

Identification des inhibiteurs de la germination des akènes d'*Ambrosia trifida* (L) Action physiologique de ces inhibiteurs

par

MAI TRẦN-NGỌC-TIẾNG

*Département de Physiologie Générale
Faculté des Sciences Saigon, Vietnam*

ABSTRACT. — The localisation of the germination inhibitors of the *A. trifida* fruits was established in a previous paper (19). In this one attempts are made to identify them and to determine their physiological action.

Many methods of chromatography were utilized and revealed that glutaric acid and citric acid were located in the strip .0-.1 of the coat and coumarin in the strip .7-.8 of the seeds. Glutaric acid was much more active than citric acid.

Determination of oxygen uptake by after-ripened seeds soaked in pure coumarin, citric acid, glutaric acid and by dormant seed soaked in gibberellic acid and thiourea showed that the identified inhibitors blocked the respiration of the after-ripened seeds and both gibberellic acid thiourea enhanced the respiration of dormant seeds.

Comparison with iodoacetate showed that inhibitors and iodoacetate were all toxic to after-ripened *A. trifida* seeds and could all be counteracted by gibberellic acid and thiourea.

I. — INTRODUCTION

Il a été démontré dans un article précédent (19) que les histogrammes des téguments des akènes et ceux des graines d'*A. trifida* contiennent deux zones inhibitrices stables localisées respectivement dans les bandes 0,0 — 0,1 et 0,7 — 0,8 des chromatogrammes des akènes et des graines.

Il a été démontré de plus que la dormance des graines d'*A. trifida* a été levée par la thiourée et par l'acide gibbéréllique.

Dans cet article nous essaierons d'identifier les principaux inhibiteurs de ces zones et de déterminer leur action physiologique sur les graines d'*A. trifida* non-dormantes.

II. — IDENTIFICATION DES INHIBITEURS DANS LES AKÈNES ET DANS LES GRAINES D'A. TRIFIDA

1. — MATÉRIELS ET MÉTHODES :

a) *Séparation des zones inhibitrices des histogrammes :*

Les extraits étherés séparés de dix grammes d'akènes et de dix grammes de graines sont obtenus comme précédemment décrits (19). Les extraits concentrés sont appliqués séparément par bandes sur du papier filtre Whatman N° 1. Cinq chromatogrammes ascendants sont obtenus et développés avec une solution d'isopropanol : ammoniacque : eau (10 : 1 : 1) comme solvant à 25° C.

Un chromatogramme est gardé pour l'observation à la lumière ultraviolette, les quatre autres sont coupés en dix bandes et les bandes correspondant au Rfs. : 0,0 — 0,1 et 0,7 — 0,8 sont réunies en deux lots séparés. Ces lots sont ensuite élués avec de l'éthanol pendant 24 h. Les éluats sont concentrés à sec sous pression réduite puis le résidu est repris avec 1 ml. d'eau distillée. Chaque éluat est utilisé dans la détermination des inhibiteurs.

b) *Détermination des inhibiteurs :*

a. — Inhibiteurs contenus dans les akènes d'A. trifida.

1° *Chromatographie sur papier :*

La technique de Varga (9) est employée pour l'identification des acides organiques. Les tâches apparues sur le chromatogramme semblent être celles de l'acide glutarique.

2° *Essai biologique sur la germination des graines d'A. trifida non-dormantes :*

Les tâches obtenues avec 3 chromatogrammes différents sont réunies et humectées avec 3 ml. d'eau distillée puis placées dans une boîte à Pétri. Dix graines non-dormantes sont mises à germer sur ces tâches humides. Aucune graine n'est capable de germer au bout de cinq jours prouvant ainsi la présence des inhibiteurs dans les taches.

3° *Point de fusion des inhibiteurs :*

Pour cet effet une purification de l'éluat des taches inhibitrices est entreprise : toutes les taches laissées par les inhibiteurs sur trois autres chromatogrammes sont réunies et éluées avec 50 ml. d'eau distillée. L'éluat est concentré à 1 ml. puis chromatographié de nouveau sur trois autres chromatogrammes, puis les taches sont éluées de nouveau. L'éluat est de nouveau concentré à sec et desséché dans un dessiccateur et un résidu cireux, brun est obtenu.

