



HAL
open science

Caractérisation de la maturation de disques de péricarpe de tomate en relation avec l'effet de blessure

Barbara Gouble, Pierre Soudain

► To cite this version:

Barbara Gouble, Pierre Soudain. Caractérisation de la maturation de disques de péricarpe de tomate en relation avec l'effet de blessure. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 1993, 316, pp.1240-1244. hal-03602000

HAL Id: hal-03602000

<https://hal.inrae.fr/hal-03602000>

Submitted on 8 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Caractérisation de la maturation de disques de péricarpe de tomate en relation avec l'effet de blessure

BARBARA GOUBLE, PIERRE SOUDAIN

Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux Après Récolte, CNRS, 4 ter, route des Gardes, 92195 Meudon Cedex, France.
Reprints : B. Gouble

Ripening characterization of tomato pericarp discs in relation to wounding

RÉSUMÉ

Le comportement des disques de péricarpe, utilisés comme modèle pour l'étude de la maturation et de la sénescence de la tomate, est examiné dans certaines conditions expérimentales permettant de mieux dissocier les phases de blessure et de maturation. Il est mis en évidence une forte accélération de l'initiation de la maturation, suivie notamment au niveau de la biosynthèse d'éthylène. L'influence de l'éthylène de blessure est discutée. ▲

Mots clés : tomate, éthylène, maturation, blessure.
Key words : tomato, ethylene, ripening, wounding.

ABRIDGED VERSION

The study of tomato ripening is difficult because of complex fruit structure and the heterogeneity of the mature-green stage, which is generally divided into MG1, MG2, MG3 and MG4 [1, 2]. Pericarp discs are used to determine accurately the initial maturity stage and to limit variability in plant material. The present study emphasizes the influence of the experimental conditions on disc ripening, which is considered very similar to that of intact fruit [3, 4]. The effect of wounding, and specifically of wound-ethylene, is analyzed.

Greenhouse-grown tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill., var. Capello) fruits were washed in a 300 ppm sodium hypochlorite solution and dried. Discs were cut under sterile conditions with a cork borer (diameter 8 mm) in an equatorial band from external pericarp and were not sliced further. Glass vials containing around 70 discs placed epidermis-side-down, and jars each holding one fruit, were flushed with water-saturated air at 15 °C in the dark. Ethylene was analyzed by gas chromatography and respiratory CO₂ was measured continuously by an infrared gas analyzer. One vial was also illuminated (18 μmol . m⁻² . s⁻¹) for 6 h a day. Ethylene-forming enzyme (EFE) activity was measured for discs and fruit as described in [5], and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase were extracted and assayed according to [1] and [6].

In a single batch of green tomatoes, disc preparation allowed us to define two groups of discs and of intact fruit belonging to

Note présentée par Michel Thellier.

Note remise le 7 juin 1993, acceptée après révision le 3 août 1993.

ABSTRACT

Pericarp disc behaviour, used as a model system for studies of tomato ripening and senescence, was investigated under experimental conditions permitting improved distinction of the wounding and ripening phases. Ripening initiation was greatly accelerated, as confirmed by the trend in ethylene biosynthesis. Wound-ethylene influence is discussed. ▲

stages MG2 and MG3. Ethylene production in discs was greater and occurred earlier in both groups than in the corresponding fruit (Fig. 1A). Similar behaviour was noted for CO₂ release by the discs (Fig. 1B). Illumination of green discs [3] immediately reduced apparent respiration by 55 % (data not shown). Measurements of CO₂, and therefore in theory of ethylene, clearly depend on the photosynthetic capacity of green fruit [7], which is much amplified by the surface/volume ratio of discs. Yet ethylene production was not significantly modified. This finding may be due to an equilibrium between the stimulatory and inhibitory effects of light which essentially depends on CO₂ concentration in the flasks [8]. Nevertheless, continuous illumination seems to increase disc resistance to fungi, mediated by tomatine and sugar concentrations in the discs [9]. Overall ethylene biosynthesis in discs and intact fruit (Table I) followed the usual trend [1, 6], notably with high ACC levels at the red stage due to a drop in EFE activity related to membrane deterioration [14]. In contrast, a senescence ethylene burst was seen in several fruits and reflects better membrane integrity and perhaps a response to undetected fungal attack [15]. Increased ethylene production by discs (Fig. 1A) was reflected in marked increases in all biosynthesis parameters (Table I).

