

## Altérations accompagnant le vieillissement accéléré de blé tendre

Hana Serghini Caid<sup>1</sup>  
Tamou Ecchemmakh<sup>1</sup>  
Ahmed Elamrani<sup>1</sup>  
Ahmed Khalid<sup>1</sup>  
Azzouz Boukroute<sup>1</sup>  
Aatika Mihamou<sup>1</sup>  
Chantal Demandre<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire d'amélioration et de production végétales, Université Mohamed Premier, Faculté des sciences, Département de biologie, 60000 Oujda, Maroc

<serghini@sciences.univ-oujda.ac.m>  
<amrani@sciences.univ-oujda.ac.m>  
<khalid@sciences.univ-oujda.ac.m>  
<boukroute@sciences.univ-oujda.ac.m>  
<mihamou@sciences.univ-oujda.ac.m>

<sup>2</sup> Laboratoire de physiologie cellulaire et moléculaire des plantes, UMR 7632 CNRS, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Case 154-Le Raphaël, 3, rue Galilée, 94200 Ivry sur seine, France  
<chantal.demandre@snv.jussieu.fr>

### Résumé

Un test de prédiction précoce d'aptitude au stockage de grains de blé serait un outil appréciable de grande application en post-récolte pour les organismes céréaliers. Un traitement de vieillissement accéléré (VA) de grains de blé tendre marocain et son effet sur quelques paramètres physiologiques et biochimiques ont été utilisés dans le but de prédire l'aptitude au stockage de deux variétés (Marchouch et Mahdia) largement cultivées au Maroc. Ce test de prédiction précoce d'aptitude au stockage consiste à placer les grains de blé à 40 °C et à une humidité de 100 % pendant 1 à 8 jours. Après traitement, la variété Marchouch se distingue de la variété Mahdia, par une meilleure conservation du pouvoir germinatif, mais également par de faibles pertes en protéines et de faibles augmentations de fuite d'électrolytes. Cette variété semble être la plus apte au stockage.

**Mots clés :** blé tendre ; conductimétrie ; conservabilité, Maroc ; viabilité ; vieillissement.

**Thèmes :** productions végétales ; physiologie ; méthodes et outils.

### Abstract

#### Alterations occurring during accelerated ageing of winter wheat

Seeds are usually stored in physiological conditions in which they gradually lose their viability and vigour depending on storage conditions, storage time, and genotype. The aims of this study were to evaluate the effects of accelerated ageing on physiological and biochemical characteristics of winter wheat seeds. Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability and longevity of seeds were tested on two varieties of Moroccan wheat: Marchouch and Mahdia. The accelerated ageing (VA, vieillissement accéléré) method consisted in storing wheat seeds in the dark for 2, 4, 6 and 8 days at 40°C and 100% relative humidity (RH): (VA2j, VA4j, VA6j, VA8j). Physiological and biochemical damage was observed during age-induced seed deterioration. Accelerated ageing (VA) of Moroccan winter wheat seeds at 40°C and 100% RH reduced respiration intensity (results not shown) and germination capacity. Respectively, accelerated ageing "VA4j", "VA8j", reduced germination of Marchouch from 100% to 58% and to 11%. Comparatively, Mahdia germinability decreased from 97% to 63% and to 10%. This reduced germination capacity was accompanied by increased conductivity (as a proof of membrane permeability) of the imbibition medium. Marchouch exhibited more electrolyte flux than Mahdia, suggesting better cell membrane resistance in this winter wheat variety. Accelerated ageing "VA8j", increased soluble sugar content by 31.8% for Marchouch and 22.6% for Mahdia and, simultaneously, decreased soluble protein content by 24.03% for Marchouch and 18.8 for Mahdia. It also induced proline accumulation. Although proline content increased by approximately 55% for the two winter wheat varieties, quantitatively the proline content (untreated standard and treated seeds) was lower in Mahdia than in Marchouch. From these results it was concluded that Moroccan Mahdia winter wheat is better adapted for storage than Marchouch. After accelerated ageing treatment Mahdia seeds showed a relative reduction in germination capacity and relative stability in water content, the best conservation of membrane integrity (as indicated by low electrolyte flux), a lower increase in soluble sugars and the lowest diminution in protein content.

