

Évolution, au cours du développement de l'activité peroxydasique racinaire et foliaire dans les cultures de *Spinacia oleracea*

Autor(en): **Xue, Xuang Xing / Bernardini, Nicola**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société**

Band (Jahr): **35 (1982)**

Heft 3

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-740574>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

ÉVOLUTION, AU COURS DU DÉVELOPPEMENT,
DE L'ACTIVITÉ PÉROXYDASIQUE RACINAIRE
ET FOLIAIRE
DANS DES CULTURES DE SPINACIA OLERACEA

PAR

Xuang Xing XUE², Nicola BERNARDINI¹,
Claude PENEL¹, Hubert GREPPIN¹

RÉSUMÉ

L'évolution de quelques paramètres, à savoir: la masse pondérale fraîche, la concentration en protéines, l'activité peroxydasique totale et la proportion entre les fractions acides et basiques des peroxydases ont été mesurées dans des cultures *in vitro* de l'épinard. Le passage de l'état végétatif à l'état floral a été particulièrement examiné sur les racines, l'hypocotyle et les feuilles. On peut associer au changement d'état un certain nombre de particularités existant dans les trois organes considérés.

ABSTRACT

Fresh weight, protein concentration and peroxidase activity were measured in various organs of Spinach grown *in vitro*. These parameters were followed in roots, hypocotyls and leaves during the transition from vegetative to floral state.

INTRODUCTION

Le passage de l'état végétatif à l'état floral dépend, selon les plantes, de nombreux facteurs internes (âge de la plante, hormones, etc.) et externes (via la vernalisation, le thermopériodisme, le photopériodisme, etc.). De nombreux travaux ont mis en évidence le rôle important des corrélations interorganiques (racine, hypocotyle, cotylédon, tige, feuille, bourgeon) par l'intermédiaire de l'action électrochimique, métabolique et hormonale (Chamont *et al.*, 1982; Evans, 1969; Bernier *et al.*, 1981).

¹ Laboratoire de Physiologie végétale, Université de Genève, 3, place de l'Université, CH-1211 Genève 4.

² Académie d'Agriculture de Chine, Beijing.

Gaspar *et al.* (1975) ont insisté sur les relations antagoniques existant entre la formation racinaire et florale et l'évolution des activités peroxydasiques. Des applications pratiques de ces observations ont été suggérées et certaines sont déjà appliquées (Gaspar *et al.*, 1982). Dans cette perspective et à la suite du travail de Lamb (1981), il nous a paru utile de décrire quelques changements physiologiques se produisant chez l'épinard lors du passage de l'état végétatif à l'état floral, aussi bien dans les feuilles que dans l'hypocotyle et la racine. Les recherches de Lamb ayant montré les nombreux inconvénients à mesurer l'activité peroxydasique dans des racines provenant de plantes cultivées dans des conditions non stériles, nous avons adopté le mode de culture *in vitro* et des conditions nous permettant à la fois d'éviter la présence de bactéries ou de blessures des racines, amenant une très forte augmentation de l'activité peroxydasique, indépendante des conditions internes nécessaires au développement de la plante. Parallèlement, nous avons fait une étude histologique rapide des méristèmes caulinaires afin de déterminer le moment du changement d'activité de ces derniers (embryogenèse florale).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Conditions de culture

La germination et la culture des plantes ont été faites en conditions stériles. Les akènes d'épinard (*Spinacia oleracea*, variété Nobel: sélection faite à la Station de Botanique expérimentale du département de Biologie végétale) ont été immergés rapidement dans de l'alcool absolu, puis pendant six minutes dans du NaClO 7,5% (p/v). Après plusieurs rinçages à l'eau distillée, les akènes sont mis à germer, à l'obscurité, dans des boîtes de Petri, à la température de 20° C; ces boîtes contiennent du papier filtre humidifié avec un milieu minéral dont la composition est la suivante (mg/l):

KNO₃ 1000; NH₄NO₃ 1000; Ca (NO₃)₂ · 4 H₂O 500; KH₂ PO₄ 300;
Mg SO₄ · 7H₂O 80; KCl 30; EDTA Na₂ · 2 H₂O 7,4; FeSO₄ · 7H₂O 5,6;
MnSO₄ H₂O 5; ZnSO₄ · 7 H₂O 4; H₃BO₃ 2; KI 0,8; Cu (NO₃)₂ · 3H₂O 0,35;
(NH₄)₆ Mo₇O₂₄ · 4H₂O 0,1.

