

**INVESTIGATIONS CONCERNANT L'ACTIVITE ET
LE SPECTRE DE QUELQUES ENZYMES SUR DES
REGENERANTS DE *BRASSICA OLERACEA* VAR.
CAPITATA EN PROVENANT DES ANTHERES ET
OVAIRES♦**

**Daniela Nicuță^{1*}, Gogu Ghiorghiță¹,
Ecaterina T. Toth², Diana E. Maftel¹**

¹ *Université de Bacău, Département de Biologie, Rue de Calea Mărășești
157, Bacău, Roumanie*

² *Université de Medicine et Pharmacie, Département de Botanique de
Plantes, 38, Blvd. Gh. Marinescu, Târgu-Mureș*

³ *Université de Bacău, Rue de Calea Mărășești 157, Bacău, Roumanie*

Corresponding author : danan@ub.ro

Received: 01/03/2006

Accepted after revision: 15/04/2006

Abstract: Cathalase and peroxidase activity was effected on cabbage leaves (*Brassica oleracea*) from *in vitro* regenerants. The study of cathalase and peroxidase specific activity on vitroclones provided by anthers and ovaries pointed out major differences due to genotype, explant type and hormonal balance within the nutritive media. Cathalase activity in most investigated regenerants was higher compared to control plants. Seed-grown plantlets (the same ontogenetic stage as the *in vitro* plants) were referred to as control plants.

♦ Paper presented at the 4th edition of Colloque Franco-Roumain de Chimie Appliquée – COFrRoCA 2006, June 28 – July 02, Clermont-Ferrand, France

Catalase activity was determined by iodometric method, and peroxidase activity – by spectrophotometry. To evince the isoenzyme spectrum of estherase and peroxidase, enzyme preparations were accomplished in Tris-HCl 0.1M, pH=7.2. Wrigley method was used for electrofocussing. Peroxidasic isoenzymes were evinced by means of McDonald and Smith method, 1972.

Catalase specific activity in most investigated vitroclones was higher related to control plants.

In case of ovary-provided regenerants (Z_{2-12} genotype) catalase activity is higher on media supplemented with BAP (benzylaminopurine) and IAA (indole acetic acid): 7.745 mg H_2O_2 /mg proteins, superior to control plants: 1.196 mg H_2O_2 /mg proteins.

Peroxidase specific activity in vitroclones was higher than in control plants (0.763 – 1.709 mg H_2O_2 /mg proteins in anther-provided regenerants, and of 1.429 – 4.326 mg H_2O_2 /mg proteins in ovary-provided regenerants, compared to 0.432 mg H_2O_2 /mg proteins in control).

Isoenzymatic spectra of catalase and of peroxidase evinced some major differences among the regenerants of *Brassica oleracea* var. *capitata* provided by anthers and ovaries. Isoestherase spectrum was broad, comprising 9 to 17 electroforetic bands. There was a narrow isoperoxidase spectrum in vitroclones. There were 1 to 4 bands in case of regenerants compared to control (5 bands).

Keywords: *Brassica, in vitro culture, catalase, peroxidase, isoenzyme*

INTRODUCTION

Le chou, cet aliment si commun pour nous tous et dont les vertus thérapeutiques sont connues depuis l'Antiquité, a été vu à un moment donné tel une vraie panacée. Grâce à ses qualités incontestables – un contenu riche en vitamines, sels minéraux et chlorophylle - le chou est considéré une vraie pharmacie naturelle et il peut être utilisé avec succès dans la prévention et dans le traitement d'un grand nombre de maladies, [1,2].

La culture *in vitro* – méthode non-conventionnelle de faire pousser des plantes, constitue une modalité sûre et relativement facile de multiplication d'une plante, d'un matériel biologique valeureux, sans risque d'altérer ses qualités de production [3]. A la fois, elle représente une méthode d'induction de la variabilité génétique et d'isolement des génotypes résistants aux différentes conditions de vie dures, ainsi qu'à certaines maladies.

MATERIEL ET METHODES

L'étude des activités de la catalase et de la peroxydase a été faite sur des feuilles de chou (*Brassica oleracea*) récoltées des régénérants obtenus *in vitro* et cultivés en pots maintenus en conditions de laboratoire (figures 1, 2). Comme témoins, nous avons pris en considération des plantes de *Brassica oleracea* obtenus de semences et dont l'étape de développement ontogénique était identique à celle des régénérants.



Figure 1. Régénérants provenant des anthères



Figure 2. Régénérants provenant des ovaires

La détermination de l'activité de la catalase a été faite par méthode iodométrique, méthode consistant dans le dosage de l'eau oxygénée qui est restée non-décomposée après un certain temps d'incubation avec la source de catalase.

L'activité de la catalase est exprimée en mg d'eau décomposée par l'enzyme dans un gramme de matériel biologique frais à analyser.

