Zeitschrift: Archives des sciences et compte rendu des séances de la Société
Herausgeber: Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève
Band: 44 (1991)
Heft: 2: Archives des Sciences

Artikel: Étude par la résonance magnétique nucléaire de la germination d'une céréale

Autor: Degli Agosti, Robert / Lenk, Rudolf / Greppin, Hubert

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-740199

Nutzungsbedingungen
Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation
L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use
The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 16.07.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Archs. Sci. Genève	Vol. 44	Fasc. 2	pp. 235-243	Genève, juin 1991

ETUDE PAR LA RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DE LA GERMINATION D'UNE CÉRÉALE

PAR

Robert DEGLI AGOSTI, Rudolf LENK et Hubert GREPPIN *

RÉSUMÉ

Le temps de relaxation longitudinal T1 des protons de l'eau a été suivi par la RMN en fonction de la germination à l'obscurité dans la graine d'avoine. T1 augmente de manière considérable de env. 30 à 350 ms entre le 2me et 9me jour après l'imbibition. L'albumen et, dans une moindre mesure, le cotylédon constituent les tissus qui sont à l'origine de ces variations. Ces mesures effectuées *in vivo* sont le reflet de l'augmentation de la dynamique moléculaire de l'eau liée aux profonds remaniements physiologiques et biochimiques dans la graine durant la germination.

SUMMARY

The longitudinal relaxation time T1 of water protons has been followed by NMR as a function of the germination in darkness in oats seeds. T1 increases considerably from ca. 30 to 350 ms between the 2nd and 9th day after imbibition. The endosperm and, in a lesser extent, the cotyledon are the tissues which generate these variations in the grain. These *in vivo* measurements represent the increase in water molecular dynamic which is linked to the important physiological and biochemical modifications that take place during the germination of the seed.

INTRODUCTION

La Résonance Magnétique Nucléaire (R.M.N.) est une technique bien établie pour l'étude de la matière en général, elle possède aussi un vaste champ d'application en biologie et en médecine de par son caractère non-destructif (Wüthrich, 1976; Lenk *et al.*, 1979; Gadian, 1982; Pfeffer et Gerasimowicz, 1989). Elle permet le dosage *in-vivo* de certaines molécules ou atomes (Schulman, 1983), la détermination de structures

* Laboratoire de Biochimie et Physiologie végétales, Pavillon des Isotopes, 20 Bd. d'Yvoy, CH-1211 Genève 4, Suisse.

internes (Imagerie RMN, p. ex. Young, 1988). Le lien étroit entre théorie et expérience (Abragam, 1961) a permis à Lenk (1986) l'élaboration d'une approche thermodynamique des systèmes vivants par RMN.

En biodynamique et en imagerie, les paramètres intéressants proviennent des temps de relaxation (T1 et T2) et plus particulièrement du temps de relaxation longitudinal T1 (Lenk, 1986; Young, 1988). Un champ magnétique (B_0) appliqué sur un végétal aimante celui-ci légèrement dans l'axe de B_0 (vecteur d'aimantation). Cet effet est dû à la somme des orientations individuelles des moments magnétiques (spins) des noyaux des atomes d'hydrogène (dans le cas de la ^{1}H-RMN) dans B_0. L'application d'un deuxième champ de radiofréquence spécifique (B_1) perpendiculaire à B_0 déplace l'orientation du vecteur d'aimantation. Lorsqu'on supprime B_1, ce vecteur retourne (relaxe) dans le sens du champ principal B_0. T1 est la constante de temps caractéristique décrivant la vitesse à laquelle s'effectue la relaxation suivant l'axe de B_0. T1 dépend du type de noyau considéré, de la position de cet atome dans la molécule, de l'agitation thermique et de l'environnement intra- et extramoléculaire (Lenk, 1986). Dans le cas de la RMN du proton, chez les végétaux, ce signal provient essentiellement de l'eau. Le temps T1 est une mesure globale du degré de liberté de cette molécule et des interactions de celle-ci avec les structures et les phénomènes qui prennent place dans la plante. Lenk (1979) a ainsi pu montrer que T1 est proportionnel à l'entropie de fluctuation du système considéré.

