

**EFFET INHIBITEUR DU ROUGE NEUTRE,
COLORANT VITAL, MÊME POUR DES DOSES TRÈS FAIBLES,
SUR LA CROISSANCE DES PLANTULES**

Par E. GILLES.

Nous ne rappellerons pas l'importance des colorants dits vitaux, principalement le rouge neutre, en Cytologie et même en Physiologie végétales. Outre son emploi normal pour la coloration vacuolaire vitale des cellules végétales, dans des préparations, le rouge neutre a été ajouté à des milieux synthétiques afin de fournir des colorations permanentes de ce système vacuolaire dans les racines de plantes en croissance (Champignons, d'abord, exemple *Saprolegnia*, puis Végétaux supérieurs).

Un important mémoire de Guilliermond et Gautheret (1) est venu apporter en 1940 une foule de renseignements, tous résultats personnels des auteurs, sur la coloration vitale. On n'envisagera ici que ce qui concerne la culture des Végétaux supérieurs sur milieux au rouge neutre. Les auteurs montrent, par des cultures de plantules de Blé et de Lupin, sur du liquide de Knop gélosé additionné de divers colorants vitaux, à des doses variant de 0,2 à 20 mmgr. % (pH de 7,2 à 8), que le rouge neutre est incontestablement « le moins toxique ». « Même en présence de 20 mmgr. % de ce colorant, disent les auteurs, les racines ne se montrent nullement incommodées ».

Des expériences effectuées dans des conditions un peu différentes nous ont amené à assigner un taux nettement inférieur à cette limite de la concentration non toxique du rouge neutre, pour les racines de Phanérogames (plantules). Rappelons d'ailleurs quelques faits significatifs. Les Végétaux inférieurs subissent une action néfaste : Guilliermond a montré que les *Saprolegnia* cultivés sur milieu au rouge neutre subissent une influence toxique « à partir de 2 mmgr. % et surtout au dessus de 5 mmgr. » ; au-dessus, la croissance est même arrêtée... Quant aux levures par exemple, ce savant les considère comme très sensibles. Personnellement, nous avons pu constater souvent que, si elle n'entraîne pas un arrêt du bourgeonnement — après une période d'adaptation, tout au moins (2) — une concentration de 5 mmgr. %, par exemple, sensibilise la Levure de Springer, *S. ellipsoideus*, *S. apiculatus*, à certains facteurs physiques (chaleur, U. V., ondes très courtes, etc.). Par ailleurs, on connaît la difficulté de faire germer du pollen en présence de rouge neutre : les cas de réussite ont été publiés comme des faits originaux intéressants. Effectuant durant plusieurs années (1932 à 1938) des cultures de plantules sur liquide de Knop, nous avons pu observer que des doses pourtant très faibles de rouge neutre paraissaient inhiber leur croissance. Il nous a paru intéressant d'analyser à nouveau ce cas, en profitant d'une méthode de recherche de faibles actions sur les graines et plantules, utilisant des vases à culture sur liquide, spéciaux, récemment mise au point par nous (3).

(1) A. GUILLIERMOND et R. GAUTHERET. Recherches sur la coloration vitale des cellules végétales. *Rev. Gén. de Bot.* t. LII, 1940, 262 pages, 10 planches.

(2) GUILLIERMOND et GAUTHERET ont montré que la Levure excrète le colorant à la fin de cette période.

(3) E. GILLES. Récipients destinés à la culture aseptique de plantules sur milieu liquide et procédé d'étude de faibles influences sur leur croissance. *Bull. mens. de la Soc. Linn. de Lyon*, n° 7, p. 77 1946, (section de Botanique, séance d'avril 1946).

TECHNIQUE.

Le rouge neutre est dissous dans du Knop dilué de moitié à des doses de 1 à 20 mmgr. % (1) ; ce milieu est placé dans les tubes en U, à étranglement, présentés dans la note antérieure rappelée ci-dessus. Le pH se situe aux environs de 7,6 au début de la culture. Récipients et milieux sont stérilisés normalement.