The effects of wounding on ripening seem fundamental. The response of tomato discs to wounding (Fig. 2) corroborates the activation of enzymes implicated in ethylene biosynthesis seen in the cantaloup [10]. Ethylene production was longer lasting than that described elsewhere [3, 4, 6], due to our experimental conditions (stage, temperature, wounding intensity) and to negative feedback regulation of synthesis [11, 12]. Triggering of autocatalysis is possible with elevated residual ACC and EFE

levels, without previous initiation. Wound-acceleration of ripening, similar to that seen in wounded fruits [13], was not analyzed for tomato discs in previous studies [3, 4] because of the higher temperature employed.

The disc behaviour observed here suggests a direct stress-ethylene effect on ripening. The influence of wounding on avocado discs was compared to the effect of an exogenous ethylene pulse [12]. Both effects depended on the duration of tissue-ethylene contact. Wound-induced accumulation of mRNAs can be partly prevented by several inhibitors of the hormone [11, 16]. Ethylene-dependent synthesis accounts for a relatively small proportion of the wound-

induced RNA pool [11], but ethylene-induced genes are involved in ripening activation. Physiological development is regulated by ACC synthase, whether encoded by wounding- or ripening-specific genes [17], and probably in a similar way by EFE, expression of which is also controlled by a multigene family [15].

In conclusion, pericarp discs under our experimental conditions provide a model suitable for the study of both wounding-stress and ripening. In particular, this model allows in-depth analysis of tissular sensitivity to ethylene and to the action of inhibitors, for different cases of hormone elicitation. ▲

L'étude de la maturation à partir de tomates vertes est souvent délicate du fait de l'hétérogénéité des fruits à ce stade. Celui-ci est, en effet, couramment divisé en 4 sous-stades d'évolution interne du fruit [1, 2] qui correspondent à un contenu localaire compact (V1), à l'apparition de gelée dans une loge (V2) ou dans la totalité des loges (V3) et à un début de coloration de cette gelée (V4). L'utilisation de disques de péricarpe permet de déterminer avec précision le stade initial de maturité et de limiter la variabilité du matériel végétal également liée à sa structure complexe [2]. La maturation de ces disques est de plus citée comme très comparable à celle des fruits entiers [3, 4].

Le travail présenté dans cet article a pour objectif de souligner l'importance des conditions expérimentales dans la comparaison de la maturation des disques et du fruit. L'influence de la blessure, et spécifiquement celle de l'éthylène de blessure, sur l'évolution des disques est analysée.

Matériel et méthodes

Les tomates utilisées (*Lycopersicon esculentum* Mill., variété Capello), provenant de cultures sous serre, sont baignées rapidement dans une solution d'hypochlorite de sodium (300 ppm) puis essuyées. Les disques sont prélevés à l'emporte-pièce (diamètre 8 mm) sur une bande équatoriale du péricarpe. Les zones délimitant les loges du fruit sont éliminées afin d'obtenir des disques d'épaisseur homogène. Après essuyage, les disques sont disposés, épiderme vers le bas, dans des enceintes en verre (environ 70 disques par enceinte). L'ensemble des manipulations s'effectue en conditions stériles. Les enceintes sont placées à 15 °C, à l'obscurité, sous un balayage d'air filtré (débit 0,4 l . h⁻¹) saturé en eau. Des fruits entiers sont également mis individuellement dans des bocal, dans les mêmes conditions (débit 1 l . h⁻¹).

