" HORMONES ENDOGENES ET DEVELOPPEMENT DE L'INFLORESCENCE PRINCIPALE DU COLZA *BRASSICA NAPUS* L. var. OLEIFERA HETZG, CULTIVAR BIENVENUE "

P. de BOUILLE (1), B. SOTTA (1), E. MIGINIAC, (1), P. A. MERRIEN (2).
(1) Laboratoire d'Ontogenèse Expérimentale- Tour 53, 5ème étage- 4, Place Jussieu- 75252 Paris Cedex 05- FRANCE.
(2) CETIOM. 174 Av. Victor Hugo-75016 Paris-FRANCE.

INTRODUCTION

L'analyse de la régulation hormonale du développement de l'inflorescence principale du colza (*Brassica napus* L. var. oleifera Hetzg) n'a été abordée qu'avec des méthodes traditionnelles d'application d'hormones exogènes (MORGAN, 1983). Les techniques mises au point récemment au Laboratoire, qui permettent un dosage précis des teneurs en plusieurs hormones, ont ouvert une nouvelle voie de recherche, permettant d'appréhender de façon originale les problèmes de la régulation hormonale de ce phénomène. Dans un premier temps, l'objectif retenu a été l'étude de l'évolution des teneurs hormonales dans l'inflorescence principale de la plante. Les hormones étudiées sont les suivantes: une auxine: l'acide indole acétique (AIA), quatre cytokinines: la zéatine et l'isopentényladénine sous forme base (Z, iP) et riboside (ZR, iPA) et enfin l'acide abscissique (ABA).

MATERIEL et METHODES

Les plantes sont cultivées de façon classique en plein champ à l'INAPG à Grignon. Le cultivar est BIENVENUE. Il a été semé à l'automne derrière un escourgeon a une dose de 4 kg/ha . La fumure est de 250 unités d'azote, 100 unités de P205 et 100 unités de K20.

Tous les prélèvements sont réalisés hebdomadairement du 18-02-86 au 05-06-86 puis du 06-11-86 au 11-12-86 entre 13 et 15 heures. La hampe florale est progressivement fractionnée en bourgeon terminal, fleurs fermées, fleurs ouvertes, siliques jeunes et siliques âgées. Les échantillons sont composés de 35 organes homologues pour avoir des valeurs moyennes de parcelle. Ils sont immédiatement congelés dans de

l'azote liquide puis lyophilisés et réduits en poudre à l'aide d'un broyeur à bille. Ils sont ensuite conservés à sec et à l'obscurité. Les stades repères, utilisés pour caractériser le développement des plantes au moment des prélèvements, sont ceux définis par le Groupe de Travail CETIOM, INRA, P.V. (1981). En outre, les bourgeons terminaux des échantillons prélevés à l'automne ont fait l'objet d'observations tant morphologiques que cytologiques, en vue de délimiter le passage du méristème végétatif au méristème reproducteur.

La méthode de dosage est la suivante: 20 mg de poudre lyophilisée sont mis en extraction dans du méthanol à 80% + BHT pendant une nuit, à l'obscurité et en agitation. Afin de pouvoir déterminer le rendement de purification, sont également ajoutés à l'extrait , de l'AIA et de l'ABA tritiés (Activité spécifique de l'AIA tritié = 1,1 TBq/mmole, CEA, France, et de l'ABA tritié = 0,8 TBq /mmole, Amersham, GB).

Le rendement de l'extraction et de la purification des cytokinines n'a pas été systématiquement calculé. En effet les standards radioactifs des cytokinines n'existent pas dans le commerce. C'est pourquoi nous avons pris comme référence les résultats obtenus par PELESE chez *Nicotiana Tabacum* (résultats non publiés) qui a mesuré les rendements d'extraction et de purification de la ZR et de l'iPA à partir de standards à haute activité spécifique donnés par le Docteur Laloue(CNRS, Gif/Yvette).

