

INFLUENCE RECIPROQUE DE QUELQUES SUBSTANCES DE CROISSANCE DANS LA CULTURE DE TISSU DE TOPINAMBOUR (HELianthus TUBerosus L. VAR. 'VIOLET') II LE COMPORTEMENT DU TISSU

ZOJA KULESCHA

Botanisch Laboratorium, Leiden

SUMMARY

The influence of the culture medium on the explants of Jerusalem artichoke was studied.

The concentration of the growth substances in the medium was 1 ppm IAA and NAA and 0.1 ppm 2,4-D. Moreover, labelled auxins were added: IAA-1-¹⁴C, IAA-2-¹⁴C, (IAA-2)-¹⁴C, NAA-1-¹⁴C and 2,4-D-1-¹⁴C.

Eight hours extraction of the tissue by methanol at 4°C using a magnetic stirrer gave the best results. It was proved that the growth substances were absorbed and fixed in the tissue as whole molecules. The quantity of the fixed degraded molecule was not significant.

One hour after absorbing the IAA the substance was incorporated into the tissue. It took 2-3 hours before NAA was incorporated and 48 hours before 2,4-D was fixed. This proves that in the tissue an adaptation process had to take place before the auxin could be incorporated.

The next problem to be studied is how the incorporated substance will be used after transfer of the tissue to a medium without auxins.

1. INTRODUCTION

Dans la première partie de ce travail (KULESCHA 1970) j'ai constaté que les cultures de Topinambour absorbent une partie très importante des substances de croissance pendant les premiers jours qui suivent leur mise en culture. La question qui se pose maintenant est de savoir comment les tissus métabolisent ces substances absorbées.

De nombreux travaux portant sur cette question ont déjà été effectués avec des segments de racines ou de tiges provenant de plantes diverses. ANDREAE (1967) a mis à incuber des racines de Pois dans l'acide 3-indolyl-acétique (AIA), et il a identifié dans l'extrait de tissu comme dérivé de l'AIA uniquement de l'acide indolyl-aspartique (AIAsp). Par contre, lorsqu'on utilise l'hypocotyle de Pois (ZENK 1962) la tige de *Coleus* (VEEN 1966) ou le coleoptile de Blé (KLÄMBT 1961) il est possible d'identifier dans l'extrait un très grand nombre de dérivés de l'AIA.

Il serait intéressant de comparer le métabolisme des substances de croissance des tissus de Topinambour avec celui des tissus mentionnés précédemment. En effet le tubercule de Topinambour provient d'un bourgeon situé sur la partie enterrée de la tige. Il se développe directement au contact de cette tige chez la variété que j'ai utilisée (COURDROUX 1967). Etant donné d'autre part que ces tissus ne peuvent se développer *en vitro* que sur un milieu contenant une auxine,

il était donc possible de comparer l'utilisation de substances de croissance de structure très différente.

2. METHODES

2.1. Culture

Les tissus de Topinambour ont été cultivés selon la méthode décrite précédemment (KULESCHA 1970). Pour des raisons pratiques le milieu était dépourvu de gélose – sauf dans un cas mentionné plus loin. Les récipients posés sur un agitateur rotatif Brunswick étaient maintenus à l'obscurité à 23°. Les substances utilisées marquées au ^{14}C furent les suivantes: acide 3-indolyl-acétique (AIA), acide α -naphthyl-acétique (ANA), acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D). (Pour les concentrations utilisées voir 2.2).

Ces substances furent marquées de la façon suivante: AIA dans le carboxyle (AIA-1- ^{14}C), AIA dans le méthyle (AIA-2- ^{14}C), AIA dans le noyau sur le carbone 2 [(AIA-2)- ^{14}C], ANA et 2,4-D tous deux dans carboxyle (ANA-1- ^{14}C et 2,4-D-1- ^{14}C). Tous ces produits furent fournis par Amersham (Grande Bretagne) sauf (AIA-2)- ^{14}C livré par le C.E.A. (France).

La durée de la culture fut de 1, 2, 3, 6, 12 et 24 heures et parfois de plusieurs jours.

