

## Effets comparés du vieillissement naturel et accéléré sur les semences d'orge (*Hordeum vulgare* L.)

A. COIN<sup>1</sup>, L. VAISSIERE<sup>1</sup>, M. NOIROT<sup>1</sup>, A. CHARRIER<sup>2</sup> et S. HAMON<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM, 911, avenue Agropolis, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex 1, France

<sup>2</sup> Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier, 2, place Viala, 34060 Montpellier Cedex 1, France

(Accepted March 1995)

### Summary

The effects of an accelerated ageing (AA) treatment were studied on barley seeds (*Hordeum vulgare* L.) and compared with those of an ageing occurring during storage in a cold chamber (4°C) for thirty years. Four days of AA (42°C, 100% relative humidity) showed a decrease in the germination speed and rate, a slowing down of seedling growth and an increasing appearance of abnormal seedlings. Seeds of seven varieties in storage for thirty years (4°C, 30% relative humidity) kept a very good capacity to germinate (more than 95% germination rate). The variety 'Atlas grain nu' (naked grain variety) lost 30% of germinative capacity and was the more sensitive to AA. Furthermore the AA treatment did not show any biochemical modification in the quantity or quality of peroxidase isozymes. Natural ageing showed differences: one among the isozymes disappeared or was less important depending on the variety tested. The use of AA tests as a predictive test for seed storage ability is discussed.

### Résumé

Les effets d'un vieillissement accéléré (VA) sont étudiés avec des semences d'orge (*Hordeum vulgare* L.) et comparés à ceux d'un vieillissement naturel au cours d'un stockage à 4°C depuis une trentaine d'années. Le vieillissement accéléré (42°C et 100% d'humidité relative) se manifeste, après quatre jours de traitement, par une diminution de la vitesse et du taux de germination, un ralentissement de la croissance des plantules et l'apparition de plantules anormales. Les semences de sept variétés, conservées depuis trente ans à 4°C et 30% d'humidité relative, ont gardé une très bonne aptitude à la germination (supérieure à 95%). Seule, la variété Atlas à grain nu a perdu 30% de faculté germinative et réagit le plus vite au VA. Le vieillissement accéléré n'entraîne aucune modification biochimique qualitative ou quantitative des isozymes de peroxydases. En revanche, les zymogrammes de peroxydases des semences conservées depuis trente ans sont différents de ceux des semences récentes. Pour certains variétés, un électromorphe s'exprime avec une intensité plus faible et disparaît pour les autres variétés. L'utilité des tests de VA comme prédicteurs de la capacité à la conservation est discutée.

### Introduction

La sauvegarde de la diversité phytogénétique des plantes cultivées est réalisée essentiellement par les banques de gènes (Williams, 1984). Pour de nombreuses espèces, no-



tamment les céréales, la conservation à long terme se fait par stockage de grains à faible teneur en eau à 5°C et 20% d'humidité relative (Roberts, 1972). Il se produit néanmoins, durant cette période, des dégradations qui entraînent une perte de viabilité des semences. Elles se traduisent par une capacité de germination réduite ou perdue (Priestley, 1986). En dehors du simple essai de germination, différents tests de vigueur et de viabilité existent. On peut citer le test de croissance et d'appréciation des plantules, le test au tétrazolium, la mesure de la conductivité électrique, le test au froid... (AOSA, 1983; Perry, 1987). Ces approches pourraient être optimisées par la mise en évidence de marqueurs biochimiques précoces et fiables de l'aptitude à la germination. Roberts (dans Ellis, Roberts et Whitehead, 1980) a développé sur l'orge une équation prédictive de la longévité des semences en fonction des conditions climatiques de stockage. Des nomogrammes de viabilité sont ainsi disponibles. La dégradation de la capacité germinative des semences apparaît comme résultant d'altérations cellulaires, biochimiques et moléculaires. L'organisation membranaire est perturbée, provoquant une fuite de solutés (Parrish et Leopold, 1978). Ceci pourrait être la conséquence de la formation de radicaux libres (Osborne, 1980; Wilson et McDonald, 1986) ou de la peroxydation des lipides (Gidrol, Serghini, Noubhani, Mocquot et Mazliak, 1989; Stewart et Bewley, 1980). Le vieillissement peut s'accompagner d'aberrations chromosomiques (Murata, Roos et Tsuchiya, 1981) ainsi que d'altérations de la biosynthèse des protéines (Cherry et Skadsen, 1986; Gidrol, Noubhani et Pradet, 1990). La capacité de l'embryon à synthétiser des enzymes, pour la mobilisation des réserves au moment de la germination, est réduite (Roos, 1980). De nombreuses études ont mis en évidence une corrélation entre la perte de vigueur et une réduction des activités de synthèse des acides nucléiques et des protéines dans les semences âgées (Abdul-Baki et Chandra, 1977). Certaines enzymes, comme les déshydrogénases, les amylases ou les lipases, voient leur activité diminuée chez des semences âgées. A l'opposé, quelques études suggèrent que des activités enzymatiques peuvent augmenter pendant la détérioration des semences. C'est le cas de la  $\beta$  amylase chez le soja, de certaines protéinases chez le blé, le sorgho et le pois et des ribonucléases chez le pois (Priestley, 1986). Plusieurs enzymes ont été étudiées en vue d'établir des tests quantitatifs de viabilité et de vigueur (Roos, 1986). Les résultats étant très variables, même entre cultivars, il est difficile de savoir si ces variations d'activité enzymatique sont l'une des causes ou l'une des conséquences d'une perte de viabilité (Roos, 1989). Par ailleurs, peu d'études concernent les changements qualitatifs (présence/absence) des isozymes (Priestley, 1986).

Selon Delouche et Baskin (1973), un moyen rapide de déterminer la qualité d'un lot de semences est de le soumettre à un vieillissement accéléré (VA). Il consiste à placer les semences pendant quelques jours (jusqu'à huit jours selon les espèces) dans des conditions de température élevée (40°C–45°C) et dans une atmosphère à forte humidité relative (80%–100%). Une variante de ce test, basée sur le même principe, consiste à augmenter la teneur en eau des semences avant de les placer à température élevée; c'est le test de détérioration contrôlée (Powell et Matthews, 1981). Ces tests posent l'hypothèse que les processus de détérioration se produisant lors du VA sont similaires à ceux existant dans des conditions normales de conservation, mais le niveau de détério-

ration est énormément accentué (Delouche et Baskin, 1973). Mais ceci a été mis en doute par Powell et Harman (1985).

Cet article présente les effets d'un vieillissement accéléré sur la qualité germinative des semences d'orge (*Hordeum vulgare* L.) (taux et vitesse de germination, aspect des plantules) et sur la variation qualitative du système enzymatique des peroxydases. Une comparaison avec le comportement de semences soumises à une longue conservation (trente ans à 4°C, 30% d'humidité relative) est examinée.