Les extraits sont ensuite purifiés par un passage sur préfiltre cellulose, filtre Millipore 0,45 µm et colonne phase inverse SEP PAK C 18 (Waters Ass., Milford, Ma., USA). Alors que les pigments chlorophylliens et les lipides restent accrochés sur la phase apolaire de la colonne, les hormones chargées, solubles dans le méthanol à 80%, ne le sont pas. L'extrait est alors évaporé jusqu'à la fraction aqueuse et acidifié par 500 µl d'acide acétique à 3% avant d'être injecté sur une colonne de chromatographie phase inverse C 18 (Chrompack, Pays-Bas) contrôlée par un appareil HPLC (Beckman, Berkeley, Ca, USA) système 114 M. Le gradient d'élution permet de séparer l'AIA, l'ABA et les cytokinines Z, ZR, IP, iPA. L'auxine et l'acide abscissique sont méthylés pour faciliter leur reconnaissance par les anticorps. Toutes les fractions sont évaporées et conservées à -25°C.

Le protocole de dosage, utilisant la méthode ELISA a été mis au point au Laboratoire (MALDINEY *et al.* 1986, SOTTA *et al.* 1987).

RESULTATS

ACIDE INDOLE ACETIQUE (figure 1)

Dans le bourgeon terminal, les teneurs sont généralement élevées. On observe, à l'automne, un pic dans les échantillons prélevés au stade B14, et

subissent peu de variations significatives. On peut néanmoins retenir l'augmentation temporaire des teneurs en AIA et ABA au moment de la reprise en végétation. L'AIA joue sans doute un rôle dans la mise en route du processus de développement. Les teneurs en cytokinines étant très faibles, il est possible que cette période corresponde à un agrandissement cellulaire plutôt qu'à une multiplication cellulaire.

La troisième période commence en milieu de montaison (D2) et se termine à la chute des pétales des premières fleurs de la hampe florale principale (G1). Elle s'accompagne de variations successives, importantes et brèves des teneurs en certaines hormones:

Dans un premier temps les teneurs en ABA sont multipliées par quatre. L'ABA pourrait jouer un rôle promoteur de flux de métabolites vers le puits constitué par la zone apicale de l'inflorescene principale (BRENNER *et al.*,1986). Ensuite, à l'ouverture des premières fleurs et pendant une semaine, les teneurs en ZR des bourgeons terminaux, et dans une moindre proportion, des fleurs fermées puis ouvertes, passent de quelques pmoles/g de matière lyophilisée à 400 pmoles. Cette cytokinine, essentiellement synthétisée par les racines, pourrait être transportée vers les organes en croissance,où elle stimulerait la multiplication cellulaire. Enfin la chute des teneurs en ZR s'accompagne d'une accumulation massive de Z qui proviendrait, au moins en partie, du métabolisme de la riboside en sa base. La baisse des teneurs en zéatine coïncide avec l'arrêt de développement de nouvelles fleurs. Les cytokinines pourraient donc jouer un rôle important au cours du développement des boutons floraux. MISHRA et GAUR (1985) ont également souligné l'importance probable du rôle des cytokinines sur l'expression de la floraison chez l'orge. Toutefois, les niveaux atteints par l'IP et l'iPA ne permettent pas de mettre en évidence une évolution significative de ces hormones au cours de cette période. Cela peut simplement être dû au fonctionnement rapide des réactions métaboliques mises en jeu au cours de la transformation d'iPA en ZR. La stabilité des teneurs en AIA au cours de la montaison et de la floraison peut surprendre puisque l'activité métabolique est alors importante. Cette teneur se maintient cependant à un niveau relativement élevé par rapport à celui des autres hormones. Ce niveau ne semble pas constituer un facteur limitant au cours de cette période de développement de la plante.

Une quatrième période, correspondant au développement des siliques, n'a pas été représentée sur les figures. On observe pour pratiquement toutes les hormones dosées une augmentation importante des teneurs (10 nmoles/g mat.lyoph. pour l'AIA, 1,8 pour l'ABA, 5,8 pour la Z et 0,6 pour la ZR). Les siliques prélevées sont des organes jeunes, au métabolisme très actif. Il est probable que les graines en formation constituent des sites de synthèse hormonale importants. De plus, les siliques pourraient constituer des puits vis à vis d'hormones formées dans

au printemps au moment de la reprise en végétation (C2). Les teneurs décroissent ensuite.

ACIDE ABSCISSIQUE (figure 2)

Dans le bourgeon terminal les teneurs augmentent progressivement au cours de la mise en place de la culture à l'automne, puis se stabilisent. Au cours de la période précédant l'anthèse, les teneurs en ABA augmentent temporairement.