**Key words:** aging; conductimetry; Morocco; soft wheat; storability; viability.

**Subjects:** vegetal productions; physiology; tools and methods.

**A**u cours de leur stockage, les graines de céréales subissent des altérations diverses. Ces altérations peuvent être de nature physiologique, avec une perte de la faculté germinative ou une baisse de la vigueur, ou de nature physico-chimique, avec une baisse de la valeur technologique et nutritionnelle. Les causes de ces détériorations sont nombreuses, mais la plupart des auteurs s'accordent sur le fait qu'il s'agit d'altérations qui accompagnent le phénomène de vieillissement des graines. L'implication des radicaux libres et leur grande réactivité seraient responsables de ces dégradations en chaîne, touchant différents constituants cellulaires notamment les lipides, les protéines et les glucides. Les responsables des firmes de semences sont obligés de prendre de nombreuses décisions techniques au cours de leur activité commerciale. L'une des plus importante consiste à déterminer quels sont les lots de semences qui pourront être conservés sans danger et ceux devant être vendus (Delouche et Baskin, 1973). Dans ce travail, nous utilisons la méthode de vieillissement accéléré (Delouche et Baskin, 1973) pour faire un suivi pendant un temps relativement court, et essayer de comprendre les phénomènes d'altérations de la qualité physiologique et technologique de deux variétés de blé tendre (*Triticum aestivum*) Marchouch et Mahdia. L'objectif de ce premier travail est de déterminer laquelle de ces deux variétés, largement cultivées au Maroc, s'apprête le mieux au stockage.

## Matériel et méthode

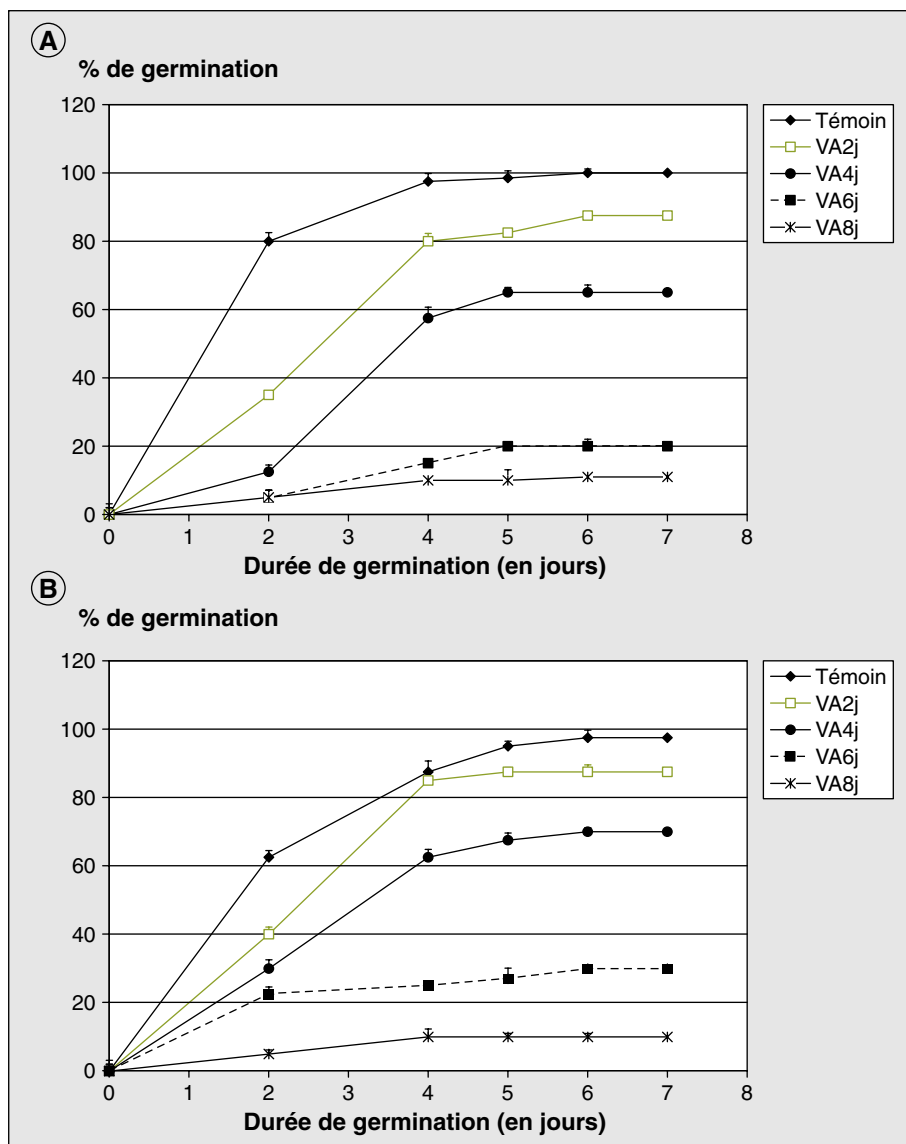
### Matériel

Les deux variétés de semences de blé tendre Marchouch et Mahdia ont été fournies par la direction provinciale d'agriculture (DPA Oujda, Maroc). Les grains de blé ont été cultivés dans la même station près d'Oujda (Maroc oriental) en 2004. Ils ont été conservés avant leur arrivée au laboratoire à température ambiante et ensuite dans des chambres froides.