La détermination du point de fusion de ce résidu a montré une échelle de point de fusion s'étendant de 95° à 105° C. Cette large échelle nous suggère l'existence de plusieurs autres acides organiques dans le résidu.

c) *Essais de séparation des acides organiques :*

La technique d'Ishenwood et de Hanes (6) a été employée et a permis de séparer dans le résidu deux acides organiques : l'acide glutarique et l'acide citrique.

d) *Observation à la lumière ultra-violette :*

A la lumière ultra-violette le chromatogramme des téguments des akènes montre trois bandes fluorescentes qui ont été déterminées par Varga (9) comme suit :

Rf 0,1 jaune pâle : ?

Rf 0,7 — 0,8 légèrement bleue : acides coumariques

Rf 0,8 — 0,9 » : »

β. — *Inhibiteurs des graines dormantes d'A. trifida.*a) *Chromatographie sur papier :*

La même technique que celle employée pour les bandes 0,0 — 0,1 est appliquée aux bandes 0,7 — 0,8.

La détermination des acides phénoliques est basée sur celle de Kowes et Varga (9). Deux tâches apparaissent sur le chromatogramme mais l'une est très pâle et disparaît au cours du séchage. La tâche stable semble être celle de l'acide ortho-coumarique, l'autre celle de l'acide salicylique.

b) *Observation à la lumière ultra-violette :*

Le chromatogramme de l'extrait éthéré des graines dormantes d'*A. trifida* observé à la lumière ultra-violette a révélé deux bandes fluorescentes qui sont d'après Varga (9) :

Rf 0,0 — 0,2 violette : acide salicylique

Rf 0,7 — 0,9 bleue : acide coumarique

γ. — *Vérification de la nature chimique des inhibiteurs par comparaison avec les produits purs.*a) *Chromatographie sur papier :*

Les solutions d'acide citrique, d'acide glutarique et de coumarine sont préparées séparément puis soumises à un traitement identique à celui subi par les extraits des akènes et celui des graines, c'est-à-dire :

1. — Chromatographie sur bandes horizontales des solutions d'acides et de coumarine.
2. — Chromatographie de l'éluat concentré des bandes 0,0 — 0,1 et 0,7 — 0,8.

3. — Comparaison de la couleur et des Rfs des taches à celles obtenues avec l'extrait des akènes ou des graines. Les tâches provenant des solutions pures ont les mêmes Rfs que celles des extraits.

b) *Essais biologiques sur la germination des graines non-dormantes d'A. trifida :*

Des solutions d'acides citrique, glutarique et de coumarine sont préparées séparément à des concentrations allant de 2 à 6 mg/ml. Chacune d'elles est essayée sur la germination des graines non-dormantes d'A. trifida et sur la croissance du coléoptile d'Avoine.

Ces trois substances inhibent la germination des graines non-dormantes d'A. trifida et la croissance du coléoptile d'Avoine à très fortes doses.

Quant à la coumarine, elle peut lever la dormance des graines d'A. trifidu à faible dose.

c) *Contre-réaction de l'acide gibbéréllique et de la thiourée :*

Il a été démontré (19) que les graines fraîches, dormantes d'A. trifida peuvent être réveillées par des solutions de concentrations déterminées d'acide gibbéréllique et de thiourée. Pour pouvoir affirmer la présence des inhibiteurs dans les graines dormantes il va falloir démontrer l'action antagoniste de ces groupes de substances sur les graines non-dormantes. Pour cet effet, les graines non-dormantes d'A. trifida sont trempées dans les solutions de concentrations croissantes d'inhibiteurs et mises à germer dans différentes boîtes à Pétri. Ces boîtes sont garnies de papier filtre humecté par des solutions de concentrations croissantes d'acide gibbéréllique et de thiourée.

2. — **RÉSULTATS ET DISCUSSION :**

a) *Chromatographie.*

α) **Extrait des akènes**

Les techniques de la chromatographie sur papier ont permis de terminer dans la bande 0,0 — 0,1 du chromatogramme de l'extrait des akènes une seule tache jaune qui semble être de l'acide glutarique, d'après Varga (9).