Le pH a été ajusté à 5,5. La présente composition dérive du milieu de Murashige et Skoog (1962).

Après quarante heures de germination, les plantules ayant une racine de 6 à 8 mm sont repiquées dans des tubes de culture (160 × 29,5 mm) et fermés avec des Cap-O-Tests; ils contiennent 25 ml de milieu minéral agarisé à 0,5% (p/v) avec du Difco Bacto Agar. Cette faible concentration en Agar assure une base de soutien suffisante tout en permettant d'extraire sans dommage les racines du milieu. D'autre part une couche d'Agar (1 mm) à 1%, mélangée à du charbon actif p.a. Merck

dont la concentration est 2% (p/v) a été coulée au-dessus du milieu précédent et déjà figé afin de constituer un écran à la lumière. Les tubes sont d'autre part enveloppés en dessous de cette couche avec du papier noir, ce qui a permis de maintenir les racines en obscurité complète.

Les cultures ont été réalisées à 20° C sous un éclairage continu de 4000 lux (lumière blanche). Les plantules prélevées quarante-huit heures après l'ensemencement ne sont pas repiquées mais gardées telles quelles, à l'obscurité, dans des boîtes de Petri.

Prélèvement des plantes

Lors de chaque prélèvement, les plantes récoltées sont partagées au hasard en trois lots. Les différents organes analysés ont été isolés, pesés, puis broyés à 2° C dans un mortier, en présence d'un tampon phosphate 0,1 M, pH 7 (10 ml/g de poids frais pour les racines et les hypocotyles; 4 ml/g pour les feuilles). Les extraits sont filtrés puis centrifugés pendant dix minutes à 10 000 g. Les surnageants sont alors conservés à -20° C. La teneur en protéines dans les extraits a été déterminée par la méthode de Spector (1978), la γ -globuline de bœuf (Bio Rad) servant de référence. L'activité peroxydasique est déterminée à 20° C dans un tampon phosphate (40 mM) contenant 8 mM de gâïacol et 2 mM d'H₂O₂. L'augmentation de l'absorption à 470 nm est lue au spectrophotomètre après deux minutes.

Les extraits peroxydasiques ont été séparés par focalisation isoélectrique sur des gels d'agarose au moyen d'un appareil Multiphor LKB (300 volts pendant deux heures). Les isoperoxydases ont été détectées par coloration dans un mélange: tampon acétate pH 4,5 — benzidine 0,05% — eau oxygénée 0,02%. Les profils isoperoxydasiques développés sont alors enregistrés à l'aide d'un intégrateur photométrique à enregistrement automatique de type Vernon.

Les apex des plantes ont été fixés pendant vingt-quatre heures dans le mélange suivant: formaldéhyde — alcool — acide acétique (Sass, 1958) et, après inclusion dans la parafine, débités en coupes sériées de 15 micromètres colorées puis colorées à l'hématoxyline de Groat. Les coupes sont ensuite examinées au microscope et des photographies sont faites et développées selon les procédures habituelles.

RÉSULTATS

Notre système de culture a été particulièrement favorable à la croissance des plantes, d'autre part il nous a permis d'obtenir des racines intactes, éliminant ainsi des sources importantes de fluctuations dues aux blessures et à la présence de microorganismes. La figure 1 présente l'évolution du poids frais moyen des organes suivants: racines (R), les deux premières feuilles au-dessus des cotylédons (F₁, F₂), les deux feuilles suivantes (troisième et quatrième feuilles: F₃, F₄). On peut observer,