L'éthylène émis est dosé par chromatographie en phase gazeuse au cours du balayage des enceintes (Fig. 1A) ou après un confinement de 30 min (Fig. 2A). Le CO₂ respiratoire dégagé est analysé en continu par absorption de rayonnement infrarouge. Pour la mise en évidence d'une activité photosynthétique des disques, une enceinte a été soumise à un éclairage de 18 μmol . m⁻² . s⁻¹ durant 6 h par jour. Des prélèvements échelonnés de disques et de fruits sont réalisés pour les dosages biochimiques. L'activité de l'enzyme formant l'éthylène (EFE) est mesurée classiquement *in vivo* en présence de cycloheximide (0,4 mM) et d'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique

(ACC) (2 mM) [5]. L'ACC et l'ACC synthétase sont extraits et dosés comme décrit par [1] et [6].

Résultats

La Figure 1A montre l'évolution à 15 °C de la production d'éthylène de disques de péricarpe et de fruits entiers, à partir d'un même lot de tomates vertes. La préparation des disques a permis de les séparer en deux populations en fonction des stades initiaux V2 et V3. Après une rapide et importante production d'éthylène de blessure, les disques présentent une crise d'éthylène climactérique typique, avec un maximum à 8 jours (stade V3) ou 12 jours (stade V2). Pour les fruits, on obtient également deux évolutions type (maxima à 18 et 23 jours) qui, comparativement aux disques, doivent correspondre aux stades V3 et V2. Pour ces deux stades considérés, les courbes mettent en évidence une maturation nettement accélérée des disques, de 10 à 11 jours, avec des niveaux d'éthylène 4 à 5 fois supérieurs à ceux des fruits.

La Figure 1B présente un comportement analogue des disques pour l'émission de CO₂ respiratoire (stade V3). Dans une série parallèle éclairée périodiquement (résultats non présentés), les disques, à la différence des fruits, ont une respiration apparente qui diminue aussitôt fortement (55 % au stade Vert). Cependant, la production d'éthylène n'est pas modifiée significativement par cette activité photosynthétique des disques quantifiée indirectement, activité qui décroît avec l'avancement de la maturation. Il est intéressant également de souligner la plus grande résistance aux attaques fongiques des disques éclairés régulièrement.

La biosynthèse de l'éthylène de blessure de disques au stade V1 est décrite par la Figure 2. La production d'éthylène est maximale environ 16 h après la blessure et elle approche de sa valeur initiale après 45 h (Fig. 2A). La courbe concernant l'EFE montre deux pics d'activité vers 8 et 20 h et le maintien d'un niveau assez élevé après 2 jours (Fig. 2A). Les évolutions de l'activité ACC synthétase et de la teneur en ACC sont comparables à celle de l'émission d'éthylène, avec des maxima vers 16 et 20 h respectivement (Fig. 2B). Il faut noter toutefois que la teneur en ACC reste importante (3 nmol.g⁻¹) 45 h après la blessure. Une évolution similaire de la biosynthèse est obtenue avec des disques au stade V2. Une variabilité de l'intensité de production d'éthylène dans le rapport 1 à 3 est remarquée (voir Fig. 1A et 2A) en concordance avec les activités enzymatiques mesurées, dans le sens d'une plus grande réactivité du stade le plus immature (fin de croissance).