La détermination de l'activité de la peroxydase a été faite par la méthode spectrophotométrique, dont le principe consiste en évaluation de l'oxydation enzymatique de la benzidine dans la présence de l'eau oxygénée, dans une unité de temps [4]. L'intensité des colorations de l'épreuve à analyser et de l'épreuve témoin a été évaluée à l'aide du spectrophotomètre du type Spekol 20, à longueur d'onde (λ) de 470 nm, par comparaison avec une épreuve de contrôle des réactives.

Dans nos recherches, nous avons déterminé et analysé les formes moléculaires multiples des estérases et des peroxydases des feuilles pour un nombre de 8 régénérants de *Brassica oleracea*, var. *capitata*.

La préparation de l'extrait enzymatique pour mettre en évidence le spectre isoenzymatique des estérases et des peroxydases a été faite en tampon Tris-HCl 0,1 M, pH = 7,2 qui contient de l'acide ascorbique 0,006 M, de chlorhydrate de cystéine 0,006 M et saccharose 0,5 M [4]. L'électrofocalisation a été effectuée par la méthode Wrigley. La visualisation des isoenzymes peroxydasiques a été faite par la méthode McDonald et Smith, 1972, en introduisant les épreuves en bain thermostat à la température de 37° C, pendant 10 minutes. La mise en évidence des isoenzymes estérasiques a été réalisée par la méthode de Scandalios, 1969.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

L'étude de l'activité spécifique de la catalase et de la peroxydase sur des régénérants de chou blanc obtenus des anthères et des ovaires a relevé des importantes différences entre eux qui dépendent de génotype, type d'explanter et de balance des régulateurs de croissance des milieux nutritifs (tableau 1).

Tableau 1. L'activité spécifique de la catalase et de la peroxydase sur des régénérants de *Brassica oleracea* var. *capitata* provenant d'anthères et d'ovaires

No crt	Génotype	Type d'ex- plante	Var. horm.	Catalase		Peroxydase		Pro- téine soluble mg/g s.pr.
				Activité spécifique		Activité spécifique		
				H ₂ O ₂ mg/ g s.pr.	H ₂ O ₂ mg/ mg prot.	H ₂ O ₂ mg/ g s.pr.	H ₂ O ₂ mg/ mg prot.	
1	Plantes témoin	-		39,48	1,196	15,20	0,432	32,957
2	BCO-076	anthères	BN	16,80	1,556	14,83	1,257	10,790
3	Z ₂₋₁₂	anthères	BDN	19,82	1,081	14,42	0,763	18,336
4	TRM ₁	anthères	BN	36,12	4,675	14,85	1,709	7,720
5	TRM ₁	anthères	BN	43,68	4,206	15,11	1,487	10,165
6	BCO-7-10	anthères	BDN	34,92	2,383	17,05	1,076	14,650
7	TRM ₁	ovaires	BN	30,24	3,432	14,93	1,556	8,810
8	BCO-076	ovaires	BN	19,32	1,359	22,35	1,429	14,215
9	BCO-7-10	ovaires	BA	49,56	4,497	21,88	1,814	11,020
10	Z ₂₋₁₂	ovaires	BA	48,73	7,745	14,33	4,326	3,145
11	DE	ovaires	BN	40,32	3,719	27,84	2,012	10,840

Pour la majorité des vitroplantes investiguées nous avons observé que l'activité spécifique de la catalase a été supérieure à celle des plantes témoin. Dans le cas des régénérants obtenus des ovaires, l'activité spécifique de la catalase est la plus élevée pour le régénérants du génotype Z₂₋₁₂ sur le milieu enrichi en BAP (benzyle-amine-purine) et IAA (acide indolyle-acétique): 7,745 mg H₂O₂/ mg protéines. Concernant les plantes obtenues des anthères, l'activité du génotype TRM₁ sur le milieu enrichi en BAP et NAA (acide naphthyle-acétique) est de 4,675 mg H₂O₂/ mg protéines. Ces valeurs s'avèrent supérieures aux valeurs enregistrées pour les plantes témoin: 1,196 mg H₂O₂/mg protéines. L'activité spécifique de la peroxydase des vitroplantes analysées a été également supérieure à celle des plantes témoin (0,763 – 1,709 mg H₂O₂/ mg protéines dans le cas des régénérants provenant des anthères et 1,429 – 4,326 mg H₂O₂/ mg protéines dans le cas des régénérants des ovaires par rapport à 0,432 mg H₂O₂/ mg protéines pour les plantes témoin).

L'étude des spectres isoenzymatiques de la catalase et de la peroxydase a mis en évidence, toutefois, des différences assez importantes entre les régénérants de *Brassica oleracea* variante *capitata* en provenant d'anthères et d'ovaires (tableau 2, figure 3).