dès le deuxième jour du semis, des akènes germés dont les racines ont 6 à 8 mm de long; dès lors, le poids frais de ces dernières (valeur moyenne accompagnée de l'écart type) présente une augmentation quasi-linéaire jusqu'au quatorzième jour de culture. Nous constatons ensuite que l'accroissement pondéral se ralentit considérablement. La ramification des racines est observable dès le sixième jour de la culture, au moment où sont macroscopiquement visibles les deux premières feuilles. La masse pondérale fraîche de ces dernières s'élève beaucoup plus rapidement que celle des racines, un ralentissement apparaît entre le quatorzième et le quinzième jour de culture. Les troisième et quatrième feuilles présentent une évolution analogue avec un décalage de cinq jours. La population des plantes cultivées n'est jamais totalement homogène; ainsi au onzième jour de culture, il n'y a que 27% des plantes présentant quatre feuilles, 54% au douzième jour et la totalité au treizième jour de culture. La montaison (à l'état végétatif l'épinard est acaule) est visible dès le vingtième jour et les fleurs mâles dès le vingt-quatrième jour de culture. Auderset (1979),

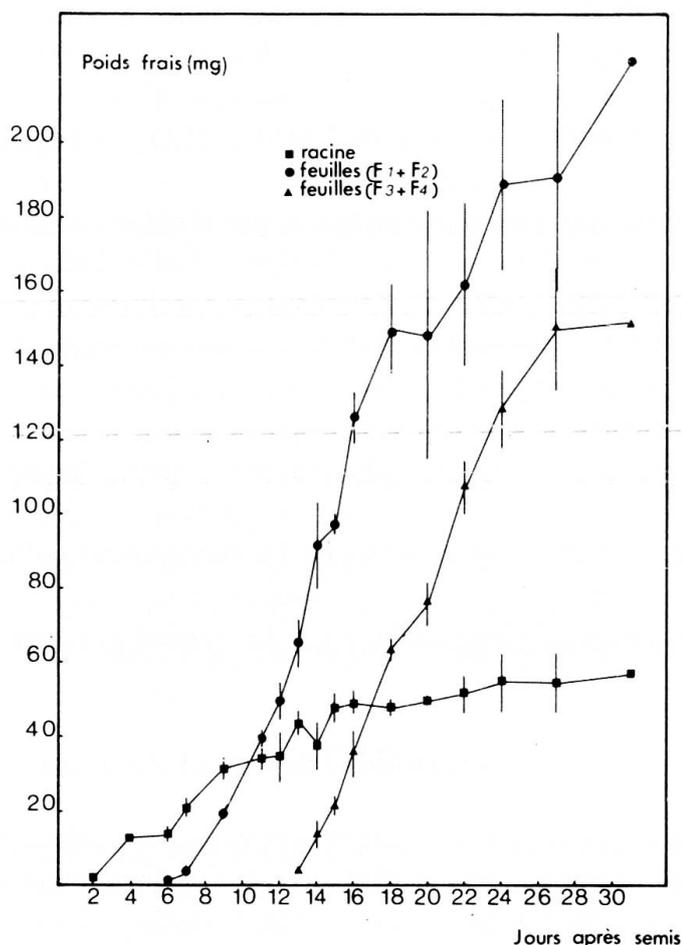


FIG. 1. — Evolution du poids frais de l'hypocotyle, de la racine et des feuilles d'épinards cultivés sous un éclairage continu. Chaque point représente la moyenne de trois mesures avec son écart-type. Les feuilles sont numérotées selon leur ordre d'apparition (F₁, F₂, F₃ et F₄).

Penel (1976), Karege (1981), ont bien mis en évidence la relation existant, chez l'épinard, entre le nombre de feuilles macroscopiquement et microscopiquement visibles, le traitement photopériodique (jours courts, jours longs) et l'acquisition de l'état floral par les feuilles et les méristèmes caulinaires. Quelles que soient les conditions, on observe, dès le stade de six feuilles macroscopiquement visibles atteint, que le méristème est en tout cas évoqué, si ce n'est déjà bien avancé dans l'embryogenèse florale.

L'étude, par voie histologique, des apex d'épinard (cf. figs. 2, 3, 4), nous amène aux conclusions suivantes: dès le quinzième jour de culture, le méristème apical présente une augmentation considérable de sa masse (division cellulaire) et l'on peut déjà observer le début de la montaison; il y a de nombreux bourgeons floraux encore peu différenciés. Par la suite cette différenciation va considérablement s'accélérer pour aboutir à la formation complète de fleurs mâles et femelles. La population examinée n'étant pas exactement synchrone dans son développement (décalage maximum de l'ordre de deux jours), il en résulte que l'induction peut être observée sur des individus âgés de onze jours, quatorze pour d'autres. On peut considérer que pour l'ensemble de la population, la transition se fait au treizième jour et correspond au début du ralentissement de l'accroissement pondéral frais des racines et des deux premières feuilles.