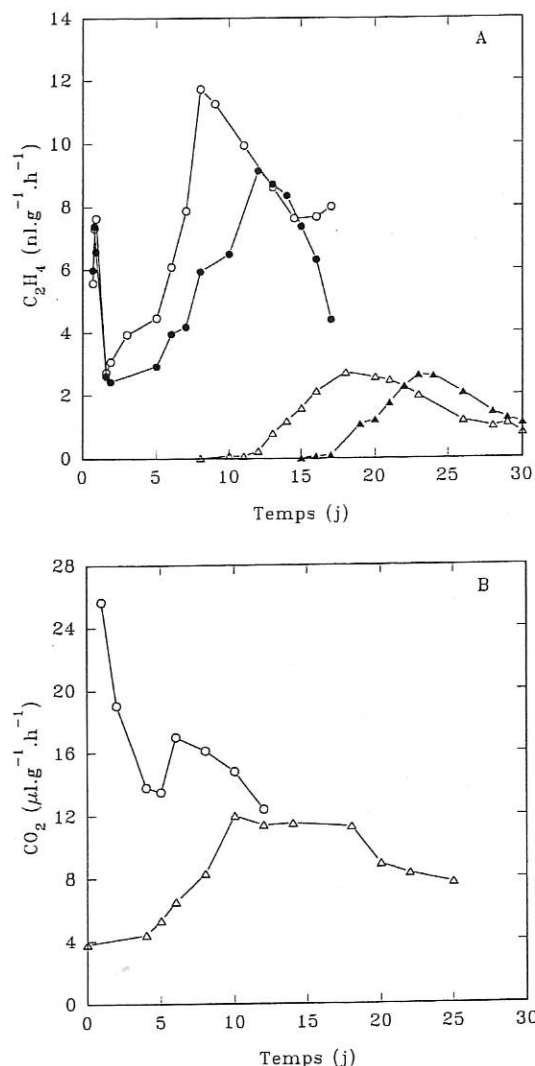


Figure 1. Comparaison des émissions d'éthylène (A) et de gaz carbonique (B) de disques de péricarpe de tomate (●, ○) et de fruits entiers (▲, △) au cours de la maturation à 15 °C. Les courbes correspondent aux mesures effectuées sur une enceinte renfermant 70 disques ou sur 3 fruits (courbe type) choisis à un stade initial vert V2 (●, ▲) ou V3 (○, △).

Le Tableau 1 compare la biosynthèse d'éthylène au cours de la maturation à 15 °C de disques de péricarpe et de tomates (stade initial V3). Globalement, l'évolution est identique pour les deux matériels avec un maximum de production d'éthylène climactérique observé aux stades Orange-Vert (OV) à Orange (O). Les teneurs en ACC et les activités ACC synthétase augmentent fortement entre les deux stades extrêmes, avec un léger pic au stade OV ; les activités EFE évoluent plus directement en parallèle avec les crises d'éthylène (maximum au stade O).

Par contre, la biosynthèse d'éthylène des disques est intensément activée pour tous les paramètres suivis aux différents stades. Cette différence est particulièrement accentuée dès la première phase, les niveaux des activités enzymatiques des disques au stade Vert après blessure étant déjà bien supérieurs à ceux des fruits initiés (stade Vert-Orange). L'évolution de biosynthèse apparaît