La germination de la graine est une étape fondamentale aussi bien pour la vie de la plante que pour ses applications agro-alimentaires. Les travaux utilisant la RMN sur les graines sont cependant peu nombreux. Des études ont été réalisées sur le processus de maturation (Grange *et al.*, 1980; Ishida *et al.*, 1987; Eccles *et al.*, 1988; Jenner *et al.*, 1988), leur contenu qualitatif (Colnago et Seidl, 1983), le phénomène d'imbibition (Ishida *et al.*, 1988; Wolk *et al.*, 1989), et la germination proprement dite (Chen *et al.*, 1979; Ishida *et al.*, 1990; Ricardo et Santos, 1990). Parmi ces derniers auteurs seuls Ishida *et al.* (1990) ont utilisé en plus de la ^{13}C-RMN et ^{31}P-RMN, la technique de ^{1}H-RMN chez le Soja.

Dans notre travail précédent (Degli Agosti *et al.*, 1989) nous avons mesuré *in-vivo* le temps de relaxation longitudinal T1 sur un seul germe d'avoine. Dans ce cas, nous obtenons un signal particulièrement net et intéressant au niveau du grain du germe. Il nous a semblé opportun de compléter notre approche par une étude dynamique dans le temps sur cette partie de la plante pendant la germination et le début de la croissance. Dans ce travail nous caractérisons les principaux paramètres physiologiques (poids frais, poids sec, teneur en eau et amidon) de ces processus et examinons dans quelle mesure T1 peut en donner une description non-invasive.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les graines d'avoine (*Avena sativa* L. cv Garry) dénudées, sont mises à germer sur de la vermiculite humidifiée avec de l'eau bidistillée et déionisée à l'obscurité totale à 22 + /-2°C. La germination est suivie en mesurant le poids frais de la plantule sans racine

et du grain isolé du germe. Le poids sec et la teneur en eau sont déterminés après déshydratation à 120°C pendant 24 h. Les déhydratations partielles des grains d'avoine (dépourvus de leurs racines et leurs coléoptiles) sont obtenues en plaçant le grain dans un premier petit tube en verre (1 ml), lui-même contenu dans un tube plus grand (13 ml). Selon que l'on ferme les tubes ou non, ou que l'on ajoute de l'eau entre ceux-ci, on obtient après immersion du grand tube dans un bain-marie à 100°C pendant 20 min, des pertes en eau se répartissant entre 100 et 5%. Dans certains cas, de l'eau bid. déionisée a été ajoutée dans le petit tube ce qui provoque des variations positives en eau de 0 à 10%.

L'amidon est dosé par une méthode enzymatique spécifique (Degli Agosti et Greppin, 1987) adaptée pour la circonstance: un seul grain d'avoine est broyé au mortier dans de l'eau bid. Ce mélange est centrifugé 10 min à 12000 g_{max}. Le culot est resuspendu dans de l'eau bid. et centrifugé 15 min à 17000g_{max}. Finalement, ce culot est resuspendu dans un tampon Na-Acétate (0.05 M pH 4.5) dans un tube étanche et soumis à un bain-marie pendant 1 heure à 100°C pour gélatiniser l'amidon. L'amyloglucosidase (SIGMA) est ajoutée à une concentration finale de 5.4 U/ml et l'hydrolyse totale de l'amidon en glucose obtenue à 40°C pendant 2 h. Le glucose est alors mesuré par une méthode enzymatique spécifique (Degli Agosti *et al.*, 1990).

Les mesures par RMN sont faites sur un appareillage travaillant à 25 MHz déjà décrit (Lenk *et al.*, 1984) et complété avec une nouvelle tête de mesure et un amplificateur (Degli Agosti *et al.*, 1989). Le temps de relaxation longitudinal (T1) est obtenu par la méthode de l'"inversion recovery" grâce à la séquence de deux impulsions de radiofréquences 180°-t-90°, où t est le temps entre les deux impulsions (Lenk *et al.*, 1984; Lenk, 1986). Pour la mesure de T1, le grain d'avoine auquel on enlève, s'ils sont présents, le coléoptile et la racine, est introduit dans un tube RMN standard (diam. 5 mm) où le volume efficace de l'appareil correspond aux dimensions du grain.