D'autre part, la comparaison de nos résultats à ceux obtenus par Stark (11) suggère aussi la présence de l'acide glutarique. Comme l'échelle des points de fusion est trop grande (95°C — 105°C) une seconde purification de l'éluat donné par les taches et à une seconde séparation des acides organiques contenues dans l'éluat a été pratiquée. La technique d'Ishenwood et Hanes (6) a permis de séparer l'acide glutarique et l'acide citrique dans ce mélange. L'acide glutarique fond à 97°C et l'acide critique 105°C, ces deux points de fusion sont compris dans l'échelle notée. Nous avons également entrepris une vérification de la présence de ces acides par la technique de Lugg et Overell (10). Cette dernière nous a permis de confirmer l'existence de l'acide glutarique et de l'acide citrique dans les téguments des akènes.

β) **Extrait des graines**

La technique de la chromatographie de Varga (9) a permis de déterminer l'acide o-coumarique et l'acide salicylique dans la bande 0,7 — 0,8

du chromatogramme de l'extrait des graines mais le deuxième acide disparaît quand le chromatogramme est mis à sécher sous la hotte.

b) *Lumière ultra-violette* :

L'identification ces inhibiteurs a été poussée plus loin par une observation à la lumière ultra-violette. Toutefois, la lumière ultra-violette a révélé deux autres bandes fluorescentes dans les téguments. Ces dernières semblent correspondre à l'acide coumarique.

c) Les *essais biologiques* faites sur les graines non-dormantes d'*A. trifida* avec les solutions d'acide glutarique et d'acide citrique ont montré que tous les deux inhibent la germination quand ils existent à faibles concentrations (tableau I).

TABLEAU I

INHIBITION DE LA GERMINATION DES GRAINES NON-DORMANTES d'*A. trifida*
PAR L'ACIDE CITRIQUE ET L'ACIDE GLUTARIQUE

Acide citrique mg/ml	6	4	2	1
Germination %	0	50	80	100
Acide glutarique mg/ml	6	4	2	1
Germination %	0	0	50	100

Les concentrations minima efficaces des inhibiteurs sur la germination des graines non-dormantes d'*A. trifida* et sur la croissance du coléoptile d'Avoine sont figurées dans les tableaux IIa et IIb.

TABLEAU IIa

CONCENTRATIONS MINIMA DE COUMARINE CAPABLE D'INHIBER LA GERMINATION
DES GRAINES d'*A. trifida* ET LA CROISSANCE DU COLEOPTILE D'AVOINE

Concentration de coumarine (mg/3ml)	GERMINATION Graines d' <i>A. trifida</i> %	Coléoptile Control
.2	100	100
.5	100	100
1	100	0
1.5	50	0
2	10	0
2.5	0	0
3	0	0

TABLEAU IIb

CONCENTRATION MINIMUM DE COUMARINE CAPABLE DE STIMULER LA GERMINATION
DES GRAINES DORMANTES d'*A. trifida*

1000 mg/l	800	600	400	200	100
0 %	20 %	20 %	10 %	0 %	0 %

On pourrait déduire que dans les akènes les acides citrique et glutarique sont mêlés à l'acide coumarique, ce dernier étant moins stable.

Dans les graines, la lumière ultra-violette a également révélé deux acides : l'acide salicylique et l'acide o. coumarique, ce dernier étant plus stable que le premier. L'effet antagoniste des substances stimulant la germination telles que l'acide gibbéréllique et la thiourée ont permis de s'assurer l'existence des inhibiteurs dans les différentes parties des akènes. Les concentrations des solutions antagonistes sont figurées dans le tableau III.

TABLEAU III

ACTION DE L'ACIDE CITRIQUE, DE L'ACIDE GLUTARIQUE OPPOSÉE A CELLE DE LA
THIOURÉE ET DE L'ACIDE GIBBERELLIQUE SUR LA GERMINATION
DES GRAINES NON-DORMANTES d'*A. trifida*

	Thiourea 40 mg/ml	ou Acide gibbéréllique 60 mg/l
Acide citrique 6 mg/ml ou Acide glutarique 4 mg/ml	100 %	100 %
	80 %	80 %

Kefford (8), Kowes et Varga (9) ont trouvé deux taches inhibitrices dans les extraits de certains fruits secs et charnus, la première est localisée au Rf. 0,0—0,35 et la deuxième au 0,6—0,85. Dans le premier groupe, Varga (9) a pu identifier des acides carboxyliques comme l'acide citrique, l'acide malique. L'acide citrique a été montré efficace sur la germination des graines de papayer et sur la croissance du coléoptile d'Avoine. Evenari (5) a également démontré l'action inhibante de plusieurs acides organiques sur la germination.