ZEATINE (figure 3)

Dans le bourgeon terminal la présence de Z est à peine décelable pendant l'automne, puis les teneurs augmentent brutalement et brièvement au stade G1, puis décroissent.

ZEATINE RIBOSIDE (figure 4)

Dans le bourgeon terminal, les teneurs en ZR sont remarquables à deux moments: tout d'abord au stade B10 à l'automne mais surtout aux stades E et F2 qui corespondent à l'anthèse. Hormis ces deux périodes les teneurs sont très faibles.

IP, IPA (figures 5 et 6)

Dans l'ensemble des organes prélevés les teneurs en iP et iPA sont faibles. On remarque cependant, pour les deux hormones, une augmentaion significative au stade B10 correspondant au passage du bourgeon végétatif à celui de bourgeon reproducteur. Une augmentation relative de la teneur en iPA apparait au moment de la reprise en végétation (B16).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Cette première étude, limitée à l'analyse des teneurs hormonales de l'inflorescence principale du colza, permet de corréler des teneurs hormonales avec des stades précis de développement. Les résultats permettent de délimiter trois périodes.

La première correspond à la mise en place de la culture à l'automne (B7-B16). Comme l'ont observé BERNIER et KINET (1986) chez *Sinapis alba*, les cytokinines semblent jouer un rôle important lors du passage de l'état végétatif à l'état reproducteur. Chez le colza, cette phase s'accompagne d'une augmentation passagère des teneurs du bourgeon terminal en ZR, iP et iPA. Les teneurs en Z sont par contre stables et très faibles. L'augmentation des teneurs en ABA, surtout à la fin de l'automne, correspond sans doute à une adaptation progressive des plantes aux conditions de milieu hivernales. Le pic en AIA (B16) correspond à la mise en place des ébauches florales au sein du bourgeon terminal.

La deuxième période correspond à la phase de repos hivernal (B16) jusqu'au début montaison (D1). L'activité métabolique de la plante y est ralentie. Les teneurs hormonales se situent également à un niveau bas et

d'autres organes. En effet, les teneurs en AIA, particulièrement élevées, provoqueraient un détournement trophique au profit du développement des siliques les plus âgées et au détriment des siliques les plus jeunes. L'augmentation des teneurs en ABA des siliques peut s'expliquer partiellement par le fait que ce sont des organes de stockage d'assimilats. BRENNER *et al.* (1986) ont remarqué le même phénomène chez le soja où l'ABA semble jouer un rôle d'attraction des photosynthétats.

BIBLIOGRAPHIE

BERNIER, G. et KINET, J.M., (1986). The control of flower initiation and development. In: Plant Growth Substances 1985. M. Bopp Edit., Springer. Verlag Berlin Heidelberg, 293-302.

BRENNER, M.L., BRUN, W.A., SCHUSSLER, J. et CHEIKH, N., (1986). Effects of endogenous and exogenous plant growth substances on development and yield of soybeans. In: Plant growth substances 1985. M. Bopp Edit., Springer. Verlag Berlin Heildelberg, 380-386.

Groupe de Travail CETIOM, INRA, PV, (1981). Colza d'hiver, cahiers techniques 1,edit. CETIOM, Paris, France, p.6.

MALDINEY, R., LEROUX, B., SABBAGH, I., SOTTA, B., SOSSOUNTZOV, L. et MIGINIAC, E.,(1986). A biotin-avidin-based enzyme immunoassay to quantify three phytohormones: auxin, abscisic acid and zeatin-riboside.J. of Immunol. Methods., 90,151-158.

MISHRA, S.D. et GAUR, B.K., (1985). Modification of flag leaf senescence and yield characters in Barley (Hordeum vulgare L.) by gibberellic acid and kinetin. J. Plant Growth Regul. 4, 63-70.

MORGAN, D.G., KEILLER, D.R. et PRYNNE, A.O., (1983). Nitrogen, growth regulators and pod development in oilseed rape. In: Interactions between nitrogen and growth regulators in the control of plant development. Monograph 9, British Plant Growth Regulator Group, 75-86.