### Méthode

#### Traitement de vieillissement accéléré

Le traitement de vieillissement accéléré (VA) se fait selon la méthode de Delouche et Baskin modifiée (Delouche et Baskin, 1973). Les lots de grains (500 grammes)



**Figure 1.** Variation des capacités germinatives de deux variétés de blé tendre, Marchouche (A) et Mahdia (B), soumises à un vieillissement accéléré (VA) de 2, 4, 6 et 8 jours.

**Figure 1.** Changes in germination in artificially aged winter wheat seeds of two varieties: Marchouche (A) and Mahdia (B).

Les résultats correspondent à la moyenne de dix essais, les barres correspondent à  $\pm$  SE.

### Tableau 1. Corrélations linéaires simples entre les résultats d'essai du vieillissement accéléré (VA), pourcentage de germination (PG) et conductivité électrique (CE).

Table 1. Simple linear correlations ( $r^2$ ) among accelerated aging (VA) test results, germination percentage (PG) and electrical conductivity (CE).

	Corrélations	Valeurs de r
Mahdia	VA x PG	0,97*
	VA x CE	0,80*
Marchouch	VA x PG	0,97*
	VA x CE	0,83*

\* Différence significative  $p < 0,05$ .

sont placés dans une étuve à 40 °C et en atmosphère de haute humidité relative (100 %) pendant 2, 4, 6 et 8 jours. Ils sont respectivement désignés VA2J, VA4J, VA6J, VA8J.

### Test de germination

Les grains (50 grains) sont désinfectés à l'hypochlorite de sodium et rincés à l'eau distillée stérile. Ils sont mis à germer dans des boîtes de Pétri sur disque de papier-filtre imbibé d'eau distillée, à l'obscurité, à 25 °C et pendant 2 à 7 jours.

Le pourcentage de germination est exprimé par le rapport du nombre de graines germées sur le nombre total de grains.

### Fuite des électrolytes

L'estimation de fuite d'électrolytes se fait par mesure de la conductivité (conductimètre Thermo Orion) de l'eau d'imbibition de 50 graines en fonction du temps de trempage (Parrish et Leopold, 1978).

### Teneurs en protéines solubles, proline et sucres solubles

La quantification de la teneur en protéines solubles est faite selon la méthode de Bradford (1976), celle de la proline selon la méthode de Monneveux et Nemmar (1986) celle des sucres solubles selon la méthode de Halhoul et Kleinberg (1972). Le dosage du principal produit de peroxydation lipidique, le malondialdéhyde (MDA) a été réalisé sur des extraits d'embryons isolés de graines de blé en germination pendant 24 heures à 25 °C. Le dosage se fait selon la méthode de Heath et Parker (1968).

### Test statistique appliqué

Le test Anova (*Analysis of variance*) a été réalisé pour comparer l'effet du vieillissement accéléré sur les deux variétés.

## Résultats

### Germination, fuite des électrolytes et teneur en MDA

Le traitement de VA provoque chez les deux variétés de blé tendre Marchouch et Mahdia une diminution du pourcentage de germination. Celui-ci passe de 100 % chez le témoin à 11 % pour le lot de grains de la variété Marchouch ayant subi un traitement de VA de 8 jours, alors qu'il