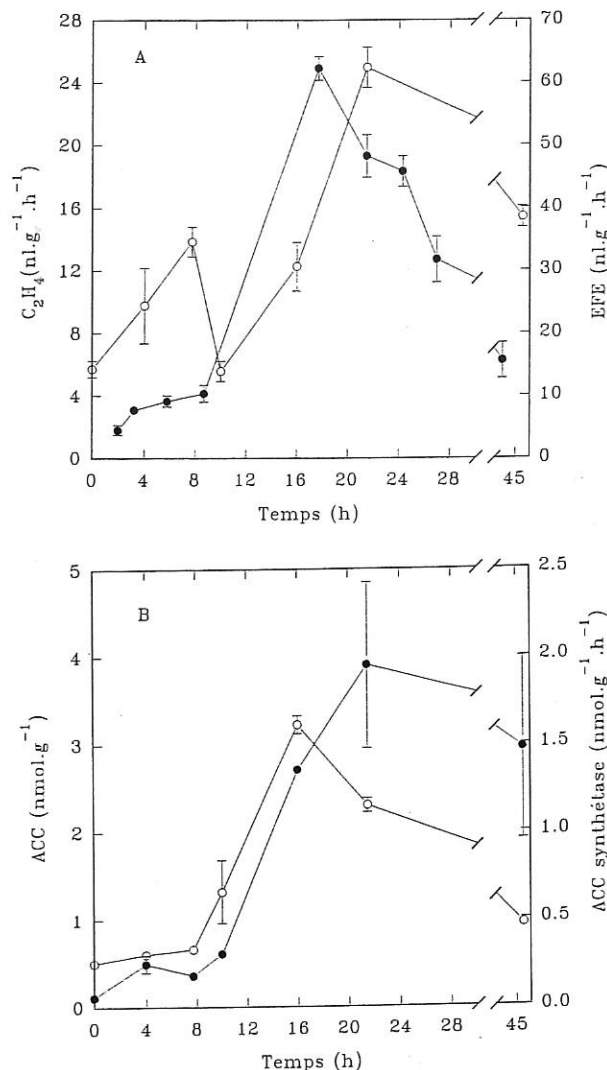


Figure 2. Biosynthèse de l'éthylène de blessure de disques de péricarpe de tomate. A : Production d'éthylène (●) et activité de l'EFE (○). B : Teneur en ACC (●) et activité ACC synthétase (○). Les valeurs correspondent aux moyennes (± erreur standard de 2 répétitions d'échantillonnage) des mesures effectuées à 15 °C sur des disques au stade initial vert V1.

beaucoup moins progressive pour les disques que pour les fruits entiers. Une autre différence entre ces deux matériels se situe au stade Rouge sombre, jamais atteint par les disques, qui est caractérisé pour les fruits par deux comportements possibles. Certains fruits en cours de sénescence produisent peu d'éthylène, d'autres ont une seconde crise (valeur entre parenthèses) qui dépend directement du maintien d'une activité de l'EFE suffisante.

Discussion

L'étude générale confirme que le déroulement de la maturation des disques sans incubation en solution est complet et homogène. L'éclaircissement des disques, proposé par certains auteurs [3], est apparu comme pouvant influencer sur divers paramètres. Les mesures respiratoires et *a priori* celles de production d'éthylène doivent tenir compte d'une activité photosynthétique des fruits verts [7] qui,

Tableau 1

Évolution comparée de la biosynthèse d'éthylène de disques de pélicarpe de tomate et de fruits entiers, au cours de la maturation à 15 °C

Stades de maturité	Disques				Fruits			
	C ₂ H ₄	ACC	ACC synth.	EFE	C ₂ H ₄	ACC	ACC synth.	EFE
Vert	2,72	0,98 ± 0,34	0,15 ± 0,01	12,8 ± 0,6	0,07	0,05 ± 0,02	0,21 ± 0,08	6,4 ± 1,0
Vert-Orange . . .	6,08	2,94 ± 0,45	1,63 ± 0,16	38,5 ± 3,7	1,17	0,12 ± 0,03	0,21 ± 0,01	18,6 ± 1,8
Orange-Vert . . .	11,71	4,03 ± 1,05	2,19 ± 0,96	41,2 ± 23,6	2,12	0,45 ± 0,06	0,55 ± 0,16	34,8 ± 15,7
Orange	9,93	2,92 ± 0,65	2,10 ± 1,39	44,7 ± 7,5	2,72	0,41 ± 0,06	0,50 ± 0,02	39,7 ± 8,2
Rouge	7,67	6,58 ± 0,16	2,98 ± 0,77	18,8 ± 2,7	1,08	0,79 ± 0,22	0,70 ± 0,60	8,4 ± 5,0
Rouge sombre . .	—	—	—	—	1,6 (4,8)	1,94 ± 0,32	1,22 ± 0,53	7,9 ± 3,7

ACC (nmol.g⁻¹), activité ACC synthétase (nmol.g⁻¹.h⁻¹), activité EFE (nl.g⁻¹.h⁻¹) : moyennes ± erreur standard de 2 mesures (disques) ou 3 mesures (fruits). C₂H₄ (nl.g⁻¹.h⁻¹) : voir Fig. 1 A, stade V3 ; (4, 8) : production maximale d'éthylène observée pour certains fruits sénescents.

pour les disques, est amplifiée considérablement par le rapport surface/volume du matériel. Il est observé un effet stimulateur ou inhibiteur de la lumière sur la production d'éthylène d'autres organes [8]. Si dans nos conditions expérimentales aucune modification significative n'est mesurée, ce résultat doit s'expliquer par un équilibre entre la stimulation directe de l'EFE, dépendante de l'intensité lumineuse et de l'activité photosynthétique, et l'inhibition essentiellement due à la baisse de la teneur en CO₂ du milieu ambiant. Néanmoins, les conditions de lumière continue peuvent être favorables à une meilleure survie des disques ayant une synthèse accrue de tomatine (alcaloïde glycosidique anti-pathogènes) et une augmentation des teneurs en sucres [9].