Dans les akènes d'*A. trifida* la présence de l'acide citrique pourrait être due soit à l'oxydation des acides gras, soit au cycle des acides tricarboxyliques. Les enzymes de ces réactions existent dans de nombreux tissus végétaux.

L'accumulation de l'acide citrique serait due à un blocage dans le passage de l'acide citrique à l'acide α kétoglutarique. Ce dernier acide a été mis en présence des graines non-dormantes d'*A. trifida* mais aucune action inhibitrice n'a été observée, ce qui nous a permis de penser que l'acide citrique inhibe seulement sous des fortes concentrations mais quand un mécanisme quelconque vient à lever l'obstacle qui aurait barré sa transformation en acide α -kétoglutarique et faisant baisser ainsi sa concentration, il deviendrait alors inoffensif (19).

Quant à l'acide glutarique, il pourrait provenir d'un produit de déchet du métabolisme de la lysine et son accumulation pourrait provenir d'un blocage dans sa transformation en acide α -kétoglutarique.

Dans les graines, nous avons pu démontrer la présence des coumarines accompagnées de l'acide salicylique. Kefford (8) a séparé dans les fruits fraîchement récoltés un inhibiteur appelé inhibiteur β qui est composé d'acides phénoliques comme l'acide salicylique, l'acide ortho ou para coumarique, d'acides benzoïques comme l'acide cinnamique et ferrulique.

Dans les graines d'*A. trifida*, la coumarine domine l'acide salicylique. Elle pourrait tirer son origine d'une transformation de l'acide cinnamique, ce dernier provient du chemin de l'acide shikimique. La coumarine a été reconnue comme un inhibiteur important de la germination par plusieurs auteurs dont Blumenthal-Goldschmidt (1) qui a prouvé que les coumarines occupent dans les chromatogrammes une zone inhibitrice correspondant à Rf. 0,60 — 0,85. La coumarine est difficile à détecter parce qu'elle est très instable et elle pourrait donner de l'acide coumarique par un changement dans son noyau sous l'action d'un alkali.

Dans les graines d'*A. trifida*, la coumarine se comporte comme une auxine car elle inhibe la germination à forte dose mais la stimule à faible dose. Si nous observons l'évolution des inhibiteurs au cours de la période de conservation (19) nous constatons que la zone correspondant au Rf. : 0,7 — 0,9 est inhibitante aussitôt après la récolte mais devient stimulante après quinze mois de conservation. Ce changement est probablement dû à la destruction progressive des coumarines au cours de cette période de conservation.

III. — MODE D'ACTION DES INHIBITEURS

Comme la respiration est la principale source d'énergie de l'embryon au cours de la germination, des essais sont effectués pour déterminer l'action de chaque inhibiteur sur la respiration des graines non-dormantes et celle des substances de croissance sur la respiration des graines dormantes d'*A. trifida*. Une comparaison à l'action de l'iodoacétate est aussi établie.

a) Matériels et méthodes :

Chaque catégorie des graines non-dormantes et dormantes d'*A. trifida* est divisée en trois lots. Les graines sont ensuite stérilisées au chlorox 1/5 pendant dix minutes rincées sous un courant d'eau déionisée pendant deux heures puis séchées par un papier filtre.

Les graines dormantes d'*A. trifida* sont laissées trempées soit dans l'acide gibbéréllique (600 mg/l) soit dans une solution de thiourée (400 mg/l), à 25° C.

Les graines non-dormantes d'*A. trifida* sont trempées soit dans les solutions de coumarine (2,5 mg/3 ml), ou d'acide citrique (6 mg/ml), d'acide glutarique (4 mg/ml), pendant 48 heures à 25° C.

