

***In vitro* control of oxidative browning: Case of amaryllis (*Amaryllis belladonna* L.)**

Contrôle du brunissement enzymatique en culture *in vitro*: Cas de l'amaryllis (*Amaryllis belladonna* L.)

S. ARBAOUI¹, S. SOUFI¹, T. BETTAIEB^{1*}

¹ Laboratoire des Sciences Horticoles, Universités de Carthage. Institut National Agronomique de Tunisie, 43 Avenue Charles Nicolle, Tunis 1082, Tunisie.

*Corresponding author: tbettaieb@yahoo.fr

Abstract – Oxidative browning is one of the main problems in *plant* tissue culture systems caused by the accumulation and *oxidation* of phenolic compounds and limits their propagation. To prevent and to overcome this limitation a number of techniques and antioxidant products such as activated charcoal and β -Cyclodextrin were applied during the initiation phase of *Amaryllis*; sensitive plant to oxidative browning : *Amaryllis belladonna* L. The obtained results showed that media supplemented with 2 g/l of activated charcoal exhibited lower browning intensities and, at the same time, the survival and recovery rates of the explants were about 80 %. The β -Cyclodextrin added to 1 g/l in the culture media also has an effect on the control of enzymatic browning. However, its action remains inferior to that of charcoal and gives similar results only when the pH is lowered to approximately 4.5. Acidic media at pH 4.5, outside the area of activity of polyphenol oxidases, also, limit browning.

Keywords: Enzymatic browning, amaryllis, *in vitro* culture, antioxidants

Résumé - Le brunissement enzymatique en culture *in vitro* de tissus végétaux, provoqué par une oxydation phénolique, constitue un handicap majeur à la micropropagation de plusieurs plantes. Afin d'éviter ce phénomène, des essais de techniques et de produits antioxydants comme le charbon actif et la β -cyclodextrine ont été conduits lors de l'initiation en culture *in vitro* d'une plante sensible à l'*Amaryllis* : *Amaryllis belladonna* L. Les résultats obtenus montrent l'effet du charbon actif sur le contrôle du brunissement enzymatique puisque avec 2 g/l de ce produit les intensités du brunissement ont été très faibles et, parallèlement, les taux de survie et de reprise des explants ont été de 80% environ. La β -cyclodextrine additionnée à 1g/l au milieu de culture a, aussi, un effet sur le contrôle du brunissement enzymatique. Toutefois, son action reste inférieure à celle du charbon et ne donne des résultats similaires que lorsque le pH est abaissé au niveau 4,5. Les milieux acides à pH 4,5, en dehors de la zone d'activités des polyphénols oxydases limitent, également, le brunissement.

Mots clés : Brunissement enzymatique, amaryllis, culture *in vitro*, antioxydants

1. Introduction

La micropropagation de plusieurs espèces végétales est confrontée, dans plusieurs cas, à des problèmes qui affectent la survie des explants mis en culture. Parmi ces handicaps, le brunissement enzymatique, l'hyperhydricité, la récalcitrance à l'enracinement *in vitro*... limitent largement la réussite de ce mode de propagation clonale (Margara, 1984).

Le brunissement enzymatique en culture *in vitro* est une réaction qui se manifeste par l'apparition d'une coloration brune qui touche, tout d'abord l'explant, ensuite le milieu de culture. Ceci évolue à une inhibition de la croissance et du développement de l'explant et la mort prématurée des cellules proches des blessures et, dans plusieurs cas, à la létalité du matériel végétal mis en culture. Le brunissement aura lieu lorsque le tissu végétal est exposé à des situations de stress comme la dissection des explants déclenchant l'apparition des réactions d'hypersensibilité suite à une décompartmentation cellulaire permettant la mise en contact d'un substrat phénolique avec un système enzymatique lié aux membranes plasmiques. Cette réaction est le résultat de la transformation des composés phénoliques en polymères colorés, le plus souvent en couleur brune ou noire sous l'action d'enzymes, en l'occurrence, les polyphénoloxydase (PPO). Ces dernières jouent le rôle de catalyseur d'une oxydation des composés phénoliques endogènes dits quinones. Celles-ci se condensent rapidement pour donner les polymères



