

INFLUENCE RECIPROQUE DE QUELQUES SUBSTANCES DE CROISSANCE DANS LA CULTURE DE TISSU DE TOPINAMBOUR (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L. VAR. 'VIOLET'). III. COMPORTEMENT DU TISSU APRES TRANSFERT SUR MILIEU DEPOURVU D'AUXINE*

ZOJA KULESCHA

Botanisch Laboratorium, Leiden

SUMMARY

Jerusalem artichoke tissues were cultured for 1-4 days on media containing different labelled auxins (IAA-1-¹⁴C and 2,4-D-¹⁴C) before being transferred to a medium without growth substances. The development of tissues and the fate of the incorporated substances were studied and compared with those of tissues maintained on the same medium throughout.

Explants had absorbed enough IAA in 2 or 3 days to develop like others kept on the original medium. In the case of 2,4-D development of the explants was even better when transferred after 3 days to a medium without auxin.

When IAA was used incorporated radioactivity was found in IAAsp and an unidentified substance A; growth is determined by the ratio of substance A to IAAsp. With 2,4-D label is retrieved as 2,4-D itself as well as another unidentified substance D: here also growth is determined by the ratio of 2,4-D to substance D.

1. INTRODUCTION

Dans la première partie de mon travail (KULESCHA 1970) j'avais constaté que les cultures de topinambour absorbent, pendant les premiers jours qui suivent leur mise en culture, une partie très importante des substances de croissance contenues dans le milieu. J'ai ensuite démontré (KULESCHA 1972) que leur vitesse de métabolisme dépend des substances utilisées: après 1 à 2 heures l'acide 3-indolyl-acétique (AIA) est déjà métabolisé, l'acide α -naphtyl-acétique (ANA) ne l'est qu'après 2 à 3 heures, tandis que pour l'acide, 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D), le phénomène ne débute qu'après 24 à 48 heures.

Les travaux de GAUTHERET (1966) avec le topinambour ont montré qu'en cinq jours, le tissu absorbe suffisamment d'ANA pour pouvoir continuer son développement en l'absence de cette substance.

D'autre part NITSCH & BUI DANG HA (1967) avaient constaté qu'après deux jours, les tissus de tabac avaient métabolisé suffisamment de kinétine pour permettre un développement complet.

* Cet article est dédié à Monsieur le Professeur Karstens auquel j'exprime toute ma reconnaissance.

En comparant mes observations avec celles de Gautheret et de Nitsch et Bui Dang Ha, il m'a paru intéressant d'approfondir le métabolisme auxinique des tissus de topinambour. Dans ce but j'ai analysé parallèlement des fragments maintenus sur milieu avec auxine et des fragments transférés sur milieu dépourvu de substances de division.

2. METHODES

2.1. Cultures et extraction

J'ai principalement travaillé avec la variété Violet et pour quelques expériences préliminaires avec la variété plus hâtive A1-617.

Le milieu et la méthode de culture ont été décrits dans les travaux précédents (KULESCHA 1970, 1972). Mais vu les résultats obtenus je n'ai étudié que le comportement de deux auxines: l'AIA (1 mg/l) et le 2,4-D (0,1 mg/l) marquées ou non au niveau du carboxyle.

La durée des expériences variait entre 15 et 19 jours et lors des prélèvements les tissus étaient extraits au méthanol (KULESCHA 1972). Dans le cas des fragments transférés, les cultures restaient de 1 à 4 jours en contact d'un milieu additionné d'auxine. Afin d'éliminer toute trace superficielle de substances de division le transport des fragments était précédé d'un lavage à l'eau stérile. Pour connaître la masse d'auxine absorbée par les tissus et seule alors disponible, on déterminait la radioactivité résiduelle du milieu ainsi que celle de la potasse (KULESCHA 1970). Celles-ci étaient de nouveau déterminées lors des prélèvements des fragments (8 et 15 jours après le transfert) et si la radioactivité était importante on extrayait à l'éther après acidification.