2.2. Extraction des tissus

J'ai comparé le pouvoir "extracteur" de l'éther et du méthanol. L'extraction était poursuivie jusqu'à récupération complète de toutes les désintégrations par minute (dpm) absorbés. Le procédé était le suivant:

1. extraction à l'aide d'un agitateur magnétique soit par l'éther soit par le méthanol pendant huit heures à la température de 4°;
2. après décantation, le tissu est de nouveau extrait par le méthanol pendant 16 heures à 24°;
3. après décantation du deuxième solvant, extraction par la NaOH (2N) pendant 6 jours à 24°, toujours à l'aide d'un agitateur.

Le *tableau 1* résume les résultats.

L'examen du tableau 1 montre que la meilleure extraction est obtenue avec le méthanol, après 8 heures d'agitation à 4°. Le nombre de dpm récupéré par la suite est insignifiant. En outre la chromatographie de cette première fraction est représentative de l'extrait total.

Un autre problème a consisté à déterminer la concentration d'auxine permettant l'extraction d'une quantité de dpm suffisante.

Pour cela j'ai cultivé des tissus de Topinambour sur un milieu contenant 10 et 1 mg d'AIA par litre. Les résultats sont illustrés par la *figure 1*.

L'examen de cette figure nous montre qu'il est préférable d'utiliser une concentration de 1 mg. En raison de l'activité du 2,4-D (RAOUL & GAUTHERET 1947) la concentration la plus favorable est seulement de 0.1 mg/l.

Tableau 1. Nombre de dpm de AIA-2-¹⁴C récupérés dans les diverses fractions. Dans chaque cas deux lots de cultures d'âge identique sont extraits soit par l'éther soit par le méthanol. La suite de l'extraction est identique pour les deux lots. Concentration: 1 mg/l. Nombre de dpm: 1.180.000. Poids initial moyen d'un lot de culture: 540 mg.

Durée de la culture en jours	1	2	3	4	5	6
Poids de la culture en mg	610	580	680	630	690	720
Dpm restés dans le milieu	1.062.500	1.060.000	990.000	970.000	910.000	920.000
Dpm dans le KOH	630	700	900	950	1.000	900
Extrait éthétré 8 heures à 4°C	6.000		2.000		3.100	
Extrait au méthanol 8 h. à 4°C		21.000		48.800		79.000
Extrait au méthanol						
16 h à 24°C	19.000	8.000	6.700	9.300	92.000	24.000
Extrait au NaOH						
2N 6 jrs à 24°C	5.000	3.000	13.000	4.000	14.000	3.500
Nombre total de dpm récupéré	1.093.130	1.092.700	1.012.600	1.033.050	1.020.100	1.027.400

2.3. Chromatographie des substances extraites

Tous les extraits ont été chromatographiés sur couche mince de gel de silice G par le mélange solvant: isopropanol, ammoniaque, eau (10:1:1). On peut obtenir une autoradiographie en appliquant sur ce chromatogramme pendant

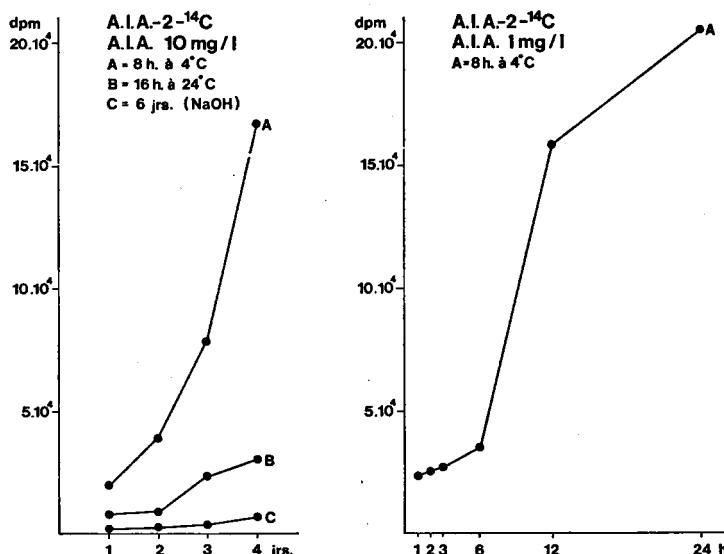


Fig. 1. Comparaison entre les quantités de dpm extraites des tissus cultivés sur un milieu gélosé additionné de 10 mg/l d'AIA et sur milieu liquide contenant 1 mg/l d'AIA. La quantité d'AIA-2-¹⁴C est dans les deux expériences de l'ordre de 1,2.10⁶ dpm.