En ce qui concerne les protéines (cf. fig. 5) nous constatons que la chute de la concentration en ces composés est particulièrement rapide et précoce dans la racine



FIG. 2.

Apex d'épinard après 11 jours de culture sous éclairage continu
(rapport hauteur/largeur: 1.00 ± 0.10). Grossissement: 200 x.



FIG. 3.

Apex d'épinard après 13 jours de culture sous éclairage continu
(rapport hauteur/largeur: 1.24 ± 0.16).

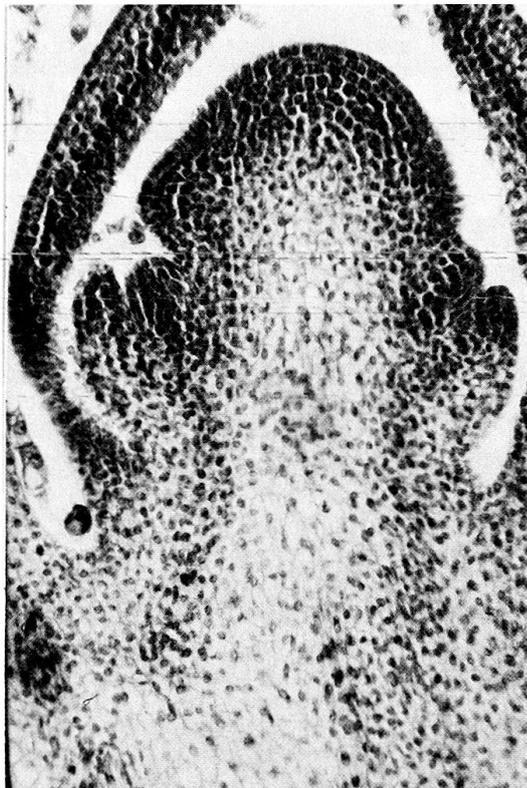


FIG. 4.

Apex d'épinard après 15 jours de culture sous éclairage continu
(rapport hauteur/largeur: 1.95 ± 0.12).

et l'hypocotyle. Ce phénomène est plus tardif dans les deux premières feuilles et débute légèrement avant l'induction florale de l'apex, observée par voie histologique. Etant donné qu'il se passe environ 48 heures (cf. Auderset, 1979) entre la détection histologique de l'induction florale dans le méristème apical et le déclenchement de l'induction dans la feuille (production du « stimulus floral »), on peut donc en conclure que le moment de la décréue de la concentration en protéines dans les deux premières feuilles correspond au moment du passage de l'état végétatif à l'état floral dans ces organes. Elle correspond aussi à l'entrée en vieillissement du système (Fredj et Greppin, 1980). La sénescence débute beaucoup plus tôt dans les racines et l'hypocotyle et ne semble pas, dans ce dernier cas, être en relation directe avec l'induction florale.

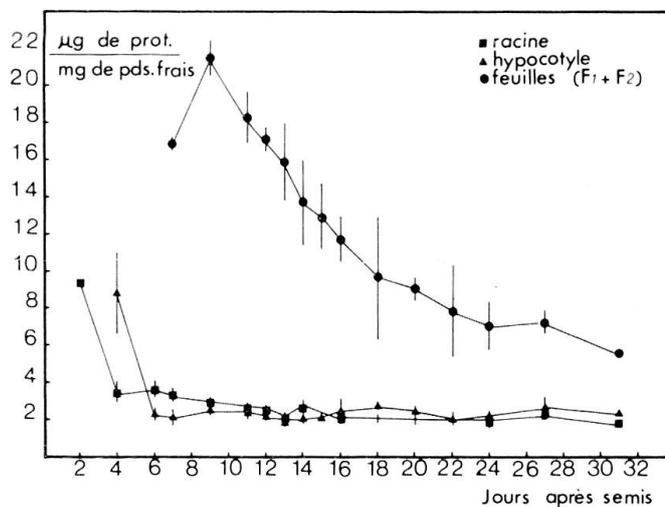


FIG. 5. — Evolution de la teneur en protéines des feuilles (F₁ + F₂), de l'hypocotyle et de la racine d'épinards cultivés sous éclairage continu. Chaque point est la moyenne de trois analyses sur des échantillons différents avec l'écart-type.