## Matériel et méthodes

### *Matériel végétal*

Les semences de huit variétés d'orge (*Hordeum vulgare* L.), conservées à 4°C et 30% d'humidité relative, ont été fournies par la Chaire de Phytotechnie de l'École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier. Dès leur réception au laboratoire, elles ont été placées dans des sachets en papier kraft et conservées à l'obscurité dans une chambre à 4°C et 20% d'humidité relative. Pour sept variétés, nous disposions de deux récoltes, l'une datant d'une trentaine d'années (1965) et l'autre intermédiaire (de 1978 à 1987) (Tableau 1). Pour six variétés, nous possédions des récoltes récentes (1990–1991). Les semences de quatre d'entre elles ont été soumises à un vieillissement accéléré.

### *Vieillessement accéléré*

Avant de subir un vieillissement accéléré, les semences ont été traitées par un fongicide à base d'oxyquinoléate de cuivre (Cuprolate Plus). Elles ont été ensuite déposées sur un support grillagé en acier galvanisé (de maille 1,49 mm), dans une boîte en plastique 'Sercobox' de 15 × 15 × 13 cm contenant au fond 400 ml d'eau désionisée afin de maintenir une humidité saturante. Les boîtes ont été hermétiquement fermées et placées dans une étuve (Jouan, n°185) maintenue à 42°C. Neuf durées de traitements, allant de zéro à huit jours (VA0 à VA8), ont été appliquées à la variété Fedora qui sert de témoin. Les essais de VA ont été mis au point avec des semences de cette variété dont nous disposions d'un lot important. Les lots avaient alors un taux de germination compris entre 100% (VA1) et 0% (VA8). Les variétés Atlas grain nu, Beecher et Nympe (récolte 1991) ont subi dans les mêmes conditions deux, quatre, six et huit jours de VA. Après ce traitement, les activités métaboliques ont été arrêtées en plaçant les semences dans un congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation.

### *Essais de germination et critères utilisés*

Les essais de germination ont été réalisés à l'obscurité dans une étuve (Firlabo EBT-E-EJN 430) maintenue à 20°C, à raison de 200 semences par analyse. Vingt-cinq semences ont été réparties au hasard dans huit boîtes de Petri en plastique de 90 mm de diamètre, sur une couche de coton surmontée d'un papier filtre (Macherey-Nagel MN713) et humidifiée par 25 ml d'eau désionisée. Les taux de germination ont été calculés après dix jours d'imbibition. Cinq critères ont été utilisés pour décrire l'évolution du taux de germination des semences:

- TG1J: Taux de Germination après 1 Jour d'imbibition;
- DDG: jour où la première semence a germé (codé Date de Début de Germination);
- DGM: jour où le nombre maximal de semences a germé (codé Date de Germination Maximale);
- TGF: Taux de Germination Final après dix jours d'imbibition;
- VITS: vitesse de germination ( $VITS = TGF/DGF-DDG$ ).

#### *Suivi de la croissance des plantules*

La croissance des différents organes a été mesurée huit jours après l'émergence de la radicule à travers les enveloppes. La longueur de la racine la plus longue, du coléoptile et de la feuille est exprimée en mm. Le nombre de racines par plantule a aussi été compté.

#### *Analyse des isoenzymes de peroxydases sur gel d'amidon*

Quatre stades de développement ont été définis au cours de la germination: le grain sec (stade 1), le grain germé (stade 2, où la radicule, longue de deux à trois millimètres, a percé les enveloppes), la jeune plantule possédant un coléoptile de 15 à 20 mm mais sans feuille développée (stade 3) et la plantule ayant une feuille de 50 à 60 mm (stade 4).

Le même procédé d'extraction a été utilisé pour les semences sèches et les semences germées se trouvant à différents stades de développement. L'extrait brut des protéines a été effectué par broyage à 0°C de dix semences dans un mortier dans un tampon phosphate 0,2 M pH 6,5. Les broyats ont été ensuite centrifugés (tubes Greiner à bouchon de 12 ml) à 2800 g (Beckman GS-6R) pendant 15 minutes. Le surnageant a été conservé à -80°C avant analyse. Les échantillons sont utilisés directement après le réchauffement et ne sont jamais recongelés. L'électrophorèse a été réalisée sur gel d'amidon horizontal à 14% selon la méthode de Smithies (1955) modifiée par Second et Trouslot (1980), dans un tampon gel histidine pH 7 et un tampon cuve acide citrique-soude pH 7 selon le système de Brewer (1970). La migration se fait sur plaque réfrigérée à 4°C sous un courant de 35 mA pendant la première demi-heure, puis de 50 mA jusqu'à ce que le témoin bleu de bromophénol atteigne l'extrémité anodique du gel (quatre à cinq heures de migration). La révélation des peroxydases se fait par du 3-amino-9-éthyl carbazole selon le système de Shaw et Prasad (1970).

#### *Méthodes statistiques*

Le  $\chi^2$  de Pearson a été utilisé pour estimer les différences de taux de germination des semences des récoltes anciennes et des récoltes récentes. Pour les variables quantitatives, l'effet des traitements a été évalué par l'analyse de variance à un critère fixe de classification. Lorsque ces effets se sont avérés significatifs, une comparaison multiple des moyennes par le test de Newman et Keuls a été réalisée. L'analyse en composantes principales (ACP) a été utilisée pour décrire les variations de la germination au cours du temps d'imbibition chez la variété Fedora. L'analyse factorielle des correspondances (AFC) a été choisie pour décrire les variations de fréquences observées dans les distributions des différentes variables mesurées sur la plantule.

## Résultats

### 1. Effets du vieillissement accéléré sur la germination

Les effets du vieillissement accéléré ont été décrits avec la variété Fedora (Figure 1). Le taux de germination des semences non traitées est de 99,8%. Des traitements de VA de plus en plus longs entraînent une diminution de plus en plus importante du taux de germination, avec une chute nette après cinq jours de VA (taux de germination inférieur à 50%). Une analyse en composantes principales sur les cinq variables utilisées pour décrire la germination a montré que 70,6% de la variabilité est expliquée par un seul facteur. Celui-ci associe de forts taux de germination finale (TGF:  $r = 0,907$ ) et une vitesse de germination élevée ( $r = 0,860$ ) à une germination précoce (date de début de germination, DDG:  $r = -0,908$ ; date de germination maximale, DGM:  $r = -0,913$ ). Il représente donc la capacité germinative des semences. Notons aussi que les valeurs du TGF sont très bien expliquées par une relation de type logistique avec la date de début de germination (Figure 2); en revanche, les variations de TG1J sont indépen-