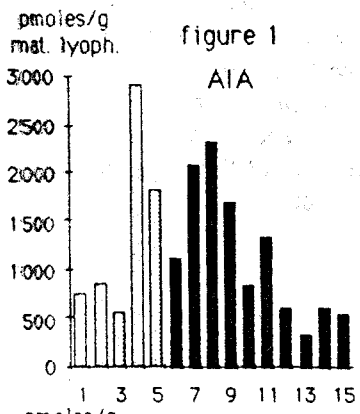
SOTTA, B., PILATE, G., PELESE, F., SABBAGH, I., BONNET, M. et MALDINEY, R., (1987). An avidin-biotin bolid phase ELISA for femtomol isopentenyl adenine and isopentenyl adenosine measurements in HPLC purified plant extracts. Plant Physiol., sous presse.

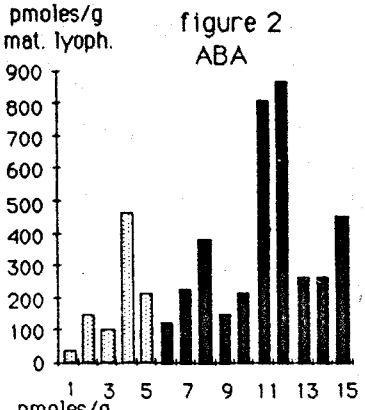
Légendes des figures 1 à 6: Evolution des teneurs hormonales du bourgeon terminal de colza.

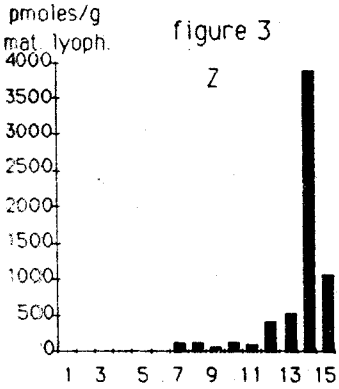
Les teneurs sont exprimées en pmoles/gramme de matière lyophilisée. En abscisse les chiffres correspondent aux stades de développement définis par le Groupe deTravail CETIOM, INRA, PV. (1981).Les valeurs indiquées sont des moyennes de 2 à 5 mesures corrigées du rendement de purification calculé à partir de standards marqués.

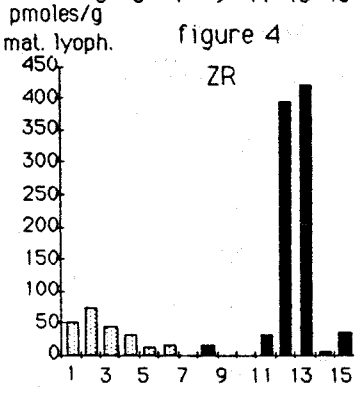
La première série de résultats (colonnes en grisé, stades B7 à B16) provient d'analyses faites sur des plants de colza semés à l'automne 1986, la deuxième série (colonnes en plein, stades B16 à G2), de plants de colza semés à l'automne 1985.

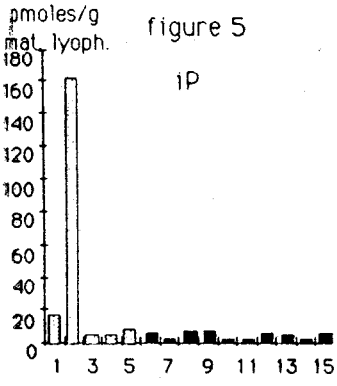
Le tableau présente la correspondance entre les stades de développement et les prélèvements successifs. La période 1 (B7 à B16) correspond à la mise en place de la culture à l'automne, la période 2 (B16 à D1) à la reprise en végétation jusqu'au début montaison, et la période 3 (D2 à G2) à la mi-montaison jusqu'à la chute des pétales des premières fleurs de la hampe florale principale.

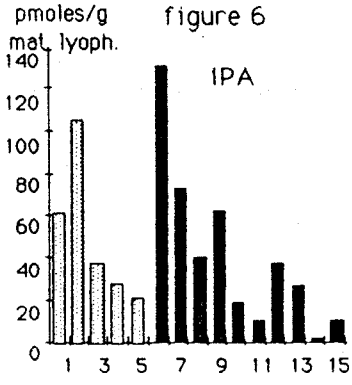












	période 1					période 2					période 3				
Abscisses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
stades	B7	B10	B13	B14	B16	B16	C1	C2	D1	D1	D2	E	F	G1	G2