2.2. Chromatographie

L'extrait était évaporé sous azote, puis chromatographié sur couche mince par le mélange isopropanol:ammoniaque:eau (10:1:1). La localisation des substances radioactives se faisait après application d'un film Kodirex (KULESCHA 1972).

La chromatographie sur plaque de silice 60 F-254 donne une bonne séparation des produits du métabolisme du 2,4-D. En ce qui concerne l'AIA il a été nécessaire de comparer les chromatographies exécutées sur gel de silice G, gel de silice 60 F-254 (gel) et terre siliceuse F-254 (gur). Les résultats obtenus avec gel de silice G et gel de silice 60 F-254 sont tout à fait comparables. Mais tandis que sur ces derniers seules trois substances peuvent être mises en évidence (A: Rf 0; AIAsp (acide indole-acétyl-aspartique): Rf 0,05; AIA: Rf 0,50), la chromatographie sur gur permet d'en localiser quatre (A₁: Rf 0,09-0,14; A₂: Rf 0,32-0,40; AIAsp: Rf 0,64-0,70; AIA Rf 0,95-1,0). D'après les calculs des radioactivités, j'ai pu conclure que A était séparé en deux substances A₁ et A₂. L'AIA sur ce dernier support a cependant l'inconvénient d'avoir un Rf élevé et les valeurs trouvées sont souvent trop grandes en raison des impuretés ce qui fausse les rapports entre les substances.

Tableau I. AIA-1-¹⁴C présent dans les diverses fractions: milieu, potasse et fragments (en dpm).
 La quantité globale théorique absorbée par chaque lot de cultures est obtenue en déduisant de la quantité initiale (milieu: 1.417.930 dpm + potasse: 28.070 dpm) les valeurs trouvées dans le milieu et dans la potasse au moment du transfert. (Concentration en AIA: 1 mg/l; poids initial moyen d'un lot de culture 400: mg; variété de topinambour: A 1-617.)

	1		2		3	
	8 ↓		9 ↓		10 ↓	
âge (jours)	450		460		550	
poids (mg)	827.500	946.050	666.760	592.300	456.340	517.900
milieu	322.200	254.900	358.700	429.900	402.350	332.450
KOH	231.130		294.730		394.560	
extrait (tissu)	296.300	245.050	420.540	423.800	587.310	595.650
absorption théorique		276.650		425.790		534.710
âge (jours)		8 ↓		9 ↓		10 ↓
poids (mg)	870	660	900	950	820	780
milieu	50.490	1.460	49.540	6.550	49.570	15.840
KOH	538.050	2.000	489.150	1.950	608.150	-
extrait (tissu)	844.980	183.530	788.110	271.580	714.980	566.930
absorption théorique	857.460		907.310		788.280	
âge (jours)		15 ↓		16 ↓		17 ↓
poids (mg)	1.120	840	920	1.130	1.050	1.340
milieu	41.020	2.790	53.350	8.530	42.190	8.930
KOH	653.490	2.670	722.900	2.330	505.950	1.680
extrait (tissu)	679.430	161.470	566.820	310.870	834.200	444.860
absorption théorique	751.490		669.750		897.860	

3. RESULTATS

3.1. L'Acide 3-indolyl-acétique

En procédant suivant la méthode décrite, on obtient les résultats résumés dans le *tableau I*. L'examen de ce tableau montre que les tissus restés pendant toute la durée de l'expérience en contact avec l'auxine, absorbent cette substance d'une façon continue. La croissance des tissus transférés après un jour est ralentie tandis que celle des tissus transférés après deux ou trois jours semble normale (*tableaux I et II*).

Les différences observées dans le *tableau II* pour les cultures ayant changé de milieu après 2, 3 et 4 jours ne sont pas significatives (chaque chiffre correspond à une moyenne de 10 lots).

Lors des prélèvements ayant lieu 8 et 15 jours après le transfert, des substances marquées semblent avoir diffusé dans le milieu mais leur quantité est trop insignifiante pour permettre leur identification.