A = extraction au méthanol pendant 8 heures à 4°.

B = extraction au méthanol pendant 16 heures à 24°.

C = extraction par du NaOH 2N pendant 6 jours à 24°.

huit jours un film de Kodirex, ce qui permet de localiser les substances radioactives extraites du tissu (VEEN 1966).

3. RESULTATS

3.1. Acide 3-indolyl-acétique

3.1.1. AIA-1-¹⁴C

En incorporant de l'AIA, marqué dans le carboxyle, on extrait uniquement, après 1 heure de culture, une substance dont le Rf correspond à celui de l'AIA: toute la radioactivité extraite se trouve dans ce corps. Après deux heures de culture une deuxième substance radioactive est extraite dont le Rf est égal à 0 (A) et après trois heures une troisième substance au Rf correspondant à celui de l'AIAsp: le rapport entre A, AIAsp et AIA est 21:13:66. Après 24 heures ce rapport devient 26:71:3. Ces rapports permettent de calculer les quantités absolues (*figure 2*).

L'examen de la figure 2 montre une augmentation de l'AIA au début de la culture, puis une diminution; les autres substances augmentent constamment, en particulier l'AIAsp.

Vu la place du ¹⁴C dans la molécule on peut en conclure que toutes ces substances extraites contiennent la molécule entière d'AIA.

3.1.2. AIA-2-¹⁴C

Si l'AIA est marqué dans le méthyle on obtient, dans les mêmes conditions de culture que précédemment, un graphique tout à fait comparable (*figure 3*). Mais on observe en outre l'apparition d'autres corps radioactifs; le calcul

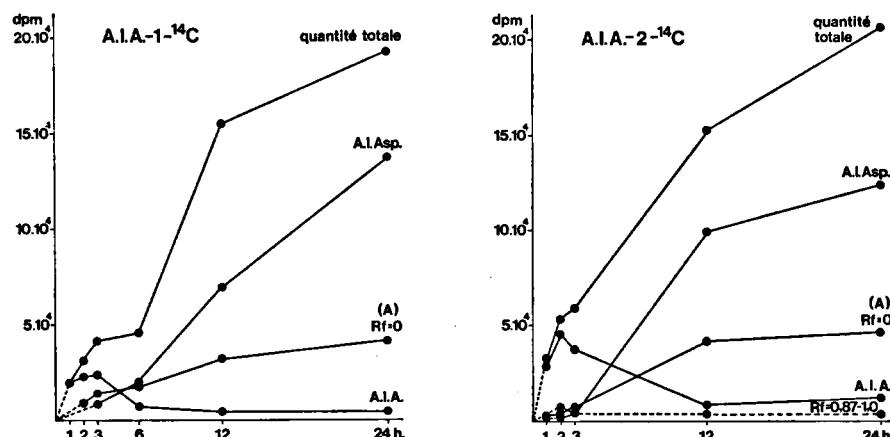


Fig. 2 et 3. Evolution en fonction du temps de culture des substances radioactives extraites des tissus ayant reçu soit (à gauche fig. 2) 1 mg/l d'AIA marqué sur le carboxyle (1.5×10^6 dpm) soit (à droite fig. 3) 1 mg/l d'AIA marqué sur le méthyle (1.2×10^6 dpm).

montre que leur concentration est insignifiante par rapport à celle des trois premières substances.

Le produit de dégradation, dont le Rf est compris entre 0.87 et 1.0, intervient également ici (KULESCHA 1970). Toutefois la quantité qu'on peut identifier dans le tissu reste toujours inférieure aux autres produits extraits. Il s'accumule surtout dans le milieu.

Etant donné les modifications qui interviennent durant les premières heures de culture, il m'a semblé utile de comparer de nouveau les deux solvants éther et méthanol. Les résultats sont résumés dans le *tableau 2*.

L'examen du tableau 2 montre que l'on peut extraire à l'éther au cours des 3 premières heures de la culture autant de dpm qu'avec le méthanol. Après chromatographie de ces extraits on constate seulement la présence de l'AIA ainsi que d'une petite quantité du produit de dégradation. Il est donc évident que les autres corps formés au cours des 3 heures sont susceptibles de libérer de l'AIA, ce qui n'est plus possible lorsque le temps de culture se prolonge.