On adopte trois espèces favorables à l'emploi de ces tubes particuliers : Blé, Maïs, Pois. Dans un premier type d'expériences, les graines sont triées, placées dans les tubes aseptiquement après stérilisation superficielle. Dans un second type, le plus employé ici, ce sont de jeunes plantules qui sont disposées dans les vases après avoir été choisies, sélectionnées, suivant la méthode définie dans la note visée ci-dessus. L'asepsie n'est plus possible, mais on empêche le développement des Algues dans le milieu en protégeant de la lumière la partie inférieure des tubes par du papier noir. Ces cultures sont poursuivies durant une vingtaine de jours, dans une petite serre électrique, automatique (température : 24°).

Une vingtaine d'expériences concernent le Pois, dix le Maïs et autant le Blé. Chaque essai comporte ordinairement dix tubes-témoins pour dix sujets, quelquefois cinq seulement par lot lorsque plusieurs doses sont comparées. Les résultats sont très réguliers, surtout pour le Pois, plus particulièrement étudié pour cela même.

RÉSULTATS.

Les trois espèces montrent des effets du même ordre quoiqu'avec certaines particularités. Pour 1 mmgr., il n'y a pas d'influence perceptible ; pour 2 mmgr. par contre se révèle déjà un effet inhibiteur sur la croissance des racines — et même sur les parties aériennes — dans le cas du Maïs. Pour le Blé et le Pois, l'influence n'est bien nette qu'au dessus de 2 mmgr. %. Malgré cette sensibilité spécifique plus faible de ces deux derniers, les trois espèces subissent une inhibition caractérisée de la croissance de leurs racines (et radicelles) — des parties aériennes, même, pour Blé et Maïs —, pour une concentration de 5 mmgr. % soit $1/20.000^e$, de rouge neutre.

Donnons quelques précisions concernant le Pois, par exemple. Dès la mise en place sur le milieu au rouge neutre — ou dès la germination selon le type d'expériences — la racine montre une croissance plus lente que celle des organes-témoins. Les radicelles apparaissent en moins grand nombre ; les poils absorbants se détachent très tôt et tombent au fond du tube ; de nombreuses radicelles tendent à sortir du milieu coloré (chimiotropisme négatif). — L'expérience suivante prise comme exemple, montre bien l'influence de doses de 5 et 10 mmgr. % sur cette espèce (*Pisum sativum*) : Ici, ce sont des plantules présentant des racines de 20 mm. de longueur qui ont été placées dans les milieux colorés ou non.

(1) Trois types de rouge neutre ont été utilisés avec des résultats équivalents : Microcolor, R.A.L., Grübler.

EXEMPLE I. — *Pois. Moyennes portant sur 3 lots de 10 plantules, après 18 jours de culture.*

MOYENNES CONCERNANT	TÉMOINS	MILIEUX AU ROUGE NEUTRE	
		5 mmgr. %	10 mmgr. %
Longueur des tiges en mm.	135	124	125
Longueur des racines.	187	158	95
Longueur des parties portant des radicelles	113	77	43
Nombre de radicelles	56	32	24
Nombre de radicelles aériennes	0	4	4
Nombre de radicelles dépassant 3 cm. . .	28	15	13
Poids total initial	2,6 gr.	2,6 gr.	2,6 gr.
— — final	11,2 —	9,6 —	9,2 —
pH initial	7,6 —	7,6 —	7,6 —
ph final	7,4 —	6,6 —	6,4 —

Ces chiffres montrent l'effet extrême sur les racines (moy. : 158 et 95 mm. pour 5 et 10 mmgr. % contre 187 pour les témoins), sur la production de radicelles (32 et 24 en moyenne contre 56). Les parties aériennes sont peu influencées, tout au moins dans cette espèce (*Pois*). Le poids total varie peu d'un lot à l'autre, mais il est cependant un peu plus faible pour les sujets (les racines interviennent peu dans ce poids total). L'absorption est notablement modifiée par la présence du rouge neutre : le pH passe de 7,6 à 6,6 dans le milieu à 5 mmgr. %, à 6,4 pour 10 mmgr. %, à la fin de la culture, contre 7,4 chez les témoins, où la variation est donc plus faible.