Examinons maintenant ce qu'il en est de l'activité peroxydasique totale (cf. fig. 6). Les observations faites sur les deux premières feuilles sont conformes aux données déjà obtenues par Karege *et al.* (1977), à savoir que cette activité est faible et qu'elle diminue régulièrement dans la phase végétative pour atteindre une valeur minimum lors de l'induction florale; ensuite il y a augmentation progressive liée au vieillissement de ces organes. Nous observons, pour l'hypocotyle et la racine, un taux d'activité particulièrement élevé et une évolution, comparée à la feuille, de type antagonique. Alors que l'activité peroxydasique diminue dans les feuilles pendant la phase végétative, elle augmente dans l'hypocotyle et la racine pour atteindre ses valeurs d'activité les plus élevées au moment correspondant au minimum dans les feuilles. Ce point particulier (activité peroxydasique minimum dans les feuilles et maximum dans la racine et l'hypocotyle) correspond au début de l'induction florale. Ce qui se passe après le vingtième jour est plus difficile à interpréter. Il y a d'une

part l'entrée en vieillissement de l'ensemble de la plante, d'où la remontée de l'activité peroxydasique générale; d'autre part le dimorphisme sexuel et la séparation en plantes mâles et femelles peut amener une plus grande hétérogénéité dans les résultats, la composition des populations analysées n'étant pas identique sur ce point.

La comparaison des figures 5 et 6 met bien en évidence une relation antagonique entre la concentration en protéines et le niveau de l'activité peroxydasique: celle-ci est faible quand la concentration en protéines est forte et vice versa (cette relation peut s'expliquer par le fait bien connu de la relation inverse, le plus souvent, entre la concentration en auxines et l'activité peroxydasique). La biosynthèse en RNA et en protéines est forte dans les tissus riches en auxines (Pilet et Gaspar, 1968). Nous constatons aussi une évolution antagonique de l'activité enzymatique testée, comparée à la concentration en protéines, aussi bien dans la feuille que dans l'hypo-

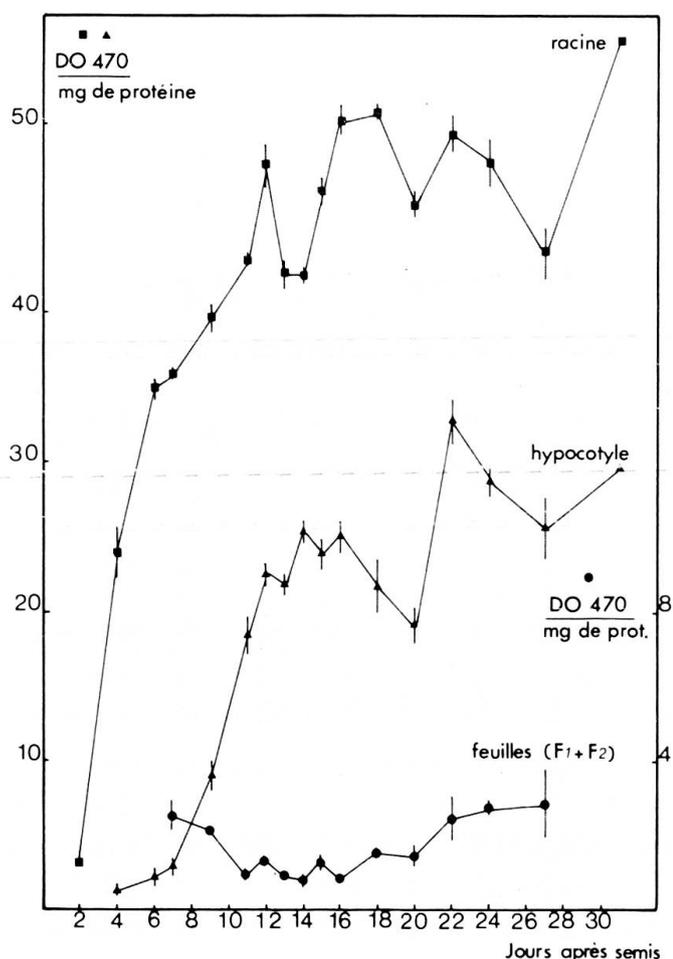


FIG. 6. — Evolution de l'activité peroxydasique totale dans les feuilles ($F_1 + F_2$), la racine et l'hypocotyle d'épinards cultivés sous éclairciment continu. Chaque point est la moyenne de trois analyses sur des échantillons différents avec l'écart-type. Tous les échantillons sont prélevés au même moment de la journée (15 h.).