Les valeurs présentées sont la moyenne et l'écart-type de 10 à 60 mesures individuelles regroupant plusieurs expériences (2 à 5) indépendantes dans le temps.

RÉSULTATS

L'évolution du poids frais de la graine et de la plantule d'avoine (sans la racine), germée à l'obscurité totale est présentée à la fig. 1. Comme on peut le constater, la germination (émergence de la racine) débute vers 2 à 3 jours, puis le poids frais de la plantule augmente régulièrement jusqu'à 10 jours. Le poids frais du grain (dépourvu du coléoptile et de la racine, s'ils sont présents) augmente initialement de env. 19 mg à 25 mg en 2 jours, ce qui correspond à l'imbibition complète de la graine, et reste constant par la suite (voir aussi table 1). L'export de matière du grain vers le coléoptile et la racine se mesure aisément par la variation du poids sec dans cet organe durant le temps (fig. 2). Celui-ci diminue de 17 mg à env. 2 mg en moyenne par graine. Cet export de matière est compensé par une prise d'eau régulière (fig. 2).

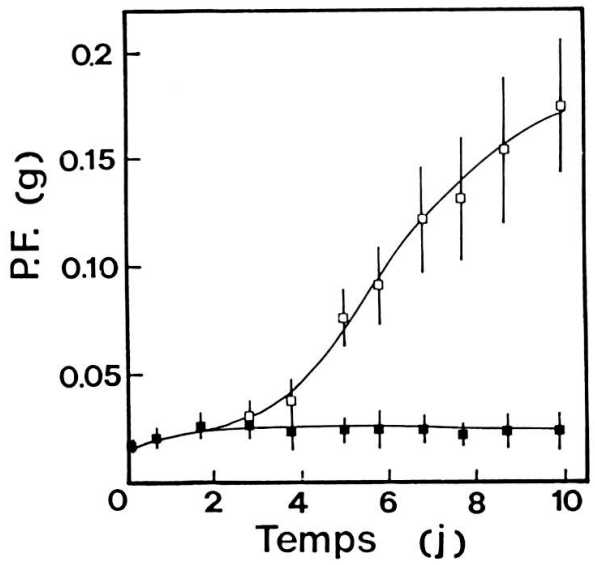

FIG. 1.

Evolution du poids frais du grain du germe d'avoine sans (■) et avec (□) le coléoptile en fonction du temps après le début de l'imbibition à l'obscurité totale et sans apport d'éléments nutritifs.

L'amidon (fig. 3), dont la teneur initiale constitue près de 62% du poids sec de la graine (11 + /-2.6 mg/graine), diminue rapidement dès le 2me jour après l'imbibition (env. 0.43 g/g P.F.) pour atteindre env. 0.04 g/g P.F. vers 9 jours. Ainsi la diminution de poids sec représente env. 15 mg par graine dont 11 mg sont dus à l'hydrolyse de l'amidon, soit env. 73%.

L'émergence de la radicule vers 2-3 jours est suivie par celle du coléoptile (3 jours). Dès ce stade, la graine du germe peut être grossièrement divisée en 3 tissus: l'enveloppe qui entoure celle-ci, le cotylédon et l'albumen. En pratique, nous pouvons séparer l'enveloppe et le cotylédon. Nous avons mesuré le T1 dans ces deux tissus, ainsi que dans les graines entières. Le T1 dans ces dernières est le résultat de la contribution pondérale des T1 de chaque tissu. On peut donc calculer par différence le T1 de l'albumen (table 1). Le T1 de la graine du germe varie de manière significative sur cette période. Il en est de même pour le cotylédon. En revanche, le T1 de l'enveloppe reste constant. Le poids frais du cotylédon augmente de env. 60% puis reste à la même valeur. Le poids frais de l'enveloppe ne varie pas.

L'évolution de T1 en fonction du temps dans la graine du germe est représentée à la fig. 4. Les valeurs sont très courtes (env. 30 ms) vers 2 à 3 jours, puis augmentent considérablement jusqu'à 9 jours après l'imbibition (env. 350 ms).