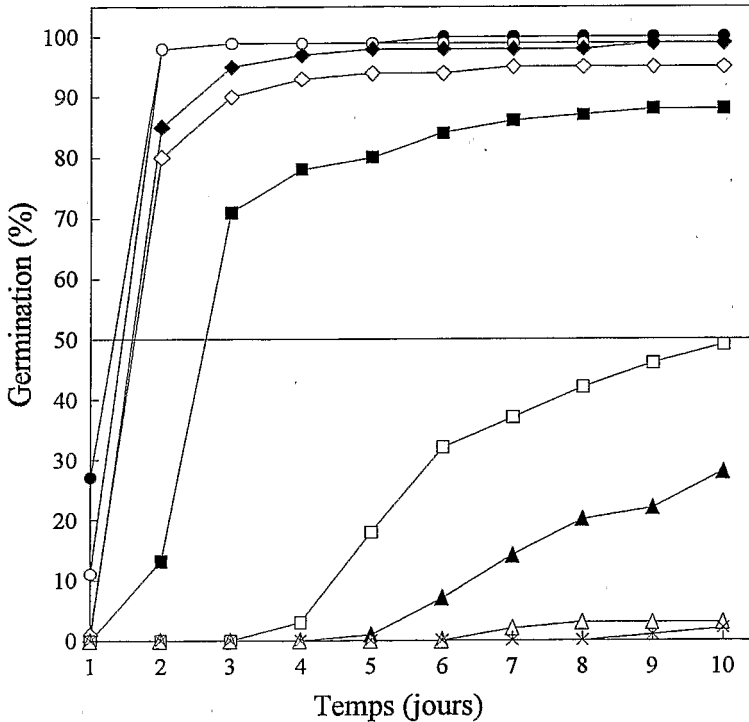


Figure 1. Effet de la durée du vieillissement accéléré (VA: 42°C, humidité saturante) sur la germination à 20°C des semences de la variété Fedora (récolte 1990). Pourcentages cumulés de germination en fonction des temps d'imbibition. (●): témoin; (○): 1 j VA; (◆): 2 j VA; (◇): 3 j VA; (■): 4 j VA; (□): 5 j VA; (▲): 6 j VA; (△): 7 j VA; (×): 8 j VA.

Tableau 1. Liste des lots de semences d'orge (*Hordeum vulgare* L.) utilisés tels quels ou subissant un VA\*.

Catégorie arbitraire	Année de récolte	Variétés							
		Fedora	Ager	Atlas grain nu	Atlas 46	Aurore	Beecher	Himalaya	Nympe
Agée	1965	-	X	X	X	X	X	X	X
Intermédiaire	1978	-	-	-	-	-	-	X	-
	1984	-	-	-	X	-	-	-	-
	1985	-	X	-	-	-	-	-	-
	1987	-	-	X	-	-	-	-	-
Récente	1990	X*	-	-	-	-	-	-	-
	1991	-	-	X*	X	X	X*	-	X*

dantes. De ce fait, la comparaison des courbes de germination peut se résumer à l'étude de TG1J et TGF. Un effet significatif du premier jour de VA est observé sur le taux de germination initial (TG1J): 26,5% vs 11,3% respectivement pour VA0 et VA1. Pour les autres traitements, le TG1J est nul ou quasi-nul (Tableau 2). Le taux de germination final (TGF) évolue fortement avec la durée du vieillissement accéléré. Du premier au troisième jours de VA, aucun effet significatif n'est enregistré. Une diminution haute-

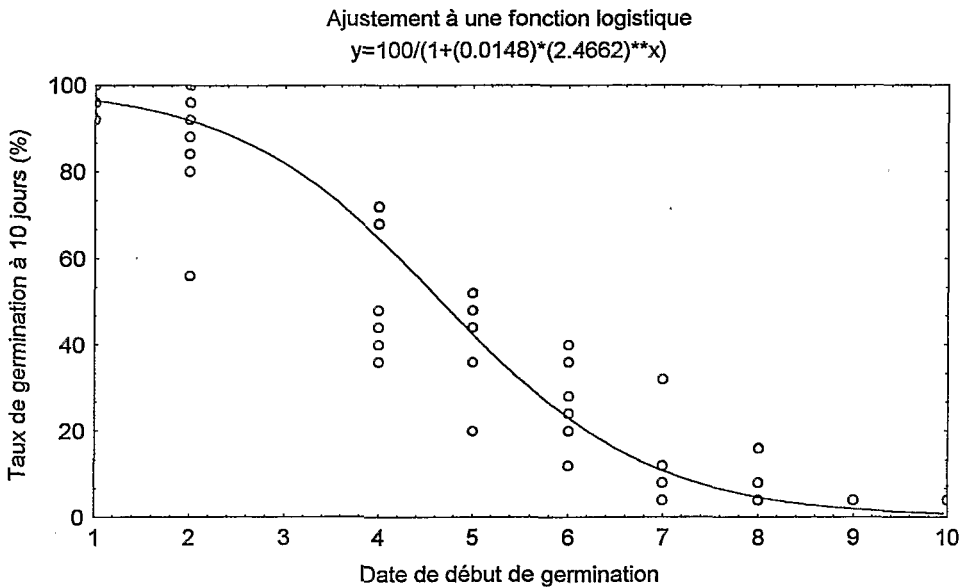


Figure 2. Relation entre le taux de germination après 10 jours d'imbibition (TGF) et la date de début de germination pour des semences de la variété Fedora (récolte 1990) vieillies artificiellement pendant un à huit jours. Proportion de variance expliquée  $r^2 = 0,94$ .

EFFETS COMPARÉS DU VIEILLISSEMENT NATUREL ET ACCÉLÉRÉ CHEZ L'ORGE

Tableau 2. Moyenne des différentes variables mesurées et seuil de signification à 5% pour la germination et la croissance des plantules chez la variété Fedora (récolte 1990). Les lettres placées en exposant donnent les résultats de comparaison des moyennes par le test de Newman et Keuls. TG1J: Taux de Germination après 1 jour d'imbibition; TGF: Taux de Germination Final après 10 jours d'imbibition.