brunâtres (Chuanjuna et al., 2015) La réaction d'oxydation se fait après destruction des membranes séparant les PPO et les phénols, et ce, en présence du cuivre et de l'oxygène. Deux réactions différentes sont définies. En premier lieu, il y'a transformation de monophénol en diphénol par hydroxylation à l'aide de monophénolmonooxygénase ou crésolase et dans un second lieu, il y'a transformation des diphénols en quinones après oxydation par la catéchol oxydase ou cathécolase (Cheriot, 2007). L'activité optimale des PPO se situe généralement dans une gamme de pH comprise entre 4 et 7 (Chuanjuna et al., 2015). Pour que la réaction de brunissement ait lieu, un ou plusieurs facteurs interviennent tels que ; la présence de l'eau et de l'oxygène, une blessure cellulaire qu'elle soit mécanique ou chimique, la présence des substrats phénoliques oxydables et l'activité des enzymes d'oxydation (Cheriot, 2007).

La micropropagation débute par divers traitement des explants avant leur mise en culture. Leur désinfection à l'aide de produits chimiques et leur fragmentation facilite la libération des phénols et induit le brunissement enzymatique (Magara, 1984). Ainsi, pour tester les techniques et les produits susceptibles de limiter ce phénomène et pallier à ce handicap de la micropropagation, des essais ont été entrepris, lors de ce travail, sur une espèce ornementale, en l'occurrence, *Amaryllis belladonna* L.. Cette espèce servira de modèle puisqu'elle est difficile à multiplier *in vitro* en raison d'un brunissement intense des explants après leur mise en culture. Différentes méthodes comme l'ajustement du pH et l'addition aux milieux de culture de produits antioxydants comme le charbon actif et la β -cyclodextrine sont utilisés.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Matériel et méthodes

Les essais de produits limitant le brunissement enzymatique *in vitro* ont été réalisés sur un matériel végétal sensible à ce phénomène et qui est constitué par des bulbes d'*Amaryllis belladonna* matures et bien développés. Les explants prélevés à partir de ces bulbes se composent d'un fragment du plateau et de la partie basale de deux écailles voisines. La longueur de l'explant est de 1 à 1.5 cm (Figure 1 et 2).