La réponse des disques de tomate à la blessure confirme l'activation des enzymes de la biosynthèse d'éthylène mise en évidence sur le melon [10]. La production d'éthylène plus durable que celle décrite [3, 4, 6] est certainement liée à la température d'expérience plus basse, à un stade initial moins avancé et aussi à une blessure moins intense [6]. Toutefois, le premier pic d'activité de l'EFE correspond bien à la réponse plus précoce obtenue par ces auteurs. Ces différences peuvent aussi s'expliquer par l'intervention d'une autoinhibition qui est reconnue réguler la production d'éthylène de blessure à l'inverse du processus d'autocatalyse de maturation [11, 12].

Les mêmes conditions expérimentales ont permis de mieux dissocier la phase ultérieure de maturation des disques, marquée par des productions d'éthylène et de CO₂ très supérieures à celles des fruits [3, 4], et qui s'accompagne, comme il est démontré, par des activités enzymatiques stimulées. Cela ne provient pas du fait que les disques sont constitués de pélicarpe car celui-ci est peu producteur comparativement aux autres tissus de la tomate [2, 6]. La stimulation des synthèses pourrait plutôt être liée à l'isolement du pélicarpe dans la mesure où il intervient pour le fruit entier une autorégulation de l'éthylène par les parties centrales. L'influence *a posteriori* de la blessure sur la maturation apparaît finalement primordiale en permettant l'enclenchement du processus d'autocatalyse à partir des niveaux très élevés d'ACC et d'EFE résiduels, sans initiation préalable. Il en résulte un fort avancement

de la maturation des disques par la blessure, comparable à celui rapporté pour des fruits entiers [13]. Ce résultat n'avait pas pu être analysé sur les disques de tomates à une température plus élevée [3, 4] qui provoque une évolution des fruits trop rapide et donc un faible décalage de maturation entre les deux matériels.

Aux stades climactérique et postclimactérique, l'évolution générale de la biosynthèse d'éthylène des disques et des tomates est classique [1, 6, 14], avec en particulier des teneurs en ACC importantes au stade Rouge. Cette accumulation d'ACC provient de la baisse d'activité de l'EFE, en relation avec la perte d'intégrité des membranes [14]. Contrairement à ce résultat, nous observons dans certains cas un pic d'éthylène de sénescence, dépendant d'un meilleur état membranaire et qui peut être une réponse à une attaque fongique indécelée [15].

Le comportement des disques dans nos expériences suggère un effet direct de l'éthylène de stress sur la maturation. Pour des disques d'avocat, l'influence de la blessure a été comparée à celle d'un traitement par de l'éthylène exogène, les deux modes d'action étant fonction de la durée du contact du tissu avec l'éthylène [12]. Il est acquis que la blessure provoque l'accumulation d'ARN messagers dont une partie peut être réprimée par différents inhibiteurs de l'hormone [11, 16]. Même si ces synthèses liées à l'éthylène représentent une fraction relativement faible de l'ensemble des ARN de blessure [11], elles rendent compte de l'activation de la maturation. Un contrôle de l'évolution physiologique s'exerce donc par l'ACC synthétase, que le gène d'expression soit celui de blessure ou celui de maturation [17], et sans doute de façon similaire par l'EFE pour laquelle il est démontré aussi l'existence d'une famille de gènes [15].