Après ce trempage, les graines sont séchées au papier filtre puis pesées. Elles sont ensuite placées dans différents flacons Warburg pour la détermination de la quantité d'oxygène absorbée, le CO₂ dégagé étant absorbé par une solution de potasse 0,1 N imbibant un papier filtre plié en accordéon placé au centre du flacon.

b) Pour comparer à l'action de l'iodoacétate, nous avons commencé par déterminer la dose inhibante de cette substance sur la germination des graines d'*A. trifida* et la comparer aux doses actives des substances ayant une activité correspondante.

c) Les effets opposés des substances et inhibitrices et stimulatrices sur la respiration des graines non-dormantes d'*A. trifida* sont également mesurés. Pour cet effet, ces graines sont laissées trempées dans des mélanges formés de parties égales d'un inhibiteur et d'un stimulant à des concentrations optima.

2° Résultats et discussion :

a) Les quantités d'oxygène absorbées par les graines soumises aux différents traitements prouvent que (Tableau V) :

-- Les graines dormantes ont une intensité respiratoire dix fois plus faibles que celle des graines non-dormantes.

— La thiourée et l'acide gibbéréllique stimulent la respiration. L'action de la thiourée est immédiate mais courte tandis que celle de l'acide gibbéréllique est lente mais longue expliquant pourquoi la thiourée peut lever la dormance des graines d'*A. trifida* au bout de quatre jours tandis que l'acide gibbéréllique n'est efficace qu'au bout d'une semaine.

b) La détermination du pouvoir inhibant de l'iodoacétate a montré que cette substance est moins efficace que les trois inhibiteurs identifiés dans les différentes parties de l'akène (Tableau V).

TABLEAU V

CONCENTRATIONS INHIBANTES DE L'ACIDE GLUTARIQUE, D'ACIDE CITRIQUE, DE COUMARINE OU D'IDOACÉTATE SUR LA GERMINATION DES GRAINES NON-DORMANTES d'*A. trifida*

	mg/3ml
Acide glutarique	4
Acide citrique	6
Coumarine	2.5
Iodoacétate	10

La germination et la respiration des graines non-dormantes d'*A. trifida* sont inhibées par la coumarine, l'acide glutarique et l'acide citrique, mais elles sont stimulées par l'acide gibbérélique et la thiourée (Tableaux VI et VII).

TABLEAU VI

GERMINATION DES GRAINES NON-DORMANTES d'*A. trifida* TREMPÉES DANS UN MÉLANGE FORMÉ D'UN INHIBITEUR ET DE LA THIOURÉE OU DE L'ACIDE GIBBÉRELLIQUE

Inhibiteur	Thiourée 400 mg/l	Acide gibbérélique 600 mg/l
Iodoacétate 10 mg/3ml	100 %	100 %
Coumarine 2.5 mg/3ml	60 %	60 %
Acide citrique 6 mg/ml	100 %	100 %
Acide glutarique 4 mg/ml	80 %	80 %

TABLEAU VII

DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION OPTIMUM DE L'ACIDE GIBBÉRELLIQUE ET DE LA THIOURÉE POUVANT RÉAGIR CONTRE L'ACTION INHIBANTE DE LA COUMARINE SUR LA GERMINATION DES GRAINES NON-DORMANTES d'*A. trifida*

mg/l	% germination d' <i>A. trifida</i> traités par la Coumarine (2,5 mg/ml)
Acide gibbérélique	
1000	60 %
800	60
600	80
400	60
200	40
100	20
Thiourée	
1000	40
800	40
600	40
400	60
200	40
100	10

L'action de la coumarine, de l'acide gibbérellique, de la thiourée, sur la germination et sur la respiration a été étudiée par plusieurs auteurs. La coumarine a été prouvée nocive sur les mitoses cellulaires par Cornman (3), sur l'absorption de l'eau par Blain (1), sur l'activité de certaines enzymes comme les protéases et les amylases et les lipases par Poljakoff-Mayber (16).

Quant à l'acide gibbérellique, il a été prouvé actif sur les amylases par Naylor et Simpson (12) et sur la respiration des pois en agissant sur certaines peroxydases (13), ou en se couplant avec les auxines (11).

Il agit également sur la lipase et est stimulé par de faibles doses de coumarine mais devient son antagoniste quand cette dernière atteint une concentration trop élevée (16).