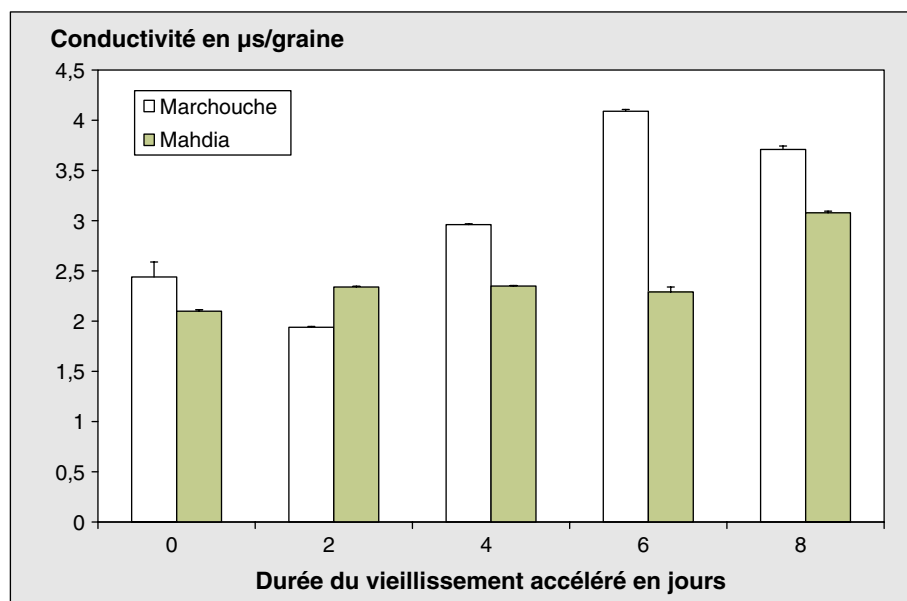


Figure 2. Effet d'un traitement de vieillissement accéléré (VA) sur la fuite d'électrolytes de deux variétés de grains de blé tendre, Marchouche et Mahdia.

Figure 2. Changes in electrolyte leakage in artificially aged winter wheat seeds of two varieties: Marchouche and Mahdia.

Les résultats correspondent à la moyenne de trois essais, les barres correspondent à ± SE.

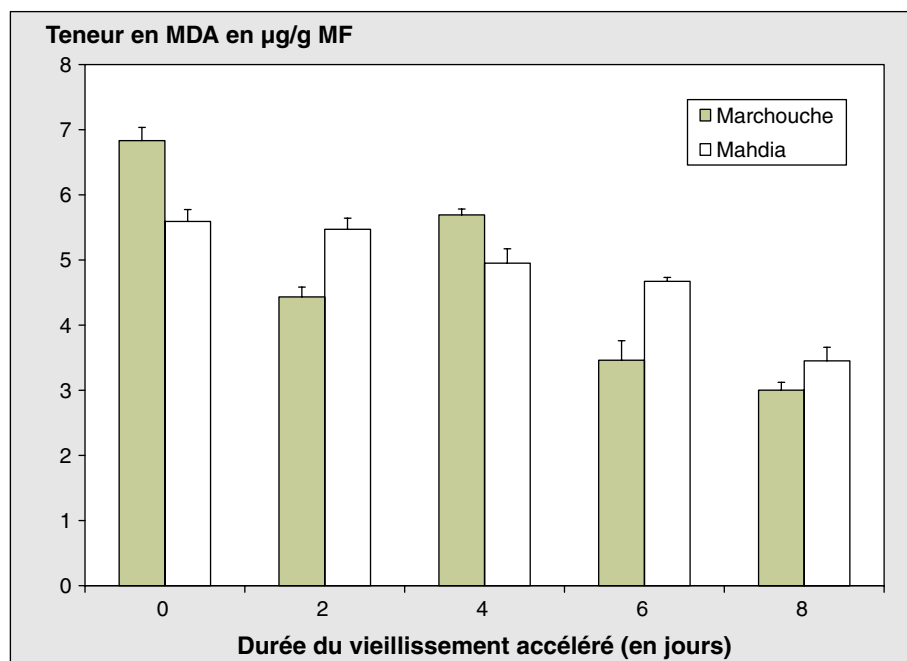


Figure 3. Effet d'un traitement de vieillissement accéléré sur la teneur en malondialdéhyde (MDA) de deux variétés de blé tendre, Marchouche et Mahdia.

Figure 3. Effect of accelerated ageing on malondialdehyde (MDA) contents of two winter wheat varieties: Marchouche and Mahdia.

MDA : malondialdéhyde. Les résultats correspondent à la moyenne de trois essais, les barres correspondent à ± SE.

pas, sous l'effet du même traitement, de 97 à 10 % pour les semences de la variété Mahdia (figure 1). Les différences sont significatives avec  $p < 0,05$  pour le facteur vieillissement accéléré. Il existe, en effet, une corrélation positive entre le pourcentage de germination et le vieillissement accéléré (tableau 1).

Parallèlement à cette chute du pourcentage de germination, on note une augmentation de conductivité du milieu de réhydratation des semences en fonction de la durée du vieillissement accéléré (figure 2). La variété Marchouch montre moins d'efflux que la variété Mahdia, ce qui suggère une meilleure résistance membranaire pour la variété Marchouch. De même, le traitement de VA de 8 jours provoque chez les deux variétés une baisse des teneurs en MDA (figure 3), notamment chez la variété Marchouch qui présente une diminution d'environ 56 %.