3.1.3. (AIA-2)-¹⁴C

Lorsque l'AIA est marqué dans le noyau on observe un processus tout à fait comparable à celui de l'AIA marqué dans le méthyle.

Ces expériences permettent de conclure que l'AIA est surtout absorbé et fixé dans son intégrité.

Un autre fait doit être signalé: dans toutes ces expériences la perte du ¹⁴CO₂ a été réduite au minimum en utilisant un dispositif spécial (KULESCHA 1970). La quantité de ¹⁴CO₂ récupérée varie selon la place du ¹⁴C: en utilisant AIA-1-¹⁴C elle est de 100 à 300 fois supérieure à celle libérée par l'AIA-2-¹⁴C. En utilisant l'(AIA-2)¹⁴C la quantité de ¹⁴CO₂ est peu importante, mais elle augmente au

Tableau 2: Nombre de dpm d'AIA-2-¹⁴C récupéré dans les diverses fractions. Une comparaison a été faite de deux lots de culture ayant été en contact avec le milieu durant un nombre d'heures identiques. L'extraction au méthanol pendant 16 heures a été supprimée. Concentration: 1 mg/l. Nombre de dpm 1.250.000. Poids initial moyen d'un lot de culture 640 mg.

Durée de la culture en heures	1		2		3		12	
	éther	méthanol	éther	méthanol	éther	méthanol	éther	méthanol
Poids frais en mg	760	700	700	720	700	740	680	700
Dpm restés dans le milieu	1.224.000	1.205.000	1.200.000	1.200.000	1.150.000	1.170.000	1.040.000	1.031.000
Dpm dans KOH	1.750	1.600	700	1.200	500	500	1.000	900
Extraction 8h à 4°C	23.400	20.000	28.000	33.000	34.000	30.000	7.400	103.000
Extraction 6 jrs au NaOH (2N)	8.000	7.000	9.000	12.000	14.000	22.000	255.100	45.000
Nombre total de dpm récupéré	1.267.150	1.233.600	1.237.700	1.246.200	1.998.500	1.222.700	1.303.500	1.179.900

cours de la culture ce qui indiquerait l'ouverture du noyau ainsi que la rupture de la chaîne latérale.

Selon PILET (1964) la décarboxylation interviendrait en premier lieu.

La décarboxylation de l'ANA-1- ^{14}C est beaucoup moins importante que celle de l'AIA-1- ^{14}C et celle du 2,4-D-1- ^{14}C est à peine décelable.

3.2. ANA-1- ^{14}C

En suivant le même procédé de culture et d'extraction, ce n'est qu'après 3 heures que l'on observe sur les autoradiographies l'apparition d'une deuxième substance radioactive. Cette substance correspondrait à l'ANAsp. Une troisième substance (N) apparaît par la suite.

Le même procédé de calcul permet d'illustrer les résultats par la *figure 4*. On observe également une augmentation de l'ANA libre aux cours des premières heures, puis diminution, la quantité d'ANAsp augmente alors rapidement. La concentration de N reste insignifiante. Ces résultats me permettent de conclure qu'ici également la molécule entière d'ANA est absorbée et fixée.