Répétée à cinq reprises, cette expérience a fourni des données similaires.

Donnons un autre exemple : cas du *Maïs* soumis à une dose intermédiaire, soit 8 mmgr. % (plantules mises en place avec une longueur moyenne des racines égale à 30 mm. et des coléoptiles de 6 mm.).

EXEMPLE II. — *Maïs. Mesures portant sur 2 lots de 5 plantules, après 15 jours de culture.*

MESURES CONCERNANT	TÉMOINS	MOY.	MILIEU A 8 MMGR. %	MOY.
L. moy. des racines. . .	170 172 168 175 170	171 mm.	113 110 108 110 112	110 mm.
H. des coléoptiles . .	35 28 33 22 20	29 —	27 22 21 24 25	24 —
H. des part. aériennes. .	144 102 175 125 137	137 —	90 87 77 82 93	86 —

Un autre type d'expérience, comparant les effets de cette dose moyenne (8 mmgr.) à une dose minime (2 mmgr.) de colorant, sur le *Maïs*, révèle une

nette influence, même de cette plus faible concentration, comme nous l'avions précisé au début de cet exposé des résultats, sans donner d'exemple. L'expérience suivante concerne encore des plantules mises sur les milieux après germination et croissance préalables, suivies d'une sélection.

EXEMPLE III. — *Maïs. Moyennes de 3 lots de 10 plantules, après 15 jours de culture.*

MESURES CONCERNANT	TÉMOINS	2 mmgr. %	8 mmgr. %
Longueur moyenne des racines	170	150	112 mm.
— des coléoptiles	27	25	21 —
— des parties aériennes	135	125	90 —

Les résultats sont du même ordre avec le Blé. Ces deux espèces: Maïs-Blé, subissent donc un effet inhibiteur intéressant également leurs parties aériennes. La réponse différente du Pois s'explique à notre avis, par le fait que les radicelles, quoique moins nombreuses que chez les témoins, sont abondantes et longues, dans cette espèce, dépassant souvent la racine dont la croissance est amoindrie, dans le milieu coloré. L'absorption reste pour ainsi dire, presque normale. Chez le Blé et le Maïs, les racines principales se ramifient rarement dans ces milieux au rouge neutre et subissent une inhibition marquée.

Enfin des doses supérieures — 15 à 20 mmgr. % — causent un effet pouvant aller jusqu'à l'arrêt de la croissance des racines et de production de radicelles — même chez le Pois. Les parties aériennes sont alors nettement influencées (indirectement).

Le fait le plus général qui résulte de ces données est l'inhibition exercée par le rouge neutre à partir de 2 mmgr. %, sur la croissance des racines d'espèces très sensibles, de 2 à 5 mmgr. % pour les autres. Les mitoses y sont freinées et l'élongation cellulaire entravée comme le révèle une étude particulière des extrémités des racines développées dans le milieu coloré, comparativement à celle des témoins. Le rouge neutre exerce cet effet, au cours de son passage dans le cytoplasme, avant son accumulation dans la vacuole. Il est probable qu'il atteint le noyau sans s'y fixer, tout au moins vitalement.

Les différences avec les résultats obtenus par Guilliermond et Gautheret s'expliquent aisément. Ces auteurs ont employé un milieu gélosé qui s'épuise vite localement, au contact de la racine en croissance. La concentration réelle en rouge neutre est alors très inférieure à la dose établie. Dans nos essais mêmes, si l'on agite le liquide de culture après quelques jours d'immobilité absolue, l'effet inhibiteur, d'abord ralenti, se manifeste à nouveau, avec une extrême intensité.

En définitive, on peut conclure qu'il ne faut pas dépasser des concentrations de 1 à 2 mmgr. % de rouge neutre, pour des plantules de Phanérogames, si l'on veut profiter d'une coloration vitale vacuolaire des racines, en leur conservant une absorption et une croissance normales.

Présenté à la Section Botanique, en sa séance de mai 1946.