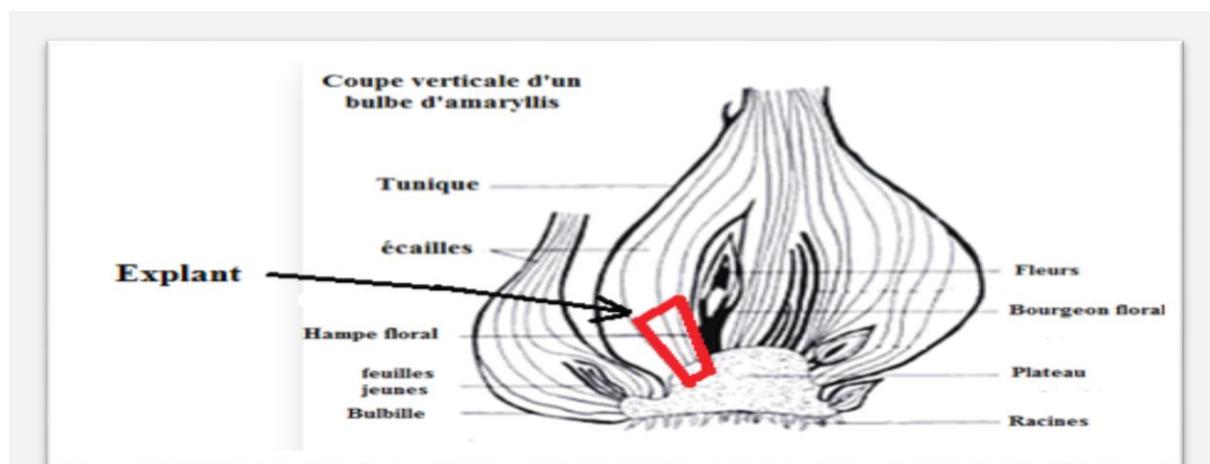


Figure 1. Coupe d'un bulbe d'Amaryllis et localisation de l'explant prélevé



Figure 2. Explants avant la mise en culture

Les milieux de culture de base (MB) utilisés sont composés des sels minéraux et des vitamines de Murashige et Skoog (MS) (1962) additionnés de 30 g.l⁻¹ de saccharose. Les hormones utilisées sont l'acide β -indole butyrique (AIB) et le 6- benzylaminopurine (BAP). Les milieux de culture ont été solidifiés à l'agar (6g/l).

Lors d'un essai préliminaire, deux milieux ont été testés pour observer le comportement des explants sans additifs antibrunissement. Le milieu 1 (M1) est constitué du MB additionné de 0.5 mg/l d'AIB. Le second contient le MB supplémenté de 0,5 mg/l d'AIB et de 1mg/l BAP. Le pH a été fixé à 5,8.

A la lumière de l'essai exploratoire, un deuxième essai de quinze milieux de culture est conduit afin de tester la réponse des explants vis-à-vis du brunissement enzymatique. Pour prévenir ce phénomène, deux antioxydants ont été utilisés, en l'occurrence, la β -cyclodextrine et le charbon actif. En plus, deux niveaux de pH différents à savoir ; un niveau pH alcalin 7,5 et un niveau pH acide 4,5 (Tableau 1). Le pH est ajusté par des solutions de NaOH et HCl. Ensuite, ces milieux de culture sont distribués dans des tubes à essai de 15 cm de hauteur et de 20 mm de diamètre.

Tableau 1. Milieux de culture testés pour limiter le brunissement enzymatique chez des explants d'*Amaryllis belladonna* L.) cultivés *in vitro*

Milieu de culture*	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
pH			5,8					4,5					7,5		
$\beta\beta$ -cyclodextrine (g.l ⁻¹)	0	0,5	1	0	0	0	0,5	1	0	0	0	0,5	1	0	0
Charbon actif (g.l ⁻¹)	0	0	0	1	2	0	0	0	1	2	0	0	0	1	2

*Milieu MS (1962) + 0,5 mg/l d'AIB et 1 mg/l BA

Le matériel végétal est constitué de fragments de bulbes portant quelques écailles et une partie du plateau a été désinfecté à travers un trempage dans l'éthanol pendant quelques secondes, un rinçage à de l'eau distillée stérilisée, un trempage dans un mélange de 20 ml d'eau de javel et de 180 ml d'eau distillée stérilisée pendant 15 minutes, un rinçage à l'eau distillée stérilisée, un trempage dans une solution de HgCl₂ à raison de 200 mg/200 ml pendant 5 minutes et deux trempages dans l'eau distillée stérilisée pendant 5 minutes chacun.

Les cultures sont conduites sous une température de 23°C, une photopériode est de 16 h et une intensité lumineuse de 36 μ mol/m²/s.

Les observations et mesures effectuées ont concerné l'intensité du brunissement enzymatique en attribuant des notes allant de 0 à 5 où 0 correspond à l'absence de brunissement et 5 correspond au plus haut degré de brunissement, le taux de reprise des explants, le nombre moyen de pousses axillaires par explant et la longueur moyenne des pousses.

Toutes les données ont été analysées moyennant le logiciel SAS version 9.1.3, procédure GLM III pour l'analyse de la variance. Les moyennes ont été séparées par le test de Duncan (au seuil de 5%). Les résultats sont représentés par les moyennes \pm les écarts types.