### Variation de la teneur en sucres solubles, protéines solubles et proline

Au cours du traitement de vieillissement accéléré, la teneur en sucres solubles montre une augmentation significative (figure 4). Quantitativement, cette teneur passe de 1,19 mg/g de matière sèche (MS) chez le témoin à 1,55 mg/g MS après huit jours de VA chez la variété Mahdia, soit une augmentation de 23,2 %. Chez la variété Marchouch, on note une augmentation relativement plus importante de l'ordre de 31,5 % avec une teneur en sucres solubles passant de 0,89 mg/g MS (chez le témoin) à 1,31 mg/g MS, après 8 jours de VA.

Suite à ce traitement de VA et parallèlement à cette augmentation de la teneur en sucres solubles, on assiste à une baisse de la teneur en protéines par rapport au témoin (figure 5). Cette baisse est estimée à 18,8 % chez la variété Mahdia et à 24,0 % chez la variété Marchouch. Contrairement aux protéines, on remarque une augmentation de la teneur en proline (figure 6). Cette augmentation, par rapport au témoin, est estimée à 54,5 % chez la variété Marchouch et à 56,0 % chez la variété Mahdia. On peut remarquer que les teneurs en proline pour la variété Mahdia sont faibles aussi bien pour les semences témoins que pour celles ayant subi le traitement VA de 8 jours.

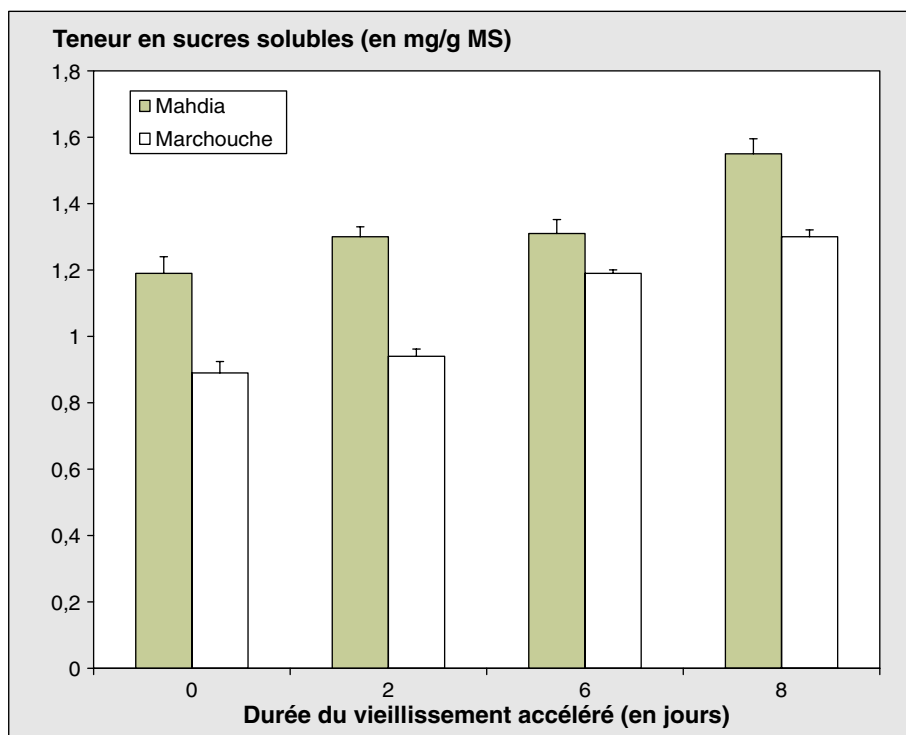


Figure 4. Variation de la teneur en sucres solubles des lots de blé tendre Marchouche et Mahdia en fonction de la durée de vieillissement accéléré.

Figure 4. Changes in soluble sugar contents in artificially aged winter wheat seeds of two varieties: Marchouche and Mahdia.

MS : matière sèche. Les résultats correspondent à la moyenne de trois essais, les barres correspondent à  $\pm$  SE.