	VA0	VA1	VA2	VA3	VA4	VA5	VA6	VA7	VA8	F	S
TG1J	26,5 <sup>a</sup>	11,3 <sup>b</sup>	0,0 <sup>c</sup>	1,3 <sup>c</sup>	0,0 <sup>c</sup>	0,0 <sup>c</sup>	0,0 <sup>c</sup>	0,0 <sup>c</sup>	0,0 <sup>c</sup>	22,9	***
TGF	99,8 <sup>a</sup>	99,3 <sup>a</sup>	98,5 <sup>a</sup>	95,3 <sup>a</sup>	88,3 <sup>b</sup>	48,8 <sup>c</sup>	27,5 <sup>d</sup>	3,3 <sup>e</sup>	1,5 <sup>e</sup>	744,2	***
Racine	166,9 <sup>a</sup>	150,6 <sup>abc</sup>	160,1 <sup>ab</sup>	153,7 <sup>ab</sup>	132,0 <sup>abcd</sup>	121,8 <sup>cd</sup>	106,7 <sup>d</sup>	136,5 <sup>abc</sup>	104,8 <sup>d</sup>	8,3	***
Coléoptile	52,1 <sup>a</sup>	41,4 <sup>b</sup>	42,0 <sup>b</sup>	49,0 <sup>c</sup>	41,3 <sup>b</sup>	45,2 <sup>b</sup>	44,0 <sup>b</sup>	28,1 <sup>d</sup>	20,4 <sup>e</sup>	84,3	***
Feuille	112,8 <sup>bc</sup>	122,1 <sup>ab</sup>	138,6 <sup>a</sup>	121,3 <sup>ab</sup>	118,1 <sup>b</sup>	119,5 <sup>b</sup>	96,5 <sup>c</sup>	102,5 <sup>bc</sup>	70,4 <sup>d</sup>	14,2	***
Nombre de racines	6,0 <sup>a</sup>	5,8 <sup>a</sup>	6,2 <sup>a</sup>	6,0 <sup>a</sup>	5,6 <sup>a</sup>	5,6 <sup>a</sup>	5,2 <sup>ab</sup>	4,7 <sup>b</sup>	2,5 <sup>c</sup>	23,0	***

ment significative de 12% est observée au quatrième jour de vieillissement. Du cinquième au septième jours les effets sont encore plus importants et le TGF n'est plus que de 3,3% le septième jour (Tableau 2). Des différences variétales de comportement lors du VA ont été mises en évidence. Chez les variétés Beecher, Nympe et Atlas grain nu, ce traitement entraîne aussi une chute de la capacité germinative (Figure 3). Les variétés Nympe et Beecher se comportent de la même manière que la variété Fedora (taux de germination de 98 et 100% respectivement après quatre jours de traitement), avec toutefois une chute légèrement plus forte entre quatre et six jours de VA. En revanche,

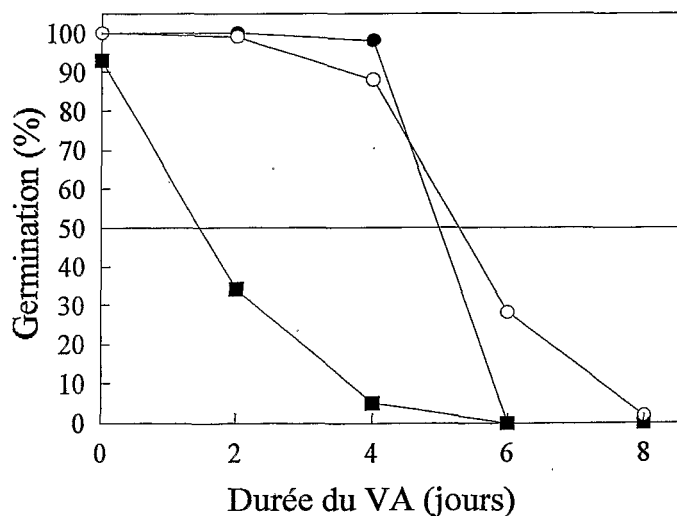


Figure 3. Effet du vieillissement accéléré (42°C, humidité saturante) sur le pourcentage de germination après 10 jours d'imbibition. (●): variétés Nympe et Beecher (récolte 1991); (○): variété Fedora (récolte 1990); (■): variété Atlas grain nu (récolte 1991).

la variété Atlas grain nu est plus sensible au vieillissement accéléré: la perte de viabilité se produit dès VA2, avec un taux de germination de 34%; après quatre jours de traitement, il n'est plus que de 5%.

## 2. Effets du vieillissement naturel sur la germination

Le Tableau 3 donne les taux de germination de semences de sept variétés, qui ont subi une conservation plus ou moins prolongée. Le taux final de germination après dix jours d'imbibition des semences anciennes n'est pas significativement différent de celui de la récolte récente et généralement supérieur à 90%. Une seule exception, la variété Atlas grain nu présente des taux de 72% en 1965 contre 94% en 1987 et 93% en 1991, mais non significativement différents. Après une conservation de trente ans (4°C, 30% d'humidité relative), les semences de ces différents lots ont une viabilité encore très élevée, correspondant à un niveau de germination obtenu après quatre jours de VA maximum pour les semences de la variété Fedora.

La germination après deux jours d'imbibition n'est pas affectée par l'âge des semences pour les variétés Nymphe et Beecher (Tableau 3); en revanche, pour toutes les autres variétés, les semences de l'année 1965 ont moins bien germé. Après quatre jours d'imbibition, seules deux variétés (Aurore et Atlas grain nu) présentent des taux de germination significativement différents entre récoltes ancienne et récente.

Tableau 3. Taux de germination à 20°C, après 2, 4 et 10 jours d'imbibition, des semences issues de lots âgés ou récents. Les différents lots correspondent à sept variétés d'orge. Les lettres placées en exposant donnent les résultats de comparaison de moyennes par le test de Newman et Keuls.

Variété	Age (ans)	Année de récolte	Effectif	Taux de germination (%) après		
				2 jours	4 jours	10 jours
Ager	30	1965	50	72 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
	10	1985	50	94 <sup>b</sup>	98 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
Atlas grain nu	30	1965	50	36 <sup>a</sup>	66 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>
	7	1987	50	86 <sup>b</sup>	94 <sup>b</sup>	94 <sup>a</sup>
	3	1991	100	85 <sup>b</sup>	91 <sup>b</sup>	93 <sup>a</sup>
Atlas 46	30	1965	75	76 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	10	1984	75	68 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>
	3	1991	100	88 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Aurore	30	1965	100	52 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>
	3	1991	50	100 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
Beecher	30	1965	75	64 <sup>a</sup>	96 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>
	3	1991	100	71 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Himalaya	30	1965	50	4 <sup>a</sup>	78 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>
	17	1978	50	42 <sup>b</sup>	74 <sup>a</sup>	84 <sup>a</sup>
Nymphe	30	1965	100	70 <sup>a</sup>	94 <sup>a</sup>	99 <sup>a</sup>
	3	1991	100	80 <sup>a</sup>	98 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>