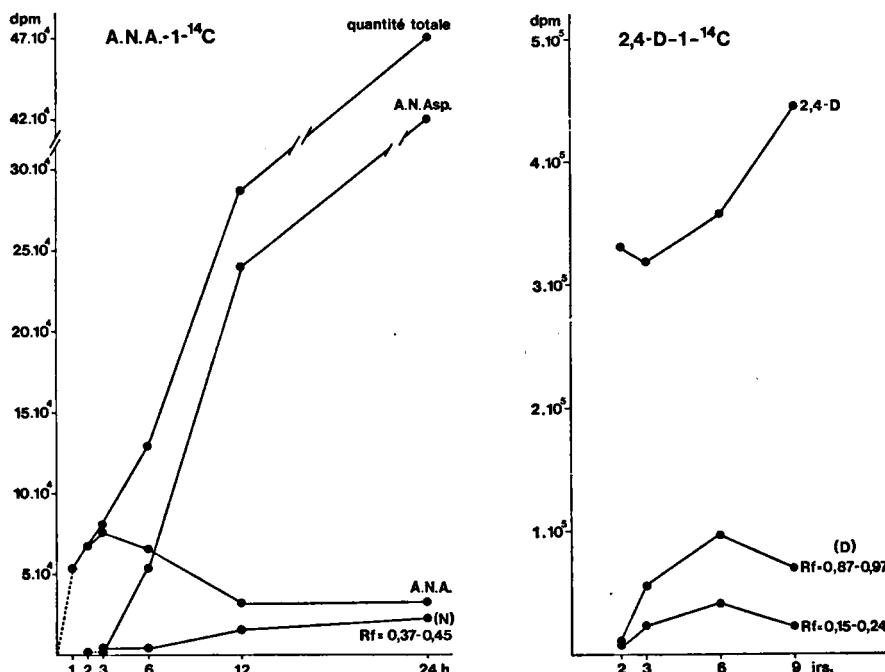


Fig. 4 et 5. Evolution en fonction du temps de culture, des substances radioactives extraites de tissus ayant reçu soit (à gauche, fig. 4) 1 mg/l d'ANA marqué (1.2×10^6 dpm) soit (à droite, fig. 5) 0.1 mg/l de 2,4-D marqué (1×10^6 dpm).

3.3. 2,4-D-1-¹⁴C

Ce n'est qu'après 48 heures de culture que l'on observe dans les extraits une substance autre (D) que le 2,4-D suivie d'une troisième. Mais la concentration du 2,4-D reste toujours supérieure à celle des autres substances, même après 9 jours de culture (figure 5).

Une comparaison entre extraction à l'éther et au méthanol après 3 jours donne des résultats identiques.

La figure 6 résume l'ensemble des expériences.

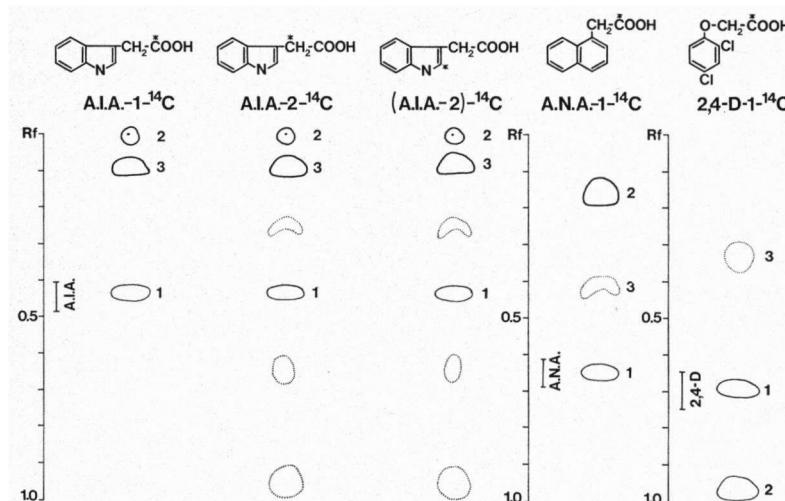


Fig. 6. Schéma des autoradiographies des extraits des tissus ayant reçu pendant plusieurs heures (ou plusieurs jours) différentes auxines. Les numéros indiquent l'ordre dans lequel les substances apparaissent sur le chromatogramme. En pointillé, les substances dont la quantité reste insignifiante par rapport aux autres produits.

4. CONCLUSIONS

Les travaux que je viens de présenter montrent que les tissus de Topinambour provenant du rhizome peuvent métaboliser des substances de croissance de structure très diverses: AIA, ANA, 2,4-D. En outre, le mécanisme ressemble à celui observé sur les racines de *Pisum sativum* (ANDREAE 1967; SCOTT & MORRIS 1970), bien que le rhizome de Topinambour n'ait pas la même origine morphologique.

Dès la mise en culture, les substances de croissance pénètrent dans le tissu. Mais ce n'est qu'après l'absorption d'une certaine masse que les phénomènes de transformation interviennent. Une fois le processus mis en route il semble exister un certain équilibre entre les différents corps formés. Ceci concorde avec

les observations d'ANDREAE (1967), CRAKER et coll. (1970), VEEN (1966) et ZENK (1962).