Le rapport calculé entre les diverses substances extraites par le méthanol, que les cultures soient maintenues sur milieu avec auxine ou transférées, change au cours de la culture. L'AIAsp prépondérant durant les premiers jours diminue en faveur de la substance A (A_1 et A_2) (en début de culture: A, AIAsp, AIA: 37:62:1 et en fin de culture 85:15:0). La quantité d'AIA est tout à fait insignifiante. Les résultats sont identiques avec les deux variétés de topinambour.

La *figure 1* résume ces observations et montre en outre que, lorsque la croissance est faible, comme chez les cultures n'ayant subi qu'un jour l'action de l'auxine, le rapport change rapidement en faveur de la substance A (A_1 et A_2). Lorsque la croissance est comparable à celle des tissus témoin, le rapport est également comparable.

3.2. Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

Des recherches comparables ont été effectuées avec le 2,4-D marqué ou non au niveau du carboxyle.

Après 1 et 2 jours de culture la quantité absorbée est insignifiante (*tableau III*). L'examen de ce tableau montre que les tissus qui sont restés sur le milieu

Tableau II. Croissance obtenue après 19 jours de lots de 5 fragments de topinambour cultivés sur un milieu contenant 1 mg/l d'AIA et transférés (ou non) après 1, 2, 3 ou 4 jours sur un milieu dépourvu d'auxine.

(Poids initial moyen des fragments: 400 mg par lot; résultats en mg; variété de topinambour: Violet.)

	1ère expérience	2ème expérience
Témoin (0 auxine)	687	
Transfert: 1 jour	1.044	
Transfert: 2 jours	1.328	1.386
Transfert: 3 jours	1.332	1.473
Transfert: 4 jours		1.365
Non transférés	1.721	1.605

Tableau III. 2,4-D-1-¹⁴C présent dans les diverses fractions: milieu, potasse et fragments (en dpm). La quantité globale théorique absorbée par chaque lot de cultures est obtenue en déduisant de la quantité initiale (milieu: 963220 dpm, potasse: 0 dpm) les valeurs trouvées dans le milieu et dans la potasse au moment du transfert. (Concentration en 2,4-D: 0,1 mg/l; poids initial moyen d'un lot de cultures: 400 mg; variété de topinambour: Violet.)

	1		2		3	
âge (jours)						
poids (mg)	390	400	500			
milieu	925.530	903.270	942.890	911.270	919.840	903.590
KOH	-	-	-	480	450	350
extrait (tissu)	23.520	44.040	-	44.040	-	-
absorption théorique	37.690	49.950	20.330	51.470	42.930	59.280
âge (jours)		8 ↓			9 ↓	
poids (mg)	760	805	810	810	750	850
milieu	178.600	17.140	174.950	174.950	18.750	166.230
KOH	880	-	1.170	1.170	290	18.390
extrait (tissu)	756.060	20.650	758.290	758.290	21.520	716.930
absorption théorique	783.740	787.100	787.100	787.100	-	778.600
âge (jours)		15 ↓			16 ↓	17 ↓
poids (mg)	1.250	720	1.260	1.260	1.460	1.130
milieu	144.670	14.980	186.190	186.190	27.260	51.410
KOH	1.590	-	-	-	-	1.080
extrait (tissu)	778.400	-	811.240	811.240	21.850	700.230
absorption théorique	816.960	777.030	777.030	777.030	21.850	723.220