Lorsqu'on tue des grains de germes âgés de 8 jours par un traitement à la chaleur (100°C, 20 min), celles-ci perdent de l'eau en fonction des conditions d'échauffement. Les variations du temps longitudinal de relaxation T1 exprimées en % par rapport à la

TABLE 1.

Temps longitudinal de relaxation T1 et poids frais dans différentes parties du grain de germe d'avoine à 3,5 et 7 jours après le début de l'imbibition en obscurité totale. Les lettres minuscules (^{a,b,c}) représentent des moyennes statistiquement différentes en fonction du temps (Test "t" de Student. P< =0.025).

Temps (jours)	3	5	7
Grain de germe isolé complet (Enveloppe + Cotylédon + Albumen)			
T1 (ms)	39.0+/-14.7^a	107.9+/-36.3^b	191.4+/-63.3^c
P.F. (mg)	25.51+/-8.92^a	24.74+/-6.02^a	23.09+/-7.38^a
Enveloppe			
T1 (ms)	106.2+/-13.4^a	107.3+/-13.5^a	121.0+/-16.8^a
P.F. (mg)	4.9+/-0.6^a	5.1+/-1.8^a	4.9+/-1.2^a
Cotylédon			
T1 (ms)	87.3+/-22.4^a	189.0+/-32.2^b	253.8+/-36.2^c
P.F. (mg)	2.7+/-0.7^a	4.3+/-1.1^b	4.2+/-0.8^b
Albumen (calculé)			
T1 (ms)	31.0	96.3	220.0

valeur avant l'échauffement sont représentées en fonction de la perte d'eau (fig. 5). Une droite de régression peut être ajustée à ces mesures par la méthode des moindres carrés avec un bon coefficient de corrélation (0.95). La pente vaut 0.92 avec un intervalle de confiance (95%) de +/-0.10, elle peut être considérée comme égale à 1. La valeur de l'ordonnée à l'origine de T1 correspondant à une perte nulle d'eau vaut -2.7% avec un intervalle de confiance (95%) de +/-6.0%. Ainsi, lorsqu'il n'y a pas de modification de la teneur en eau, la variation de T1 après échauffement est nulle. Ces résultats sont remarquables, car ils sont obtenus avec un lot de graines très hétérogènes. L'"erreur relative" du rapport poids sec/poids frais représente près de 41% de la moyenne (0.2132). De même, les T1 ont une moyenne de 218.7 ms +/- 106.0, soit une "erreur relative" de 48%. Les grains de ces germes sont donc à des stades de développement très différents les uns des autres, mais montrent une très bonne cohérence après les transformations en variations individuelles (fig. 5).

DISCUSSION

Dans nos conditions expérimentales (obscurité, absence d'éléments nutritifs) la germination des graines d'avoine débute vers 2-3 jours à partir de l'imbibition (fig. 1). L'amidon, principal composant organique dans la graine (voir aussi Duprat *et al.*, 1980), est progressivement hydrolysé pour l'export de ses produits vers le coléoptile et les racines en croissance (fig. 3). Cet export est compensé, dans le grain du germe, par une prise d'eau correspondante de telle sorte à ce que le poids frais du grain du germe reste dès lors constant (fig. 2).

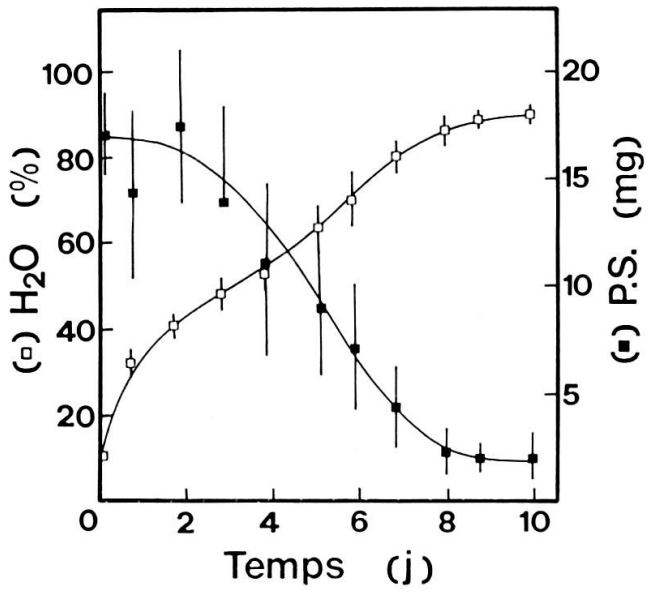

FIG. 2.