cotyle et la racine. L'entrée en sénescence accélérée de ces différents organes s'accompagne successivement d'une diminution de la quantité de protéines étroitement corrélée à l'augmentation de l'activité peroxydasique.

L'étude par séparation électrophorétique de l'extrait enzymatique peroxydasique fait apparaître un grand nombre de composantes (isoenzymes?). Il a été montré dans les extraits foliaires qu'une variation importante apparaissait, au moment de l'induction florale, dans le rapport entre les peroxydases acides et basiques (Penel et Greppin, 1975). L'induction se manifeste par une augmentation rapide des fractions acides et une diminution des fractions basiques. La séparation par électrofocalisation des extraits racinaires est présentée dans les figures 7 et 8. Nous observons

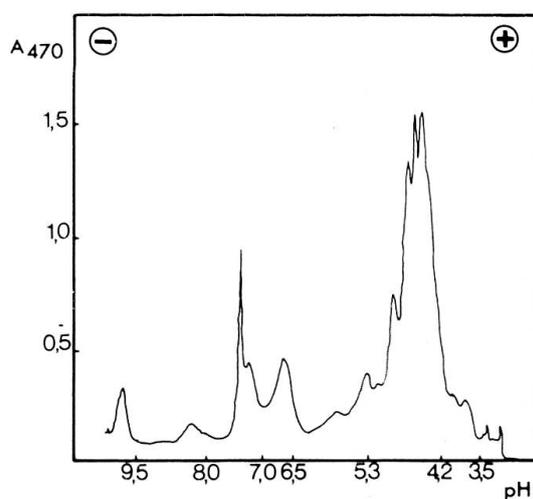


FIG. 7.

Séparation des isoperoxydases de racines par focalisation isoélectrique.
Epinards cultivés pendant 9 jours sous éclairage continu.

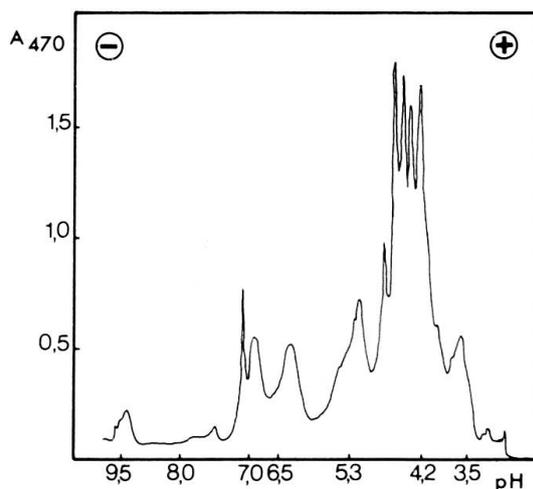


FIG. 8.

Séparation des isoperoxydases de racines par focalisation isoélectrique.
Epinards cultivés pendant 15 jours sous éclairage continu.

le même phénomène que dans la feuille en ce qui concerne le rapport des activités peroxydasiques acides sur les activités des fractions basiques; le changement s'opérant au moment de l'induction florale dans les deux premières feuilles. La faible variation observée concernant les peroxydases basiques est due au fait que le pH d'extraction utilisé n'a pas permis de récupérer toutes les peroxydases basiques, en particulier dans la phase végétative.