### 3. Effet du vieillissement accéléré des semences sur la croissance des plantules

Chez la variété Fedora, l'effet du VA des semences sur la croissance de la racine, de la feuille et du coléoptile, ainsi que sur le nombre de racines, est très hautement significatif (Tableau 2). La distribution des individus pour la longueur de la feuille est présentée à titre d'exemple pour chaque temps de vieillissement (Figure 4). Les effectifs mesurés sont de 100 individus pour VA0 à VA6, 74 individus pour VA7 et 27 individus pour VA8. Trois grandes modifications concernent l'évolution de ces distributions: une augmentation de la longueur moyenne de VA1 à VA3, un étalement de VA4 à VA6 et un aplatissement de VA7 à VA8. Des variations similaires sont notées avec les autres organes. Une analyse factorielle des correspondances a été appliquée à l'ensemble des distributions de fréquence (tableau croisé 'Traitement × Caractères'). Les variations de fréquences internes à ce tableau, c'est-à-dire les différences de comportement des plantules vis-à-vis de la croissance, peuvent être expliquées par trois facteurs indépendants qui rendent compte respectivement de 50,8%, 23% et 11,8% de la variation totale. Le premier facteur représente l'effet drastique des vieillissements longs (VA7 et VA8) sur l'ensemble des caractères. Le second facteur fait intervenir des temps de vieillissement VA0 à VA4 et les variations de taille du coléoptile. Celles-ci se traduisent par une diminution observée pour VA1 et VA2, puis une augmentation pour VA3, suivie d'une nouvelle baisse à VA4. Le troisième facteur représente des effets qui apparaissent aux traitements VA5 et VA6 et qui n'existaient pas à VA1 et VA2. Il se caractérise par une relation négative entre la taille du coléoptile et celle des racines.

Pour résumer, l'observation des histogrammes et l'analyse factorielle des correspondances ont permis la mise en évidence de trois types d'effets selon la durée de VA, associés à des changements de croissance de certains organes (VA1 à VA3 pour le coléoptile) qui se concrétisent par des modifications de moyennes et de variabilité. Notons que les écart-types augmentent fortement de VA5 à VA8, quel que soit l'organe considéré.

Le vieillissement accéléré a aussi généré des plantules morphologiquement anormales à partir de VA3 (0,26%). Le pourcentage de plantules anormales a été de 14% à VA6, a doublé à VA7 pour atteindre 66% des individus à VA8. En effet, le coléoptile s'est souvent développé sans apparition de racines. Le méristème racinaire semble être le premier organe altéré dans son développement par le VA.

Les plantules issues des semences conservées depuis trente ans sont normales chez toutes les variétés. Extérieurement, la croissance ne paraît pas affectée par l'âge des semences.

### 4. Effet du vieillissement naturel et accéléré sur les isoenzymes de peroxydases

Le profil des isozymes de peroxydases extraits de semences sèches (stade 1) ou de semences germées (stade 2) comprend trois bandes majeures, A1, A3 et A4, chez toutes les variétés, que les échantillons soient ou non vieillis artificiellement (Figure 5). Pour les variétés Fedora, Beecher et Nympe, les zymogrammes sont identiques et de même intensité quelle que soit la durée de VA considérée, qu'il s'agisse de semences aux stades 1 ou 2. En revanche, sur semences sèches (stade 1) comme sur semences germées (stade 2), la variété Atlas grain nu a montré des bandes A3 et A4 d'intensité nettement plus faible, respectivement à partir de VA4 et de VA6.

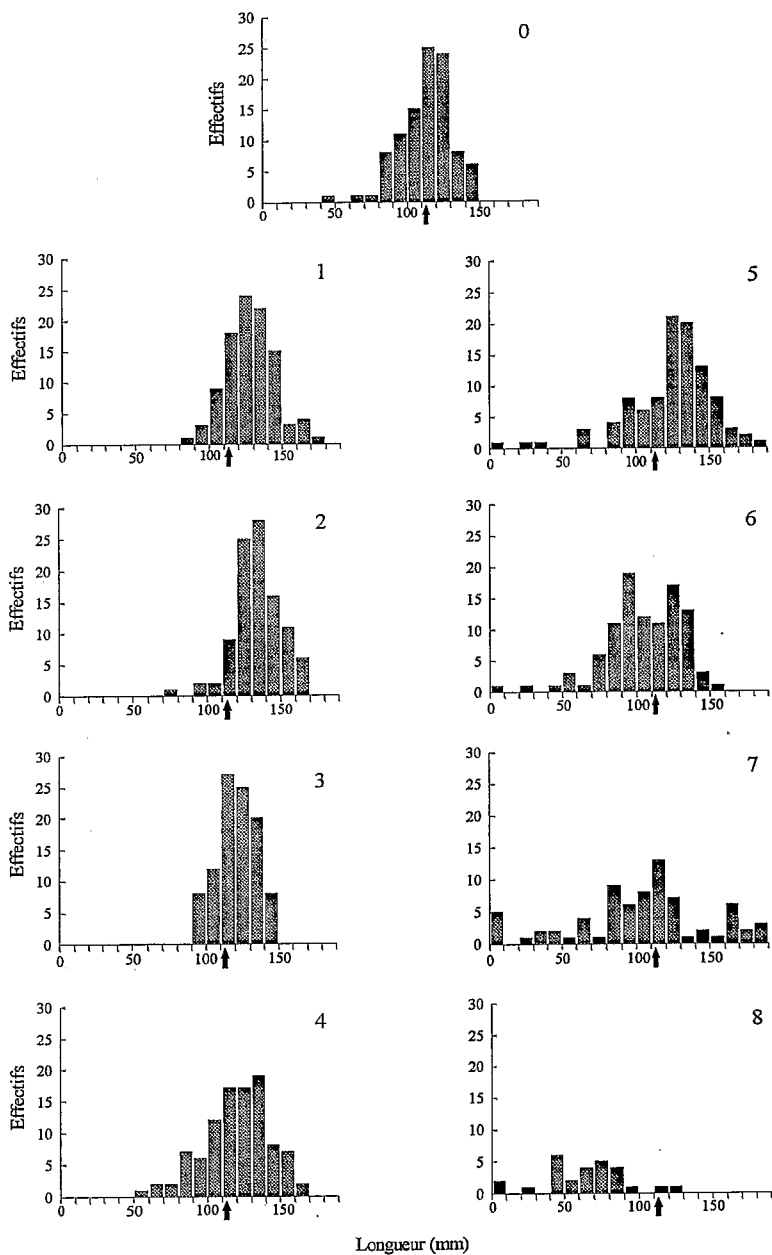


Figure 4. Effet du vieillissement accéléré des semences (VA: 42°C, humidité saturante) sur la longueur de la feuille des plantules de la variété Fedora. Distribution des effectifs en fonction de la longueur de la feuille. 0: témoin; 1 à 8: 1 à 8 jours de VA. La flèche indique la moyenne du témoin.