La vitesse du métabolisme dépend de la substance utilisée. Une heure après le début de la pénétration, l'AIA est déjà incorporé dans d'autres molécules. Les tissus possèdent donc déjà après une heure le mécanisme ou les enzymes nécessaires. En ce qui concerne l'ANA, 2 à 3 heures sont nécessaires. Le processus se poursuit ensuite régulièrement. Le tissu devrait donc déjà s'adapter avant toute incorporation. Quant au 2,4-D, il faut attendre 48 heures avant d'observer une fixation qui, en outre, reste très faible pendant les jours qui suivent. L'adaptation est donc lente.

L'ordre dans lequel les produits sont formés semble bien établi; on peut identifier d'abord que de l'AIA, puis le produit A au $R_f = 0$, puis l'AIAsp.

Des produits possédant le même R_f ont également été identifiés par d'autres chercheurs (ANDREAE 1967, VEEN & JACOBS 1969). C'est l'AIAsp qui est formé avant la substance A dans le travail d'ANDREAE (1967). Pour VEEN & JACOBS (1969), les deux substances existent déjà au moment de l'extraction, mais dans les parties jeunes de la plante il y a relativement beaucoup plus de substance A que dans les parties agées.

Pendant toute la durée de l'expérience le tissu reste au contact avec le milieu contenant la substance de division; il serait peut être intéressant de transférer les tissus, après un temps plus ou moins long, sur un milieu dépourvu d'auxines afin de voir comment évoluent les produits primitivement formés.

Des travaux ultérieurs permettraient peut-être de préciser tous ces problèmes.

REMERCIEMENTS

L'auteur remercie Monsieur le Professeur Karstens ainsi que Monsieur le Professeur Veldstra pour leur intérêt manifesté au cours de ce travail.

Elle remercie également Mademoiselle van Laar pour son assistance technique et Mademoiselle Richez pour la correction du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREAE, W. A. (1967): Uptake and metabolism of indoleacetic acid, naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by pea root segments in relation to growth inhibition during and after auxin application. *Canad. Journ. Bot.* **45**: 737-754 .
- COURDURAUX, J. C. (1967): Étude du mécanisme physiologique de la tubérisation chez le topinambour (*Helianthus tuberosus* L.). *Ann. Sci. Natur Bot. sér.* **8**: 215-356.
- CRAKER, L. E., A. V. CHADWICK & G. R. LEATHER (1970): Abscission. Movement and conjugation of auxin. *Plant Physiol.* **45**: 790-793.
- KLÄMBT, H. D. (1961): Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. III. Stoffwechselprodukte der Naphthyl-1-Essigsäure und 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure und der Vergleich mit jener der Indol-3-Essigsäure und Benzoesäure. *Planta (Berl.)* **57**: 339-353.
- KULESCHA, Z. (1970): Influence réciproque de quelques substances de croissance dans la culture de tissu de Topinambour (*Helianthus tuberosus* L. var. Violet). I. Le comportement du milieu de culture. *Acta Bot. Neerl.* **19**: 637-645.
- MORRIS, D. A., R. E. BRIANT & P. G. THOMSON (1970): The transport and metabolism of ^{14}C -labelled indoleacetic acid in intact pea seedlings. *Planta (Berl.)* **89**: 178-197.

- PILET, P. E. (1964): Auxin transport in roots: *Lens culinaris*. *Nature (London)* **204**: 561-562.
- RAOUL, Y. & R. J. GAUTHERET (1947): Action de l'acide naphthoxyacétique et de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique sur le développement des tissus de Carotte et de Topinambour. *C. R. Soc. Biol.* **141**: 129-131.
- SCOTT, R. C. & R. O. MORRIS (1970): Quantitative distribution and metabolism of auxin herbicides in roots. *Plant Physiol.* **46**: 680-684.
- VEEN, H. (1966): Transport, immobilization and localization of naphtyl acetic acid-1-¹⁴C in Coleus explants. *Acta Bot. Neerl.* **15**: 419-433.
- VEEN, H. & W. P. JACOBS (1969): Transport and metabolism of indole-3-acetic acid in Coleus petiole segments of increasing age. *Plant Physiol.* **44**: 1157-1162.
- ZENK, M. H. (1962): Aufnahme und Stoffwechsel von α -Naphtyl-Essigsäure durch Erbsen-epicotyle. *Planta (Berl.)* **58**: 75-94.