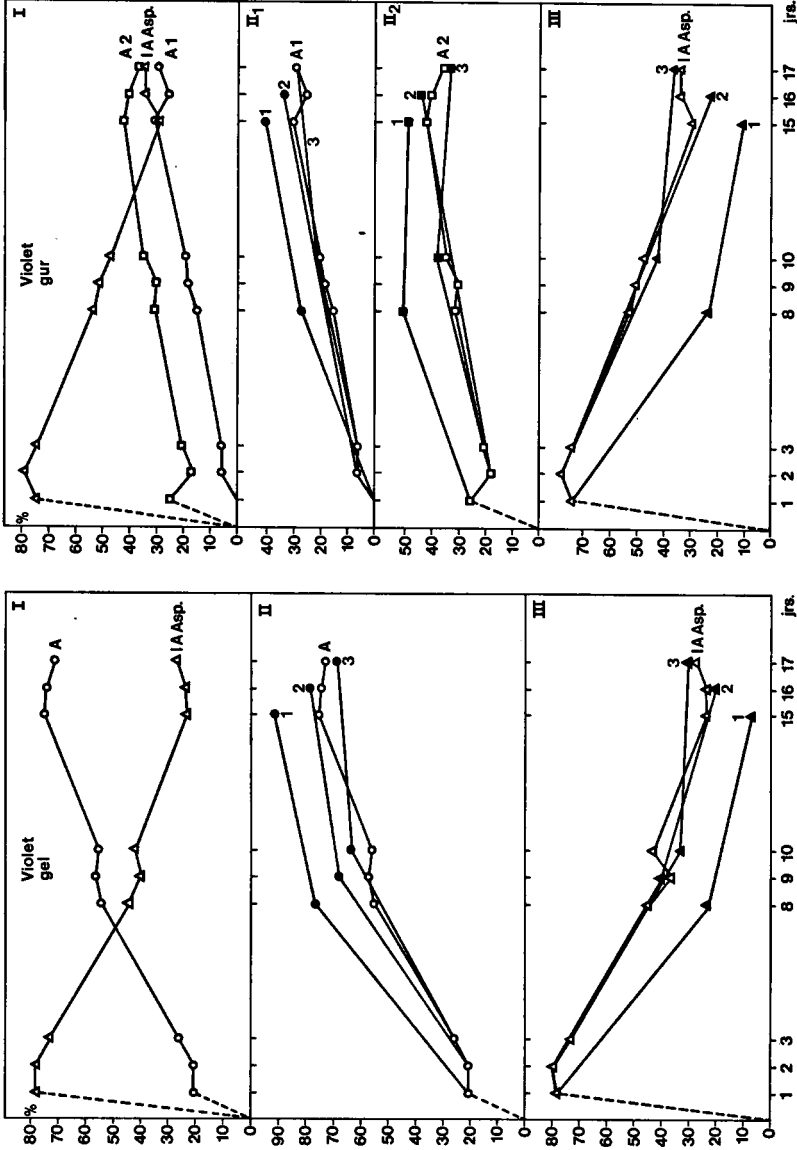


Fig. 1. Evolution (en %) en fonction du temps de culture des substances radioactives extraites des tissus ayant reçu 1 mg/l d'AIA marqué au carboxyle (environ $1,5 \cdot 10^6$ dpm). Chromatographie, à gauche sur "gel"; à droite sur "gur". Variété de topinambour: Violet.

I: Substance A (A_1 et A_2) et AIAsp dans des tissus restés en contact avec le milieu primitif pendant 17 jours;
 II (II_1 et II_2): Substance A (A_1 et A_2) dans les tissus transférés après 1, 2 et 3 jours;
 III: AIAsp dans les tissus transférés après 1, 2 et 3 jours.

contenant du 2,4-D continuent à absorber cette substance mais un équilibre semble s'établir assez rapidement. D'autre part, les milieux de culture primitivement dépourvus d'auxine se marquent d'une façon assez importante au contact des tissus transférés. La substance secrétée a le même Rf que le 2,4-D.

De même la croissance des tissus transférés après 1 ou 2 jours est ralentie tandis qu'ensuite le transfert ne semble pas interférer avec le développement des tissus (*tableaux III et IV*).

Les cultures transférées après trois jours ont une croissance supérieure à celles des cultures restées sur milieu additionné de 2,4-D (chaque chiffre correspond à une moyenne de dix lots).

La chromatographie des extraits révèle en tout premier lieu, la présence de 2,4-D, puis l'apparition d'une substance D et celle d'une troisième substance dont l'Rf correspond à 0,3-0,38 et dont la quantité ne semble pas varier d'une façon significative au cours du développement de la culture (KULESCHA 1972). En poursuivant ces observations durant 17 jours on constate que le rapport entre le 2,4-D et la substance D change également au cours de la culture. D'abord égal à 93:7 il est après 17 jours 28:64 (*figure 2*).