Le spectre des isoestérases est vaste et contient entre 9 et 17 bandes électrophorétiques (figure A). L'individu 1 du génotype BCO-076 (en provenant des anthères) régénéré sur le milieu BDN (avec BAP, NAA, et 2,4-D) présente les plus nombreuses bandes (17 bandes). Le plus bas nombre des bandes (seulement 9) ont été observés à l'individu 4

régénéré des anthères du génotype TRM1 (figure 3A). Nous avons également observé que le spectre des isoperoxydases est plus étroit, le nombre des bandes mis en évidence aux vitroplantes étant compris entre 1 et 4 par rapport aux plantes témoin qui présentent 5 bandes (figure 3B).

Tableau 2. Matériel biologique utilisé pour la mise en évidence du spectre isométrique de l'estérase et de la peroxydase sur des régénérants de *Brassica oleracea* L., var. capitata

Var.	Génotype	Origine des régénérants	Milieux nutritifs
C	Plantes témoin	Semences	MS
1	BCO-076	anthères	BDN
2	TRM ₁	anthères	BN
3	TRM ₁	anthères	BN
4	TRM ₁	anthères	BN
5	Z ₂₋₁₂	anthères	BN
6	BCO-076	ovaires	BN
7	TRM ₁	ovaires	BN
8	DE	ovaires	BN

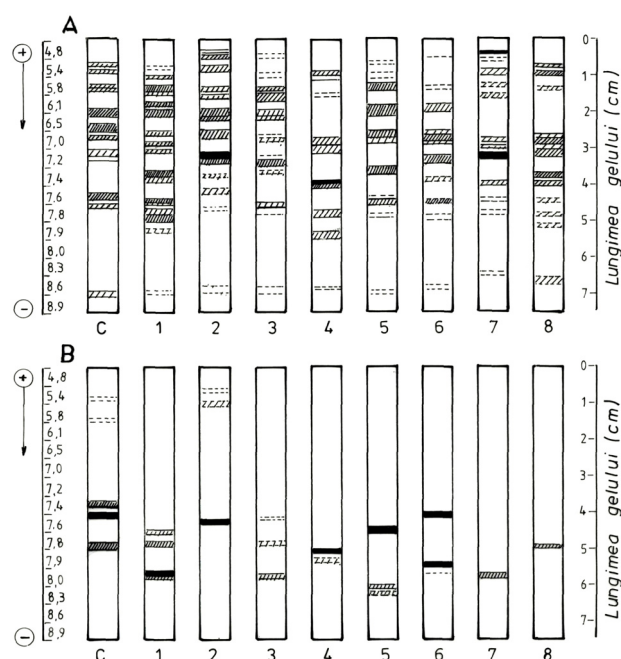


Figure 3. Le spectre des isoestérases (A) et iso peroxydases (B) aux régénérants de *Brassica oleracea* var. capitata

CONCLUSIONS

1. L'activité de la catalase et de la peroxydase dans les feuilles des régénérants de *Brassica oleracea* var. *capitata* dépend du génotype, de la nature de l'explant (anthères et ovaires) et de la formule hormonale sur laquelle les plantes ont été régénérées.
2. En général, les régénérants des ovaires ont eu des activités spécifiques de la catalase et de la peroxydase beaucoup plus élevées que celles mises en évidence sur les plantes témoins.
3. Les valeurs très élevées des activités spécifiques aux deux enzymes sur un individu appartenant au génotype Z₂₋₁₂, régénéré des ovaires dans un milieu supplémenté avec BAP et IAA, qui pourrait être lui-même un nouveau génotype.
4. L'étude des formes moléculaires multiples des régénérants des anthères et des ovaires prélevés du chou (*Brassica oleracea* var. *capitata*) ont mis en évidence un spectre large d'isoestérases et un spectre relativement réduit d'isoperoxydases.
5. Les différences enregistrées entre les régénérants investigués sous l'aspect de l'activité de la catalase et de la peroxydase, du spectre et de l'activité des isoenzymes estérasiques et peroxydasiques nous permettent à supposer que certains de ces régénérants représentent eux-mêmes des génotypes distincts.

REFERENCES

1. Grigorescu, E., Silva F.: *De la etnomedicina la fitoterapie. Tezaurul verde al medicinei (From ethno medicine to phytotherapy – in Romanian)*, Ed. Spiru Haret, Iasi, **1997**, 560.
2. Ciulei, I., Grigorescu, E., Stănescu, U.: *Plante medicinale, fitochimie și fitoterapie (Medicinal plants, phytochemistry and and phytotherapy – in Romanian)*, vol. II, Ed. Medicală, București, **1993**, 53.
3. Badea, M.E., Săndulescu, D.: *Biotehnologii vegetale (Vegetal Biotechnology – in Romanian)*, Fundation BIOTECH, București, **2001**, 295.
4. Toth, E.T.: *Modificări biochimice induse de razele gamma în celula vegetală (Biochemical modifications induced by gamma rays in vegetal cell – in Romanian)*, Ed. Alma Mater, Bacău, **2005**, 171-217.