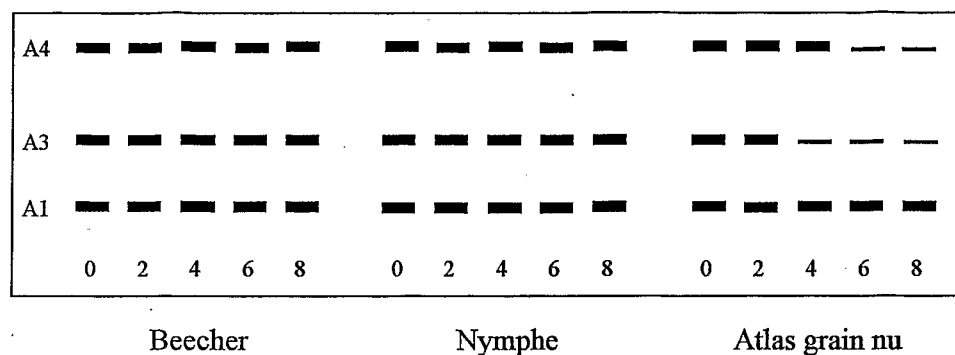


Figure 5. Profil d'isozymes de peroxydases extraits de semences sèches des variétés Beecher, Nymphe et Atlas grain nu (récoltes 1991) vieillis artificiellement. 0: témoin, 2 à 8: 2 à 8 jours de VA.

L'expression des isozymes au cours du développement de la plantule a été étudiée avec la variété Fedora ayant subi deux et quatre jours de VA (Figure 6). Chez le témoin, une quatrième bande de faible intensité (A2) est apparue au stade 3 pour s'exprimer plus intensément au stade 4. Après deux ou quatre jours de vieillissement accéléré, l'expression des isozymes se fait de la même façon que chez le témoin.

Pour les semences vieilles naturellement, le zymogramme des lots de la récolte 1991 (récolte 1985 pour Ager) présente les trois bandes majeures A1, A3 et A4 (Figure 7). En revanche, pour la récolte de 1965, la bande A3 a disparu pour les variétés Aurore, Beecher et Atlas grain nu et s'est seulement estompée pour Nymphe, Atlas 46 et Ager. Le système enzymatique des peroxydases présente donc des dégradations précoces au cours de la conservation. Notons que les semences de la variété Atlas 46, récolte 1984, paraissent dans ces conditions plus dégradées que celles de la récolte 1965.

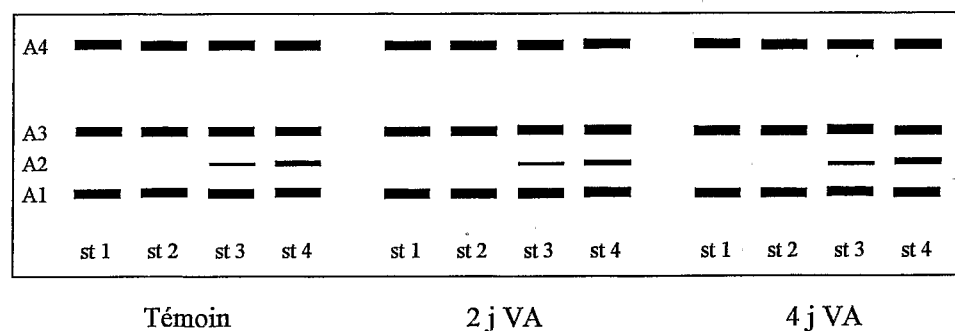


Figure 6. Profil d'isozymes de peroxydases extraits de semences sèches de la variété Fedora vieillis artificiellement 2 et 4 jours, et à différents stades de développement. St 1: semence sèche; st 2: semence germée (radicule pointée); st 3: stade 'coléoptile'; st 4: stade 'plantule' (comme décrits dans Matériel et Méthodes).

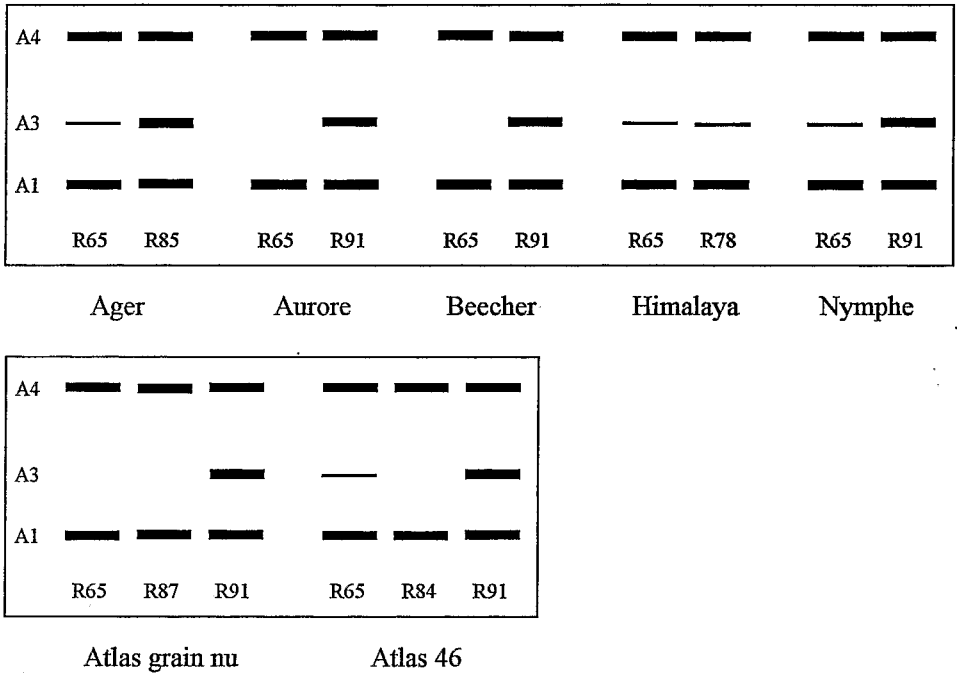


Figure 7. Profil d'isozymes de peroxydases extraits de semences sèches des lots anciens et récents des variétés Ager, Aurore, Beecher, Himalaya, Nymphe, Atlas grain nu et Atlas 46. R, récolte.

## Discussion

Cette étude a permis de comparer les effets de deux types de vieillissement sur la qualité des semences. Les caryopses d'orge ont bien supporté une conservation de trente ans. Toutefois, il faut noter des différences variétales de comportement, que l'on retrouve également à la suite du vieillissement accéléré. Mais les dégradations observées lors du vieillissement accéléré sont-elles les mêmes que celles se produisant lors de la conservation?

Le vieillissement naturel prouve que les semences d'orge des variétés utilisées ont gardé un taux de germination supérieur à 90% au bout de trente ans de conservation dans de bonnes conditions (4°C et faible humidité). Toutefois, à ce stade, les semences des variétés Aurore et Atlas grain nu ont une vitesse de germination légèrement réduite. De plus, la variété Atlas grain nu est la plus affectée (72% de germination après dix jours). Ceci confirme les prédictions de longévité que l'on peut faire à partir des nomogrammes de viabilité. En effet, le taux de germination attendu après 30 ans de conservation (4°C, 10% de teneur en eau) est de 98,5% en considérant une viabilité de départ de 100% (Ellis et Roberts, 1981). Une viabilité de départ de 99% conduit à 80% de germination après trente ans de conservation dans ces mêmes conditions.