L'examen de la *figure 2* met en évidence un pourcentage de 2,4-D plus important lorsque le développement de la culture est meilleur.

4. CONCLUSION

Ce travail me permet de conclure que les tissus de topinambour sont capables d'utiliser les substances de croissance qu'ils ont métabolisées. En effet les cultures tranférées après 2 ou 3 jours ont une croissance comparable à celle des cultures placées en continu sur auxine bien que la teneur en substance de

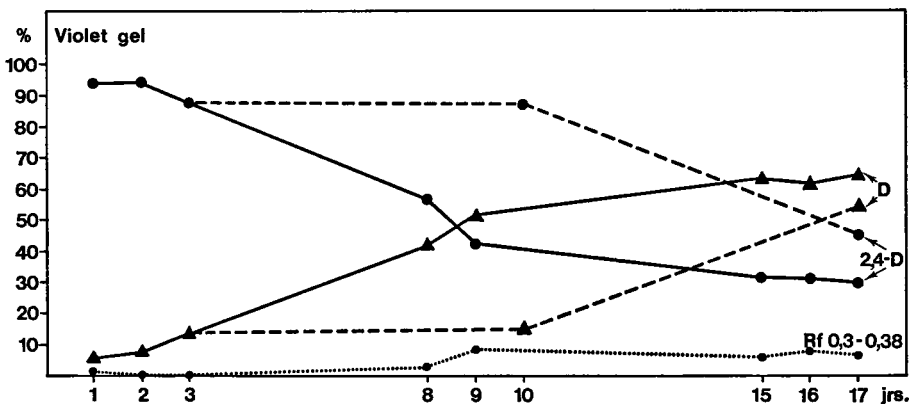


Fig. 2. Evolution (en %) en fonction du temps de culture des substances radioactives extraites des tissus ayant reçu 0,1 mg/l de 2,4-D marqué au carboxyle (environ 10^6 dpm). Chromatographie sur "gel". Les tirets correspondent aux tissus transférés après trois jours. Variété de topinambour: Violet.

Tableau IV. Croissance obtenue après 19 jours de lots de 5 fragments de topinambour cultivés sur un milieu contenant 0,1 mg/l de 2,4-D et transférés (ou non) après 1, 2, 3 ou 4 jours sur un milieu dépourvu d'auxine.

(Poids initial moyen des fragments: 400 mg par lot; résultats en mg; variété de topinambour: Violet.)

	1ère expérience	2ème expérience
Témoin (0 auxine)	687	
Transfert: 1 jour	710	
Transfert: 2 jours	1.110	1.382
Transfert: 3 jours	1.450	1.594
Transfert: 4 jours		1.360
Non transférés	1.122	1.346

croissance soit plus faible (environ la moitié). Deux hypothèses sont possibles:

1. des quantités d'auxine variables, à l'intérieur de certaines limites, provoquent une croissance comparable;
2. l'apport d'auxine au moment de la mise en culture est seul nécessaire au développement de la culture.

D'autres recherches sont indispensables pour pouvoir trancher entre ces deux hypothèses.

Avec le 2,4-D les différences sont encore plus nettes puisque la croissance des fragments est meilleure pour les tissus transférés après trois jours qu'elle ne l'est pour les tissus restés sur le milieu primitif, bien qu'un cinquième seulement de l'auxine ait été absorbé. Les mêmes hypothèses que pour l'AIA doivent être formulées mais il ne faut peut-être pas attacher une trop grande importance à la différence de croissance observée entre les fragments placés dans ces deux conditions. Elle pourrait provenir uniquement de l'emploi d'une concentration un peu trop élevée du 2,4-D.

Lorsque les tissus restent en contact avec l'AIA pendant tout leur développement, la plus grande partie est absorbée, mais une faible quantité reste toujours présente dans le milieu et de plus le milieu sans auxine sur lequel les tissus ont été repiqués devient faiblement radioactif. L'équilibre qui existe dans le cas des tissus restés sur auxine pourrait s'expliquer d'une façon identique.