3. Résultats et discussions

La première mise en culture des explants d'*Amaryllis belladonna* L. effectuée est un essai préliminaire pour la prospection des réponses du matériel végétal vis-à-vis des conditions de culture. Au bout de 30 jours, un brunissement enzymatique de la base des explants mis en culture suivi d'un brunissement total a causé la létalité de 70% matériel végétal. Sur le milieu 1, la reprise de la croissance *in vitro* n'a été observée que sur 30% des explants (Figure 3). Sur le milieu 2, bien que la reprise de la végétation *in vitro* des explants soit similaire à celle observée sur le milieu 1, le bourgeonnement axillaire est favorisé par la présence d'une cytokinine (Godefroy et Cra, 2008). Ces résultats étaient prévisibles en présence du BA reconnue inductrice du bourgeonnement axillaire. Toutefois, en absence d'antioxydants à la disposition d'un matériel végétal sensible à l'oxydation phénolique, le brunissement s'amplifie d'un jour à l'autre et devient un handicap à cette phase d'initiation. Ces résultats sont en cohérence avec plusieurs travaux qui ont examiné le phénomène du brunissement enzymatique en culture *in vitro*. On peut citer celui de Belkhouja *et al.* (2008) qui ont étudié l'influence hormonale sur l'induction de la callogenèse des graines d'*Atriplex canescens* et *Atriplex halimus*. La réaction de brunissement de l'espèce cultivée *in vitro* était inévitable et a engendré l'inhibition de la croissance des tissus ou même leur dégénérescence. El Hadrami (1996) a étudié les effets du brunissement enzymatique lors de la

micropropagation par embryogenèse somatique et organogenèse du *Phoenix dactylifera*. Les effets du brunissement s'observent dans la lenteur de la réaction des explants et la difficulté de l'acquisition des potentialités embryogènes des tissus.

A la lumière des observations faites lors de l'essai préliminaire, des cultures ont été conduites sur des milieux ayant la composition hormonale du milieu 2 et additionnés d'antioxydants ou ayant deux niveaux de pH différents. Dès lors, le brunissement enzymatique des explants et leurs comportements ont été différents selon le milieu de culture (Tableau 2).

Les résultats obtenus mettent en exergue l'effet du charbon actif sur la prévention du brunissement enzymatique puisque les intensités de brunissement les plus faibles qui vont de pair avec les taux de reprise des explants les plus élevés ont été obtenues en présence de cet additif. Le milieu 1, utilisé comme témoin favorise le brunissement intense et provoque la létalité de 72 % des explants mis en culture (Figure 3A) (Tableau 2). En effet, sur les Milieu 5, 10 et 15 où le charbon est additionné au milieu de culture à raison de 2g/l quel que soit le pH, l'intensité de brunissement enzymatique ne dépasse pas le niveau 1 et les taux de reprise des explants est toujours voisin de 80%. Ces constatations confirment celles de Bettaieb et Tissaoui (2007) qui ont observé une létalité des explants de *Strelitzia reginae* sur des milieux de culture ne contenant pas de charbon. Toutefois, cet additif adsorbe les cytokinines et limite leur action sur le bourgeonnement axillaire (Margara, 1984). En effet, il a été constaté qu'en présence de charbon actif, l'apparition des pousses axillaires sur les cultures d'amaryllis initiées *in vitro* a été très limitée (Figure 3C).