Le rôle de l'acide glutarique et celui de l'acide citrique sur la respiration n'a pas été encore élucidé. Nous avons pu démontrer leur antagonisme avec l'acide gibbérellique et la thiourée et leur parallélisme avec la coumarine et l'iodoacétate. L'iodoacétate et la coumarine ont été prouvées capables de bloquer les déshydrogénases mais nous ne pouvons affirmer, faute d'évidences, que les acides glutarique et citrique ont la même action que la coumarine ou l'iodoacétate.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 — BLAIN, K. — The effect of coumarin on uptake of water by seeds. *Jour. Exp. Bot.* 1960 — 11, 377-380.
- 2 — BLUMENTHAL-GOLDSCHMIDT, S. — Changes in the content of germinating regulating substances in lettuce seeds during imbibition. *Bull. Res. Council, Israël* 1960 — 9 D, 93-99.
- 3 — CORNMANN, I. — The response of onion and lily mitosis to coumarin and para ascorbic acid. *Jour. Exp. Biol.* 1947 — 23, 292-297.
- 4 — ERYGIN, P.S.E.P. ALESHIN, M.A. SANTICH and T.M. FENELONOVA. — Effect of gibberellic acid on rice. *Soviet Plant Physiol.* 1962 — 8, 365-370.
- 5 — EVENARI, M. — Inhibitors of germination. *Bot. Rev.* 1949 — 49, 150.
- 6 — ISHENWOOD, F. A. and C. S. HANES. — Separation and estimation of organic acids on paper chromatograms. *Biochem. Jour.* 1953 — 55, 824-830.
- 7 — KEFFORD, N. B. — The growth substances separated from plant extract by chromatography I. *Jour. Exp. Bot.* 1954 — 6, 129-151.
- 8 — KEFFORD, N. B. — The growth substances separated from plant extract by chromatography II. *Jour. Exp. Bot.* 1954 — 6, 245-255.
- 9 — KOWES, E. and M. VARGA. — Examination of growth-inhibiting substances separated by chromatography on fleshy fruits. II. Identification of the growth-inhibiting zones on the chromatogram *Acta Biological, Szegediensis* 1957 — 3, 213-223.
- 10 — LUGG, J. W. H. and S. T. OVERELL. — One and two-dimensional partition chromatographic separations of organic acids on an inert sheet support. *Astr. Jour. Sci. Res. Serie A* 1948 — 1, 98-110.
- 11 — McCUNE, D. C. and A. W. GALSTON. — On the relationship of gibberellins to peroxidase activity and growth. IX International Botanical Congress II. 1959 — 240-241.

- 12 — NAYLOR, J. M. and F. M. SIMPSON. — Dormancy studies in seed of *Avena fatua* 2. A gibberellin-sensitive inhibitory mechanism in the embryo. Can. Jour. Bot. 1961 — 39 (2), 281-295.
- 13 — NIELSEN, N and G. BERQUIST. — The stimulation of the respiration of seeds with gibberellic acid and its analytical significance. Physiol. Plant 1958 — 2, 329-331.
- 14 — POLJAKOFF-MAYBER, A. — Oxidative activity of particles prepared from lettuce seedlings. Jour. Exp. Bot. 1955 — 6, 313-320.
- 15 — POLJAKOFF-MAYBER. — Some quantitative changes in the fat metabolism of germinating lettuce seeds and their inhibition by coumarin. Jour. Exp. Bot. 1955 — 6, 287-293.
- 16 — POLJAKOFF-MAYBER, A. and A. M. MAYBER. — Interaction of thiourea and coumarin. Bul. Res. Counc. Israel, 1958 — 6 D, 118-124.
- 17 — RIMON, D. — Lipase activity of germinating lettuce seeds. Bull. Res. Counc. Israel, 1957 — 6 D, 53-55.
- 18 — STARK, J. B., A. E. GOODEAN and H. S. OWENS. — Paper chromatography of organic acids. Analytical Chemistry 1951, 23, 413-415.
- 19 — MAI TRAN-NGOC-TIENG. — Inhibition et stimulation de la germination des graines d'*A. trifida* (L). Ann. Fac. Sci. Saigon 1962 — 499-516.