D'après nos résultats, le vieillissement accéléré entraîne très rapidement une réduction de la capacité germinative, qui se traduit par une diminution de la vitesse et une chute du taux de germination chez toutes les variétés étudiées. Mais la variété Atlas grain nu est à nouveau la plus sensible au VA, vraisemblablement à cause de la nature du grain (vêtu vs nu), mais sans que l'on puisse exclure les conditions de culture de la plante-mère ainsi que les conditions de maturation et de récolte. Un grain vêtu pourrait peut-être se conserver plus longtemps qu'un grain nu du fait de la protection, par les glumelles, se contre l'auto-oxydation des acides gras (Flood et Sinclair, 1981). On peut donc supposer que le grain nu est plus sensible aux stress oxydatifs qui se produisent au cours de la conservation et au début de l'imbibition (Gidrol, 1989).

Dans le cas de la variété Atlas grain nu, le VA permet effectivement de prédire une perte de viabilité plus précoce lors du stockage en chambre froide. Les semences des autres variétés nécessitent un traitement de VA assez long pour perdre totalement leur viabilité, mais pour le moment il n'est pas possible de la relier à une durée de conservation en conditions normales puisqu'elles se sont toutes bien conservées. Pour beaucoup d'autres espèces végétales, des traitements de VA plus courts (trois à cinq jours) entraînent une chute du taux de germination. C'est le cas pour le soja, plante à réserves majoritairement lipidiques (Noubhani, 1990).

La croissance des plantules est aussi perturbée par le VA, même pour des durées très courtes (jusqu'à quatre jours de VA). Il se produit d'abord un effet positif sur la croissance des organes aériens, alors que la taille des racines commence à diminuer. Cette différence de comportement entre organes aériens et souterrains pourrait être due à des phénomènes de compensation dans l'utilisation des ressources nécessaires à la croissance. Des vieillissements plus prolongés conduisent à une diminution de croissance des parties aériennes et racinaires. Ceci confirme les résultats de Chauhan (1985) qui a montré, à l'aide de la méthode de coloration au tétrazolium, que le méristème racinaire est plus endommagé que le méristème caulinaire chez l'orge. Des résultats similaires (ralentissement puis arrêt de l'organogénèse et faible activité méristématique) ont été observés histologiquement chez le tournesol (Gay-Mathieu, 1991). Par ailleurs, le nombre de plantules anormales augmente considérablement avec la durée du VA. Cette augmentation d'anomalies avant toute diminution de la viabilité a déjà été observée chez le blé, le poireau, la laitue (Guy, 1982; Toole, Toole et Gorman, 1948 cité par Priestley, 1986). Des anomalies du système racinaire ont également été observées chez le blé, le soja et le tournesol à la suite d'une conservation de quatre ans, comme après un vieillissement accéléré (Ladonne, 1987).

Chez l'orge, le vieillissement accéléré entraîne, comme le vieillissement naturel, une baisse de vigueur et un ralentissement de la croissance qui aboutissent à une perte de capacité germinative. Le vieillissement accéléré des semences peut donc être considéré comme un modèle satisfaisant de la détérioration des semences dans des conditions normales de conservation. Ceci confirme les résultats obtenus par Likhatchev, Zelensky, Kiashko et Sheychenko (1984).

Plusieurs études ont montré l'implication de divers systèmes enzymatiques dans les phénomènes de sénescence (Priestley, 1986), ainsi qu'une diminution de l'efficacité de

la machinerie de traduction chez le pois, le soja et le blé (Gidrol, Noubhani, Mocquot, Fournier et Pradet, 1988; Noubhani et Gidrol, 1992). Très tôt, une réduction de l'activité peroxydasique a été étroitement reliée à la perte de viabilité chez l'orge (MacLeod, 1952). Ce changement d'activité rendrait la semence plus sensible aux dégâts occasionnés par les formes toxiques de l'oxygène apparaissant lors de la perte d'intégrité membranaire (Basavarajappa, Shetty et Prakash, 1991).

Dans notre étude sur l'orge, des semences conservées trente ans et germant très bien ont présenté des modifications d'activité isozymique des peroxydases uniquement (tests effectués sur la malate déshydrogénase, les estérases, la phosphogluconate déshydrogénase et l'alcool déshydrogénase, résultats non montrés). De tels changements ont déjà été observés chez cette espèce, ainsi que chez le maïs, le blé et le riz au cours de la conservation naturelle (Priestley, 1986). En revanche, aucune différence isozymique de peroxydase n'a été observée entre les différents lots vieilliss artificiellement, alors que leur capacité germinative était fortement réduite. C'est la principale différence entre vieillissement naturel et vieillissement accéléré chez l'orge. Notons cependant que chez d'autres espèces, des changements isozymiques ont été détectés en vieillissement accéléré. C'est le cas des peroxydases de *Pinus banksiana* (Priestley, 1986) et des glutamate déshydrogénases et estérases du soja (Shatters, Abdelghany, Elbagoury et West, 1994). Les profils d'isozymes de peroxydases pourraient donc être utilisés comme test pour détecter une perte précoce de viabilité, puisque des différences sont observées bien avant que le taux de germination ait chuté.

En conclusion, le vieillissement accéléré, est un bon test pour prédire la longévité des semences comme l'ont suggéré Delouche et Baskin (1973). Mais, malgré son emploi fréquent pour apprécier la qualité d'un lot, il ne peut, chez l'orge, remplacer les études sur les détériorations engendrées lors des conditions normales de conservation pour étudier les mécanismes de sénescence par eux-mêmes. En effet, ces deux types de vieillissement opposent basse température, faible humidité, longue durée (vieillissement naturel) à haute température, forte humidité, courtes périodes (VA). Ceci doit influencer différemment la physiologie de la germination (Ganguli et Sen-Mandi, 1990). C'est le cas pour les peroxydases qui ne semblent pas affectées par le vieillissement accéléré, mais le sont au cours de la conservation naturelle. Il faut donc rester très prudent quant à la comparaison du vieillissement naturel et du vieillissement accéléré, puisque les phénomènes de dégradation ne semblent pas être toujours identiques, même si l'effet global observé reste toujours une baisse de capacité germinative.

## Références

- Abdul-Baki, A. A. et Chandra, G. R. (1977). Effect of rapid aging on nucleic acid and protein synthesis by soybean embryonic axis during germination. *Seed Science and Technology*, **5**, 689-698.
- AOSA (1983). Seed vigor testing handbook. *Association of Official Seed Analysts*, p. 1-48.
- Basavarajappa, B. S., Shetty, H. S. et Prakash, H. S. (1991). Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. *Seed Science and Technology*, **19**, 279-286.
- Brewer, G. J. (1970). *An introduction to isozymes techniques*. Academic Press, New-York, San Francisco, London.