CONCLUSION

L'ensemble des résultats obtenus met bien en évidence l'existence d'une certaine coordination entre les différentes parties de la plante et l'existence, au moment de l'induction florale, d'une situation particulière tant pour la racine que pour l'hypocotyle et les deux premières feuilles. Ainsi, l'accroissement de la masse pondérale fraîche présente un changement de régime aussi bien dans la racine que dans les deux premières feuilles (l'eau semble particulièrement impliquée dans la racine puisque la concentration en protéines est devenue stationnaire durant cette période). Nous constatons, en ce qui concerne les états végétatif, floral et lors de la transition entre ces deux états, une évolution antagonique de l'activité peroxydasique totale dans les racines et l'hypocotyle comparées aux deux premières feuilles, évolution conforme au modèle proposé par Gaspar *et al.* (1975, 1982).

Si l'induction florale dans les premières feuilles initie l'accélération de leur sénescence, celle-ci commence beaucoup plus tôt dans l'hypocotyle et la racine. Il serait intéressant de déterminer dans quelle mesure les processus qui se passent dans la racine sont contrôlés par l'évolution des feuilles, sous l'action des diverses contraintes de l'environnement, et dans quelle mesure la durée de la phase juvénile de la plante et l'acquisition de la sensibilité photopériodique sont contrôlées par l'état des racines. L'emploi de diverses hormones, ainsi que d'activateurs ou d'inhibiteurs des activités peroxydasiques et du métabolisme des protéines pourrait apporter quelques éléments de réponses.

La connaissance dans l'ensemble de la plante, des conditions menant à la floraison ou à la rhizogenèse peuvent permettre d'envisager de nombreuses applications dans le domaine horticole et agricole (Gaspar *et al.*, 1982). L'étude de l'évolution des peroxydases permet de déterminer à quel stade la plante se trouve et quels types d'actions il faut mener pour aller vers la formation de racines ou de fleurs (activer ou inhiber l'activité peroxydasique).

BIBLIOGRAPHIE

- AUDERSET, G. (1979). Etude du méristème caulinaire de l'épinard (*Spinacia oleracea*, var Nobel) avant et après l'induction florale. *Thèse n° 1688*. Université de Genève.
- BERNIER, G., J.-M. KINET and R. M. SACHS (1981). The physiology of flowering, CRC Press, Boca Raton. Vol. I, 149 p.

- CHAMONT, S., B. SOTTA et E. MIGINIAC (1982). Influence de traitements thermiques appliqués au niveau des racines sur la croissance, la floraison et l'équilibre hydrique de *Chenopodium polyspermum*. *L. Physiol. vég.*, 20, 1-10.
- EVANS, L. T. (1969). The induction of flowering. Some case histories. MacMillan of Australia, 488 p.
- FREDJ, M. et H. GREPPIN (1980). Quelques caractéristiques de l'épinard lors du développement et du vieillissement. *Saussurea*, 11, 49-61.
- GASPAR, T., C. PENEL and H. GREPPIN (1975). Peroxidase and isoperoxidases in relation to root and flower formation. *Plant Biochem. J.*, 2, 33-37.
- GASPAR, T., C. PENEL, T. THORPE and H. GREPPIN (1982). Peroxidases 1970-1980. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants. Université de Genève — Centre de Botanique 1982, 324 p.
- KAREGE, F., C. PENEL et H. GREPPIN (1977). Evolution de l'activité peroxydasique dans la feuille de l'épinard lors de l'ontogenèse en photopériode courte ou continue. *Saussurea*, 8, 75-83.
- KAREGE, F. (1981). Activité peroxydasique: indicateur de floraison et d'interrelations organiques chez *Spinacia oleracea*. *Thèse n° 1998*. Université de Genève.
- LAMB, R. (1981). Activité peroxydasique dans les racines et les feuilles d'épinards pendant le développement et en fonction de différents traitements hormonaux. Travail de diplôme. Université de Genève.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- PENEL, C. et H. GREPPIN (1975). The balance between acid and basic peroxidases and its photoperiodic control in spinach leaves. *Plant Sc. Letters*, 5, 41-48.
- PENEL, C. (1976). Activité peroxydasique et développement chez *Spinacia oleracea*. *Thèse n° 1667*. Université de Genève.
- PILET, P.-E. et T. GASPAR (1968). Le catabolisme auxinique. Masson, Paris, 148 p.
- SPECTOR, T. (1978). Refinement of the coomassie blue Method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for ≤ 0.5 to $50 \mu\text{g}$ of protein. *Anal. Biochem.*, 86, 142-146.