En utilisant le 2,4-D le même phénomène est observé mais la quantité qui reste dans le milieu est plus élevée de même les tissus transférés marquent plus fortement les milieux dépourvus d'auxine. Cette substance marquée a été identifiée au 2,4-D.

Dès le début de leur mise en culture les tissus métabolisent rapidement l'AIA: il y a formation de la substance A (A_1 et A_2) puis de l'AIAsp. Ce dernier augmente d'abord rapidement mais après un certain temps de culture le pourcentage de la substance A prend une valeur supérieure à celle de l'AIAsp et ce changement est d'autant plus rapide que la croissance est plus faible. L'utilisation d'une concentration d'auxine plus forte (10 mg/l) a permis de constater que le pourcentage de l'AIAsp restait élevé et parallèlement la croissance était nettement plus importante. A l'inverse en utilisant une concentration dix fois

plus faible (0,1 mg/l) le pourcentage de la substance A est plus élevé et la croissance est plus faible.

Je n'ai pu identifier l'AIA, ou seulement à l'état de trace, dans les extraits des tissus cultivés sur cette substance. Il semble donc que le développement du tissu ne soit pas dû directement à cette substance mais aux produits qui en dérivent. L'identification de la substance A (A_1 et A_2) s'impose donc.

Dans le cas du 2,4-D, deux substances semblent jouer un rôle important au cours du développement: le 2,4-D lui-même et la substance D qui pourrait être le 2,4-DAsp (acide 2,4-dichlorophenoxy acetyl aspartique) identifié par FEUNG et Coll. (1972) et KLÄMBT (1961) bien que le Rf du 2,4-DAsp ne corresponde pas à celui de la substance D, que j'ai mise en évidence. KLÄMBT (1961) a pu également identifier d'autres produits de "conjugaison" avec le 2,4-D. Une identification de D s'impose également. Comme pour l'AIA le pourcentage de D augmente au cours de la culture. Si le transfert a lieu après 3 jours, cette évolution est plus lente et la croissance est meilleure. Ici le 2,4-D "libre" semble déterminer la croissance des tissus.

En résumé, le tissu de topinambour se comporte envers les auxines utilisées comme le tissu de tabac envers la kinétine (NITSCH & BUI DANG HA 1967). Le processus qui détermine le développement des tissus est foncièrement différent suivant que l'on utilise l'AIA ou le 2,4-D.

REMERCIEMENTS

L'auteur adresse ses plus vifs remerciements à Monsieur van Vliet pour son assistance technique si efficace. Elle remercie également Monsieur Hock pour la confection des dessins et Mademoiselle Richez pour la correction du manuscrit.

BIBLIOGRAPHIE

- FEUNG, Ch.-S., R. H. HAMILTON, F. H. WITHAM & R. O. MUMMA (1972): The relative amounts and identification of some 2,4-dichlorophenoxyacetic acid metabolites isolated from soybean cotyledon callus cultures. *Plant Physiol.* **50**, 80-86.
- GAUTHERET, R. J. (1966): Recherches sur la rhizogenèse des tissus de topinambour cultivés in vitro. *Les phytohormones et l'organogenèse*. Liège: 83-94.
- KLÄMBT, H.-D. (1961): Wachstumsinduktion und Wuchsstoffmetabolismus im Weizenkoleoptilzylinder. III. Stoffwechselprodukte der Naphtyl-1-essigsäure und 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure und der Vergleich mit jener der Indole-3-essigsäure und der 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.
- , (1972): Influence réciproque de quelques substances de croissance dans la culture de tissu de topinambour (*Helianthus tuberosus* L. var. Violet). II. Le comportement du tissu. *Acta Bot. Neerl.* **21**: 77-85.
- NITSCH, J. P. & BUI DANG HA (1967): Effet de l'ordre d'application de l'acide indolyl-3-acétique et de la kinétine sur la division cellulaire. *C. R. Acad. Sci. Paris.* **264** (D): 288-291.