- Chauhan, K. P. S. (1985). The incidence of deterioration and its localisation in aged seeds of soybean and barley. *Seed Science and Technology*, **13**, 769-773.
- Cherry, J. H. et Skadsen, R. W. (1986). Nucleic acid and protein metabolism during seed deterioration. In *Physiology of Seed Deterioration*, McDonald, M. B. Jr. and Nelson, C. J. (eds); pp. 65-88. CSSA Special Publication Number 11, Madison, Wisconsin, USA.
- Delouche, J. C. et Baskin, C. C. (1973). Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology*, **1**, 427-452.
- Ellis, R. H., Roberts, E. H. et Whitehead, J. (1980). A new, more economic and accurate approach to monitoring the viability of accessions during storage in seed banks. *Plant Genetic Resources Newsletter*, **41**, 3-18.
- Ellis, R. H. et Roberts, E. H. (1981). The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Science and Technology*, **9**, 373-409.
- Flood, R. G. et Sinclair, A. (1981). Fatty acid analysis of aged permeable and impermeable seeds of *Trifolium subterraneum* (subterranean clover). *Seed Science and Technology*, **9**, 475-477.
- Ganguli, S. et Sen-Mandi, S. (1990). Some physiological differences between naturally and artificially aged wheat seeds. *Seed Science and Technology*, **18**, 507-514.
- Gay-Mathieu, C. (1991). Recherche des processus impliqués dans la perte de l'aptitude à germer des semences de tournesol (*Helianthus annuus* L.) sous l'influence d'une température trop élevée. *Thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie*, Paris.
- Gidrol, X. (1989). Accumulation de peroxyde d'hydrogène et vieillissement accéléré des semences de soja. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, Paris, série III, **308**, 223-228.
- Gidrol, X., Noubhani, A. et Pradet, A. (1990). Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. II. RNA populations and protein synthesis. *Physiologia Plantarum*, **80**, 598-604.
- Gidrol, X., Noubhani, A., Mocquot, B., Fournier, A. et Pradet, A. (1988). Effect of accelerated aging on protein synthesis in two legume seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, **26**(3), 281-288.
- Gidrol, X., Serghini, H., Noubhani, A., Mocquot, B. et Mazliak, P. (1989). Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds. I. Lipid peroxidation and membrane damage. *Physiologia Plantarum*, **76**, 591-597.
- Guy, R. (1982). Influence du stockage sur la durée de germination des semences. *Revue Suisse de Viticulture, Arboriculture, Horticulture*, **14**, 99-101.
- Ladonne, F. (1987). Etude critique de quelques méthodes d'évaluation de la qualité germinative des lots de semences. *Thèse de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon*.
- Likhatchev, B. S., Zelensky, G. V., Kiashko, Yu.G., et Shevchenko, Z. N. (1984). Modelling of seed ageing. *Seed Science and Technology*, **12**, 385-393.
- MacLeod, A. M. (1952). Enzyme activity in relation to barley viability. *Transactions of the Botanical Society of Edinburgh*, **36**, 18-33.
- Murata, M., Roos, E. E. et Tsuchiya, T. (1981). Chromosome damage induced by artificial seed aging in barley. I. Germinability and frequency of aberrant anaphases at first mitosis. *Canadian Journal of Genetic Cytology*, **23**, 267-280.
- Noubhani, A. (1990). Dégradations cellulaires et modifications de l'expression du génome au cours du vieillissement accéléré des semences. *Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux II*.
- Noubhani, A. et Gidrol, X. (1992). Efficiency of cell-free translation systems extracted from acceleratedly aged wheat embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*, **30**(6), 695-701.
- Osborne, D. J. (1980). Senescence in seeds. In *Senescence in Plants*, Thimann, K. V. (ed.); p. 13-37. Boca Raton, CRC Press.
- Parrish, D. J. et Leopold, A. C. (1978). On the mechanism of aging in soybean seeds. *Plant Physiology*, **61**, 365-368.
- Perry, D. A. (1987). *Manuel sur les méthodes d'essais de vigueur*. Association Internationale d'Essais de Semences, Zurich, Suisse.
- Priestley, D. A. (1986). *Seed Aging. Implications for seed storage and persistence in the soil*. Comstock Publishing Associates, Ithaca and London, Cornell University Press.
- Powell, A. A. et Harman, G. E. (1985). Absence of a consistent association of changes in membranal lipids with the ageing of pea seeds. *Seed Science and Technology*, **13**, 659-667.

- Powell, A. A. et Matthews, S. (1981). Evaluation of controlled deterioration, a new vigour test for small seeded vegetables. *Seed Science and Technology*, **89**, 633-640.
- Roberts, E. H. (1972). *Viability of seeds*. Roberts E. H. (ed.). Chapman and Hall, London.
- Roos, E. E. (1980). Physiological, biochemical and genetic changes in seed quality during storage. *Hortscience*, **15**(6), 781-784.
- Roos, E. E. (1986). Precepts of successful seed storage. In *Physiology of Seed Deterioration*, McDonald, M. B. Jr. and Nelson, C. J. (eds.); p. 1-26. CSSA Special Publication Number 11, Madison, Wisconsin, USA.
- Roos, E. E. (1989). Long-term seed storage. *Plant Breeding Reviews*, **7**, 129-158.
- Second, G. et Trouslot, P. (1980). Electrophorèse d'enzymes de riz (*Oryza sp.*). Travaux et Documents de l'ORSTOM n°120.
- Shatters, R. G. Ir, Abdelghany, A., Elbagoury, O. et West, S. H. (1994). Soybean seed deterioration and response to osmotic priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. *Seed Science Research*, **4**, 33-41.
- Shaw, C. R. et Prasad, R. (1970). Starch gel electrophoresis of enzymes, a compilation of recipes. *Biochemical Genetics*, **4**, 297-320.
- Smithies, O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochemistry Journal*, **61**, 629-641.
- Stewart, R. R. C. et Bewley, J. D. (1980). Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, **65**, 245-248.
- Toole, E. H., Toole, V. K. et Gorman, E. A. (1948). Vegetable-seed storage as affected by temperature and relative humidity. *U.S. Department of Agriculture Technical Bulletin*, **972**, 1-24.
- Williams, J. T. (1984). A decade of crop genetic resources research. In: *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation*. Holden, J. H. W. and Williams, J. T. (eds); p. 1-17. George, Allen and Unwin, London.
- Wilson, D. O. Jr. et McDonald, M. B. Jr. (1986). The lipid peroxidation model of seed ageing. *Seed Science and Technology*, **14**, 269-300.