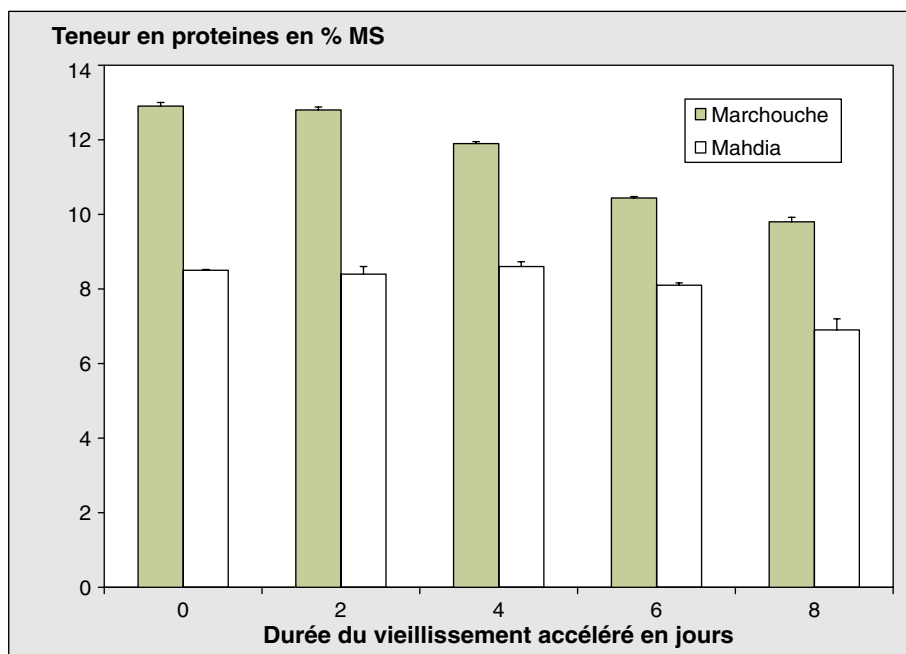
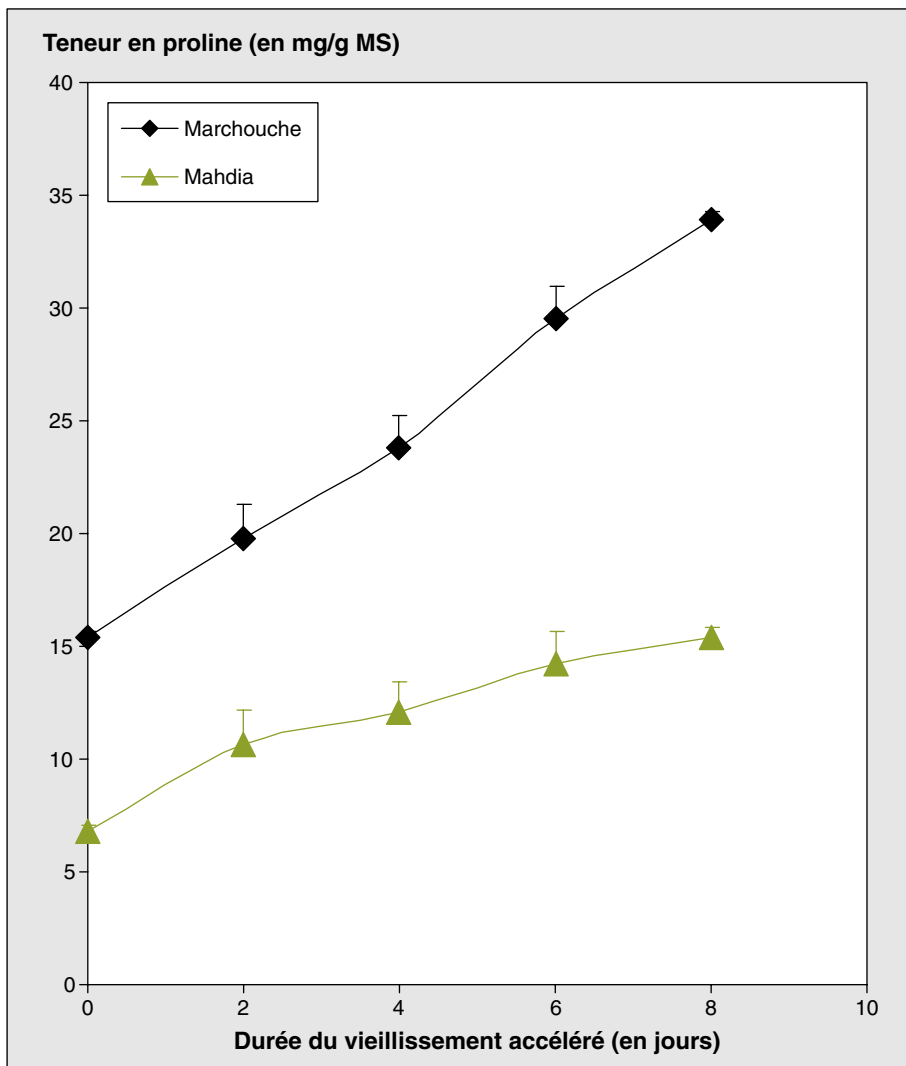


Figure 5. Effet d'un traitement de vieillissement accéléré sur la teneur en protéines de deux variétés de blé tendre, Marchouche et Mahdia.

Figure 5. Changes in protein contents in artificially aged winter wheat seeds of two varieties: Marchouche and Mahdia.

