérellines. Thèse Doctorat d'État, Univ Lille, 180 p
- Heller R (1953) Recherche sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann Sci Nat Biol Veg* 14, 1-223

- Kalkade PC (1984) Photoregulation of organogenesis in *Tsuga heterophylla* embryo and seedling tissue cultures. *Plant Physiol (Abs)* 75, 90
- Karp A, Risiott R, Jones MGK, Bright SWJ (1984) Chromosome doubling in monohaploid and dihaploid potatoes by regeneration from cultured leaf explants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 3, 363-373
- Lancry MC, Couillerot JP (1989) Effects of the illumination source on gibberellins and carbohydrates contents in Chicory leaves and in the corresponding protoplasts. In: *Impact des biotechnologies en Agriculture*, Amiens, Po Pro 10
- Railton ID, Fellows B, West CA (1984) Ent-kaurene synthesis in chloroplasts from higher plants. *Phytochemistry* 23, 1261-1267
- Romanowska E, Parys E, Postuka J (1984) The effect of light quality and gibberellic acid (GA₃) on photosynthesis and respiration rates of pea seedlings. *Photosynth Res* 5, 205-214
- Saksi N, Dubois J, Millecamps JL, Vasseur J (1986) Régénération de plantes de Chicorée Witloof cv «Zoom» à partir de protoplastes : influence de la nutrition glucidique et azotée. *CR Séances Acad Sci Paris*, 302, 165-170
- Seabrook JEA (1987) Changing the growth and morphology of potato plantlets *in vitro* by varying the illumination source. *Acta Hort* 212, 401-410
- Sembdner G, Gross D, Liebisch HW, Schneider G (1980) Biosynthesis and metabolism of plant hormones. In: *Hormonal regulation of development. I. Molecular aspects of plant hormones. Encyclopedia of plant physiology*. 9, (J Mc Millan, ed), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 281-444
- Siebert M, Wetherbee PJ, Job DD (1975) The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. *Plant Physiol* 56, 130-139
- Wali Alami-Fathi FZ (1987) Préparation et culture de protoplastes de *Cichorium intybus* L var Witloof : Amélioration des rendements. Thèse de 3^e cycle, Lille, 104 p
- Watts JF, Motoyoshi F, King JM (1974) Problems associated with the production of stable protoplasts of cells of Tomato mesophyll. *Ann Bot* 38, 667-671
- Young MJ, Cameron JS (1985) Effect of light on blueberry shoot and callus cultures. *The Plant Propagation* 31, 14-16