La présence de β -cyclodextrine dans le milieu de culture a eu, aussi, un effet sur le contrôle du brunissement enzymatique avec des intensités de brunissement intermédiaires entre celles observées chez le témoin ou en présence du charbon actif lorsque le pH est de 5,8 ou 7,5. Le milieu 1 utilisé comme témoin favorise un brunissement intense et provoque la létalité de 72% des explants (Figure 3A) (Tableau 2). Toutefois, le brunissement et ensuite la létalité des explants ont été limités en présence de 1g/l de β -cyclodextrine lorsque le niveau de pH est abaissé à 4,5 (Figure 3D). Sur ce milieu de culture le taux de reprise est de 74%. En effet, selon Apostolo et al. (2001), la β -cyclodextrine a un effet inhibiteur de l'action des PPO. Les cyclodextrines sont des oligosaccharides cycliques qui possèdent une cavité hydrophobe leur permettant de former un complexe avec une large gamme de molécules organiques et particulièrement avec des phénols (Munoz et al., 1993). Ces résultats vont en vraisemblance avec ceux indiqués par Bettaieb et al. (2006) lors de la micropropagation de deux espèces florales, en l'occurrence, *Strelitzia reginae* et *Phalaenopsis amabilis* où il a été constaté que l'utilisation de la β -cyclodextrine comme agent protecteur des auxines a engendré aussi un effet inhibiteur de l'action des PPO. Cet antioxydant inhibe 50% à 70% l'activité des PPO. Les milieux à pH 7.5 n'ont eu d'effet sur le contrôle du brunissement qu'en présence de charbon actif ou de β -cyclodextrine alors que les milieux acides à pH 4,5 limitent dans tous les cas l'intensité du brunissement. Selon Chuanjuna, et al. (2015), l'utilisation d'un milieu à pH acide inhibe efficacement le brunissement dans le milieu de culture puisque les PPO sont actives à un pH allant de 5 à 7. Le pH est un facteur important qui intervient dans la vitesse des réactions. En effet, en dehors de la zone de l'activité des PPO, la réaction d'oxydation est plus lente et peut être inhibée par une acidification du milieu de culture. Cette acidification du pH en le passant en dehors de l'intervalle de l'activité des PPO peut aider à surmonter le dommage causé par le brunissement.

Tableau 2. Effets du pH, de β -cyclodextrine et du charbon actif sur le brunissement enzymatique et l'initiation d'une culture *in vitro* d'explants d'Amaryllis : *Amaryllis belladonna* L.

Milieu de culture	pH	β -cyclodextrine (g.l ⁻¹)	Charbon actif (g.l ⁻¹)	Intensité du brunissement	Taux de reprise des explants (%)	Nombre moyens de pousses par explant	Hauteur moyenne de de pousses axillaires (mm)
1	5,8	0	0	5	28	02,00 ^e ±0,11	07,00 ^l ±1,51
2		0,5	0	3	36	03,02 ^a ±0,10	10,02 ^k ±1,43
3		1	0	3	34	02,20 ^f ±0,08	15,00 ^f ±2,31
4		0	1	2	56	01,42 ^e ±0,13	28,02 ^{cd} ±2,43
5		0	2	1	80	01,40 ^e ±0,11	31,00 ^e ±2,25
6	4,5	0	0	3	31	02,07 ^c ±0,09	15,02 ^f ±1,78

7	0,5	0	3	29	02,00 ^c ±0,11	14,00 ^f ±2,01
8	1	0	1	74	03,02 ^a ±0,13	24,02 ^e ±3,15
9	0	1	2	61	01,00 ^f ±0,22	28,00 ^d ±2,12
10	0	2	1	78	01,10 ^f ±0,12	45,00 ^a ±2,21
11	7,5	0	5	24	02,02 ^c ±0,08	13,02 ^{fj} ±3,13
12	0,5	0	4	26	01,70 ^d ±0,11	12,00 ^k ±2,09
13	1	0	3	43	02,82 ^b ±0,16	23,02 ^e ±2,16
14	0	1	2	45	01,60 ^d ±0,09	36,00 ^b ±3,04
15	0	2	1	72	01,02 ^f ±0,14	39,02 ^b ±2,10

Les moyennes de la même colonne suivies de la même lettre ne diffèrent pas selon le test Duncan au seuil de 5%.