MS : matière sèche. Les résultats correspondent à la moyenne de trois essais, les barres correspondent à  $\pm$  SE.



**Figure 6.** Effet d'un vieillissement accéléré sur la teneur en proline de deux variétés de blé tendre, Marchouche et Mahdia.

**Figure 6.** Changes in proline contents in artificially aged winter wheat seeds of two varieties: Marchouche and Mahdia.

MS : matière sèche. Les résultats correspondent à la moyenne de trois essais, les barres correspondent à  $\pm$  SE.

## Discussion et conclusion

Le traitement de VA a provoqué une baisse du pouvoir germinatif et donc de la vigueur des semences chez les deux variétés de blé tendre étudiées.

Cette baisse de vigueur, pourrait être expliquée par une perte de l'intégrité membranaire qui engendre une augmentation de fuites d'électrolytes. Ce phénomène déjà observé par plusieurs auteurs et sur différentes espèces végétales (Baillly *et al.*, 1996 ; Corbineau *et al.*, 2002 ; Geol *et al.*, 2003) serait associé à

des réactions en chaîne initialisées par des radicaux libres (Mazliak, 1983). Parmi ces réactions, les peroxydations lipidiques seraient les principales causes de la détérioration membranaire (Gidrol *et al.*, 1989 ; Castilho *et al.*, 1994 ; Priestly et Leopold, 1983 ; McDonald, 1999 ; Narayana Murthy et Sun, 2000). Cependant, nous avons remarqué pour les deux variétés de blé tendre étudiées, une baisse de la quantité d'un des principaux produits des peroxydations lipidiques, le MDA. Cette diminution pourrait s'expliquer soit par une altération des acides gras polyinsaturés (qui sont les substrats des oxydations lipidiques) soit par une augmentation de la fuite du MDA à tra-

vers la membrane altérée au cours du vieillissement accéléré. De plus, le blé se caractérisant par une faible teneur en lipides, les peroxydations lipidiques devraient jouer un rôle moins important dans le phénomène de vieillissement que dans le cas de graines oléagineuses (Narayana Murthy et Sun, 2000 ; Baillly *et al.*, 1998).

À ce propos certains auteurs comme Priestly et Leopold (1983), Powell et Harman (1985) et Kalpana et Rao (1994) ont constaté une absence de corrélation entre le phénomène de peroxydations lipidiques et le vieillissement accéléré des semences. En revanche, ces résultats seraient en contradiction avec ceux qui sont obtenus par Baillly *et al.* (1998) et par Geol *et al.* (2003) qui ont montré une corrélation entre l'augmentation de la teneur en MDA et la diminution du pourcentage de germination chez des semences de tournesol et de coton, ayant subi un traitement de vieillissement accéléré artificiel. En outre, dans une étude récente (Echemmakh *et al.*, 2004), on montre une baisse de la teneur en lipides et notamment en phospholipides, ce qui n'exclut donc pas l'implication des oxydations lipidiques dans la diminution de vigueur des semences de blé au cours de la phase de stockage.

Selon d'autres auteurs, l'augmentation de fuite d'électrolytes après traitement de VA, serait due à une forte accumulation des métabolites résultant de la dégradation de macromolécules (Parrish et Leopold, 1978).

La baisse de la teneur en protéines, parallèlement à l'augmentation des teneurs en proline et en sucres solubles chez les deux variétés étudiées, s'inscrirait dans l'ensemble des dégradations biochimiques que subiraient les grains au cours de leur stockage. Ces mêmes modifications ont été observées sur des semences de pois (Kalpana et Rao, 1994) et de blé (Dell Aquila, 1994 ; Krishnan *et al.*, 2003) vieillies artificiellement. La dégradation des protéines solubles toucherait notamment les gliadines et les gluténines dont le rôle n'est plus à démontrer dans la qualité de panification. L'augmentation de la teneur en proline au cours du vieillissement accéléré pourrait s'expliquer comme une conséquence de la dégradation des protéines ou tout simplement comme une réponse au stress thermique (40 °C) que subissent les graines au cours du traitement.

L'augmentation de la teneur en sucres réducteurs chez les deux variétés de blé

étudiées, serait le résultat d'une dégradation accrue de l'amidon au cours du traitement. Ces sucres seraient initiateurs de réactions d'Amadori et Maillard (Callucci *et al.*, 2004 ; Sun et Leopold, 1995) responsables du brunissement des grains et surtout associées à la perte de viabilité au cours du stockage.