En conclusion, dans les conditions expérimentales définies, les disques de pélicarpe sont un modèle adapté à la fois à l'étude du stress de blessure et à celle de la maturation. Ce modèle peut permettre en particulier une analyse approfondie de la sensibilité des tissus à l'éthylène et de l'action d'inhibiteurs, pour différents cas d'éllicitation de l'hormone. ▼

Remerciements : ce travail a bénéficié de l'appui financier de l'Air Liquide et de la CEE (projet Eclair AGRE-0015). Les auteurs expriment leur gratitude au Dr C. Rothan (INRA) pour sa collaboration dans ce programme, ainsi qu'au Dr P. Flandre pour son aide.

RÉFÉRENCES

1. Su L. Y., McKeon T., Grierson D., Cantwell M., Yang S. F. 1984. Development of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and polygalacturonase activities during the maturation and ripening of tomato fruit. *HortScience* 19: 576-8.
2. Brecht J. K. 1987. Locular gel formation in developing tomato fruit and the initiation of ethylene production. *HortScience* 22: 476-9.
3. Geelen T. A. M., Varga A., Peeters J., Bruinsma J. 1988. A pericarp disc system as a bio-assay for tomato fruit ripening. *J. Plant Physiol.* 133: 107-9.
4. Campbell A. D., Huysamer M., Stotz H. U., Greve L. C., Labavitch J. M. 1990. Comparison of ripening processes in intact tomato fruit and excised pericarp discs. *Plant Physiol.* 94: 1582-9.
5. Rothan C., Gaillard F., Moras P., Nicolas J. 1990. Mode d'action du CO₂ sur la synthèse de l'éthylène chez le kiwi. In: *La maîtrise de la qualité des fruits frais, 9^e colloque sur les recherches fruitières*. Paris : INRA, CTIFL, 329-39.
6. Kende H., Boller T. 1981. Wound ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in ripening tomato fruit. *Planta* 151: 476-81.
7. Piechulla B., Glick R. E., Bahl H., Melis A., Grisse W. 1987. Changes in photosynthetic capacity and photosynthetic protein pattern during tomato fruit ripening. *Plant Physiol.* 84: 911-7.
8. Zacarias L., Tudela D., Primo-Millo E. 1990. Stimulation of ACC-dependent ethylene production in citrus leaf discs by light. *Physiol. Plant.* 80: 89-94.
9. Bompeix G. 1993. Communication personnelle.
10. Hoffman N. E., Yang S. F. 1982. Enhancement of wound-induced ethylene synthesis by ethylene in preclimacteric cantaloupe. *Plant Physiol.* 69: 317-22.
11. Henstrand J. M., Handa A. K. 1989. Effect of ethylene action inhibitors upon wound-induced gene expression in tomato pericarp. *Plant Physiol.* 91: 157-62.
12. Starrett D. A., Laties G. G. 1991. Involvement of wound and climacteric ethylene in ripening avocado discs. *Plant Physiol.* 97: 720-9.
13. Fleuriot A., Macheix J. J. 1975. Relations entre la maturation accélérée de fruits blessés et leur teneur en composés phénoliques. In: *Facteurs et régulation de la maturation des fruits*. Colloque international CNRS n° 238. Paris: CNRS, 147-52.
14. Hoffman N. E., Yang S. F. 1980. Changes of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid content in ripening fruits in relation to their ethylene production rates. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 105: 492-5.
15. Cooper W., Bouzayen M., Barry C., Hamilton A. J., Rossal S., Grierson D. 1993. Molecular and physiological characterisation of the role of ethylene during pathogen attack of tomato fruit. In: Pech J. C., Latche A., Balague C., eds. *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Pub., 259-60.
16. Mattoo A. K., Li N., Liu D. 1993. Tomato ACC synthase : regulation of gene expression and importance of the C-terminal region in enzyme activity. In: Pech J. C., Latche A., Balague C., eds. *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene*. Dordrecht, Boston, London : Kluwer Academic Pub., 223-31.
17. Yip W. K. 1993. Characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase isozymes (genes) in tomato. In: Pech J. C., Latche A., Balague C., eds. *Cellular and Molecular Aspects of the Plant Hormone Ethylene*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Pub., 13-8.