Figure 3. Explants d'Amaryllis : *Amaryllis belladonna* L. après 30 jours de culture

- A :** Explant nécrosé cultivé sur un milieu témoin (pH 5,8, sans β -cyclodextrine et sans charbon actif)
B : Explant sur un milieu de culture additionné de β -cyclodextrine
C : Explant sur un milieu de culture additionné de charbon actif
D : Explants sur un milieu de culture à pH 4,5 additionné de β -cyclodextrine

4. Conclusion

L'utilisation de produits antioxydants (charbon actif et β -cyclodextrine) dans des milieux de cultures *in vitro* de tissus végétaux à différents niveaux de pH limite à des degrés variables l'oxydation phénolique et par conséquent le brunissement des explants d'*Amaryllis* (*Amaryllis belladonna* L.) utilisés pour initier une multiplication végétative *in vitro* de cette plante. En effet, le charbon actif, additionné au milieu de culture à raison de 2g/l a une action sur la prévention du brunissement enzymatique quel que soit le niveau de pH du milieu adopté. L'intensité de brunissement enzymatique ne dépasse pas le niveau 1 et les taux de reprise des explants est toujours voisin de 80%. La β -cyclodextrine, à un degré moins élevé que le charbon actif, a un rôle antioxydant puisque brunissement enzymatique est limité lorsqu'on ajoute 1 g/l de ce produit au milieu de culture. Toutefois, son action sera plus forte quand le pH est abaissé à 4,5.

L'utilisation de milieu de culture à pH acide (4,5) inhibe efficacement le brunissement des explants mis en culture puisque les l'activité des polyphénols oxydases qui catalysent l'oxydation de phénols est intense à un pH allant de 5 à 7.

5. Références

- Apostolo NM, Brutti C, Ferrarotti SA, Liorente BE, Krymkiewics N (2001)** Stimulation of root development with cyclodextrins on *Jobosha* shoots *in vitro*. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant* 37:414-418
- Belkhdja M, Bouabdallah L, Ighilhariz Z (2008)**. Influence hormonale sur l'induction de la callogenèse chez *Atriplex halimus* L. L. et *Atriplex canescens* (Pursch. Nutt.). *Eur J Sci Res* 24(2) : 211-218
- Bettaieb T, Tissaoui T (2007)**. Multiplication *in vitro* de l'oiseau de paradis. *PHM-Revue horticole* 496 : 39-42
- Bettaieb T, Hajlaoui I, Mhamdi M (2006)** Micropropagation de *Nolina Recurvata* Hemsl. Effets de la β -cyclodextrine sur l'enracinement. *Revue de l'institut national agronomique de Tunisie* 21(1) : 115-122
- Cheriot S (2007)** Rôles des produits de la réaction de Maillard dans l'inhibition de l'oxydation enzymatique des phénols et des lipides : Doctorat de l'institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement, France , 214.
- Chuanjuna XU, Zhiweib R., Lingb LI, Biyua Z, Junmeia H, Wena H, Oua HU (2015)** The Effects of Polyphenol Oxidase and Cycloheximide on the Early Stage of Browning in *Phalaenopsis* Explants. *Hortic Plant J* 1 (3): 172-180
- El Hadrami I (1996)** Rapport de synthèse de l'atelier 'culture *in vitro* du palmier dattier'. Faculté des sciences, Semlalia. Marrakech:167-177
- Godefroy I, Cra W (2008)** Micropropagation par bourgeonnement axillaire *in vitro* de clones juvéniles d'*Acacia auriculiformis* : influence du génotype ; *BOIS ET FORÊTS DES TROPIQUES*, 297 (3) : 27-33
- Margara J (1984)** Bases de la multiplication végétative. INRA, Paris, 262
- Munoz de la Pena A, Salinas F, Gomez MJ, Sanchez-Pena M, Duran-Meras I (1993)** Host-guest stabilized room temperature phosphorescence in β -cyclodextrin/bromoalcohol solutions from 2-naphthyl-oxy-acetic acid and 1-naphthyl-acetic acid. *Talanta* 40(11): 1657-1664
- Murashige T, Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-4