La comparaison des résultats obtenus pour les deux variétés de blé permet de distinguer la variété Mahdia, avec une faible diminution de sa teneur en protéines parallèlement à une faible augmentation de fuite d'électrolytes et de sa teneur en sucres réducteurs, comme la variété la plus apte à la conservation. Afin de vérifier ces résultats d'autres études sont réalisées dans notre laboratoire sur d'autres variétés marocaines de blé dur et tendre. ■

## Références

- Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Côme D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated ageing. *Physiol Plant* 1996 ; 97 : 104-10.
- Bailly C, Benamar A, Corbineau F, Côme D. Free radical scavenging as affected by accelerated aging and subsequent priming in sunflower seeds. *Physiol Plant* 1998 ; 104 : 646-52.
- Bradford NM. A rapid and a sensitive method for the quantification of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976 ; 72 : 248-54.
- Callucci L, Capocchi A, Galleschi L, *et al.* Antioxydants, free radicals, storage proteins, puroidolines and proteolytic activities in bread wheat (*Triticum aestivum*) seeds during accelerated aging. *J Agr Food Chem* 2004 ; 52 : 4274-81.
- Castilho RF, Meinicke AR, Almeida AM, Hermes-Lima M, Vercesi AE. Oxidative damage of Mitochondria induced by Fe (II) citrate is potentiated by Ca<sup>2+</sup> and includes lipid. Peroxydation and alteration in proteins. *Arch Biochem Biophys* 1994 ; 308 : 158-63.
- Corbineau F, Gay-Mathiey M, Vinel D, Côme D. Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. *Physiol Plant* 2002 ; 116 : 489-96.
- Dell Aquila A. Wheat seed aging and embryo protein degradation. *Seed Sci Res* 1994 ; 4 : 293-8.
- Delouche JC, Baskin CC. Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Sci Technol* 1973 ; 2 : 427-52.
- Echemmakh T, Serghini, Caid H, Elamrani A, Khalid A. Utilisation du traitement de vieillissement accéléré dans la recherche de l'aptitude au stockage de différentes variétés de blé marocain. In : Baaziz M, Hakkou A, eds. *Actes du Congrès international de biochimie de Marrakech, Maroc*. 2004.
- Geol A, Geol AK, Sheoran IS. Change in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *J Plant Physiol* 2003 ; 160 : 1093-100.
- Gidrol X, Serghini H, Noubhani A, Mocquot B, Pradet A. Biochemical changes induced by accelerated ageing in sunflower seeds. I. Lipid peroxydation and membrane damage. *Physiol Plant* 1989 ; 76 : 598-604.
- Haeth RL, Parker L. Photoperoxydation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxydation. *Arch Biochem Biophys* 1968 ; 125 : 189-98.
- Halhoul MN, Kleinberg I. Differential determination of glucose and fructose yielding substances with anthrone. *Anal Biochem* 1972 ; 50 : 337-43.
- Kalpana R, Rao KVM. Absence of the role of lipid peroxidation during accelerated ageing of seeds of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L) Mill) cultivators. *Seed Sci Technol* 1994 ; 22 : 253-60.
- Krishnan P, Nagarajan S, Dadlan M, Moharir AV. Characterisation of wheat (*Triticum aestivum*) and soybean (*Glycine max*) seeds under accelerated aging conditions by proton nuclear magnetic spectroscopy. *Seed Sci Technol* 2003 ; 31 : 541-50.
- Mazliak P. Plant membrane lipids : changes and alterations during aging and senescence. In : Lieberman M, ed. *Post Harvest Physiology and Crop Preservation*. New York : Plenum Press, 1983.
- McDonald MB. Seed deterioration : physiology repair and assessment. *Seed Sci Technol* 1999 ; 27 : 177-237.
- Monneveux P, Nemmar M. Contribution à l'étude de la résistance à la sécheresse chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et chez le blé dur (*Triticum durum* L.) : étude de l'accumulation de la proline au cours du cycle de développement. *Agronomie* 1986 ; 6 : 583-90.
- Narayana Murthy UM, Sun WQ. Protein modification by Amadori Maillard reactions during seed storage : roles of sugar hydrolysis and lipid peroxydation. *J Exp Bot* 2000 ; 51 : 1221-8.
- Parrish DJ, Leopold AC. On the mechanism of ageing in soybean seeds. *Plant Physiol* 1978 ; 61 : 365-8.
- Powell AA, Harman GE. Absence of a consistent association of changes in membranal lipids with the ageing of pea seeds. *Seed Sci Technol* 1985 ; 13 : 659-67.
- Priestly DA, Leopold AC. Lipid changes during natural aging of soybean seeds. *Physiol Plant* 1983 ; 59 : 467-70.
- Sun WQ, Leopold AC. The Maillard reaction and oxidative stress during ageing of soybean seeds. *Physiol Plant* 1995 ; 94 : 94-105.