Poids sec (■) moyen et teneur en eau moyenne (□) des grains de germes d'avoine en fonction du temps après le début de l'imbibition à l'obscurité totale.

Le temps de relaxation longitudinal T1 mesuré dans le grain du germe augmente dans les proportions considérables de 30 à 350 ms entre 2 et 9 jours (table 1 et fig. 4). La contribution des différentes parties de la graine (enveloppe, albumen et embryon) montre que ce sont l'albumen et l'embryon qui participent à cette augmentation, l'albumen étant le tissu où T1 augmente le plus et qui contribue le plus (env. 80%) à l'évolution dynamique du signal RMN (table 1). C'est également dans ce tissu que se situent les réserves d'amidon et où la concentration relative en eau augmente le plus.

A l'âge de 8 jours, mais pour un ensemble de grains de germes à des stades de développement très hétérogènes, nous démontrons qu'il existe une bonne relation linéaire équivalente, à un instant donné, entre toute variation de la teneur en eau et la variation correspondante du signal RMN (fig. 5). Ce dernier est donc uniquement dû à

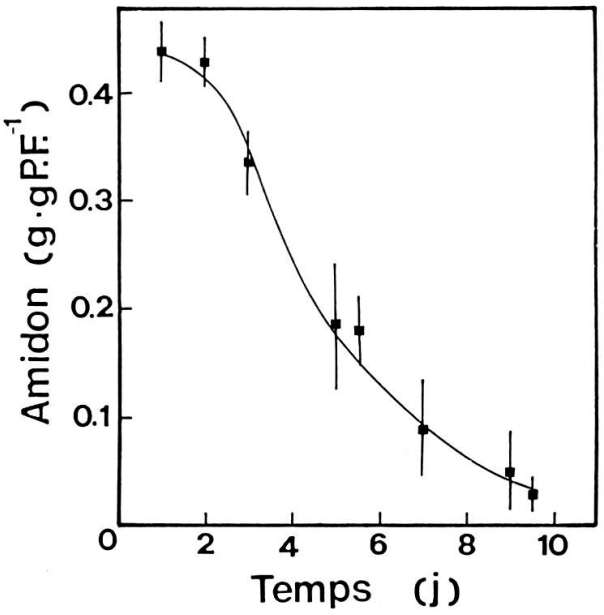

FIG. 3.

Teneur en amidon des grains de germes d'avoine en fonction du temps après le début de l'imbibition à l'obscurité totale.

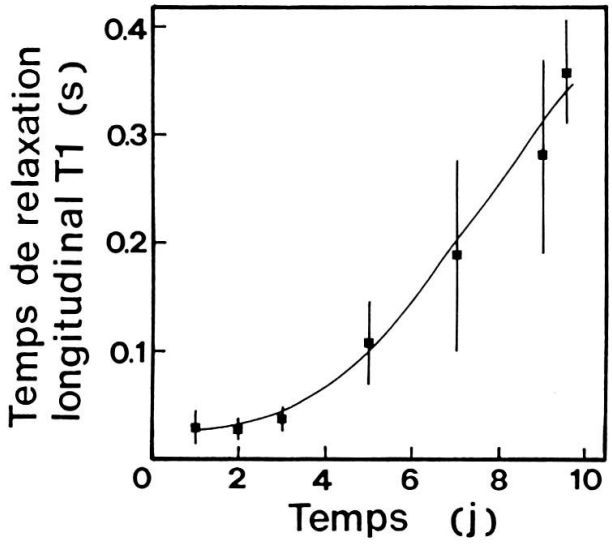

FIG. 4.

Temps longitudinal de relaxation T1 des protons de l'eau des grains de germes d'avoine en fonction du temps après le début de l'imbibition. Le temps T1 de l'eau bidistillée déionisée est de env. 2.6 sec.

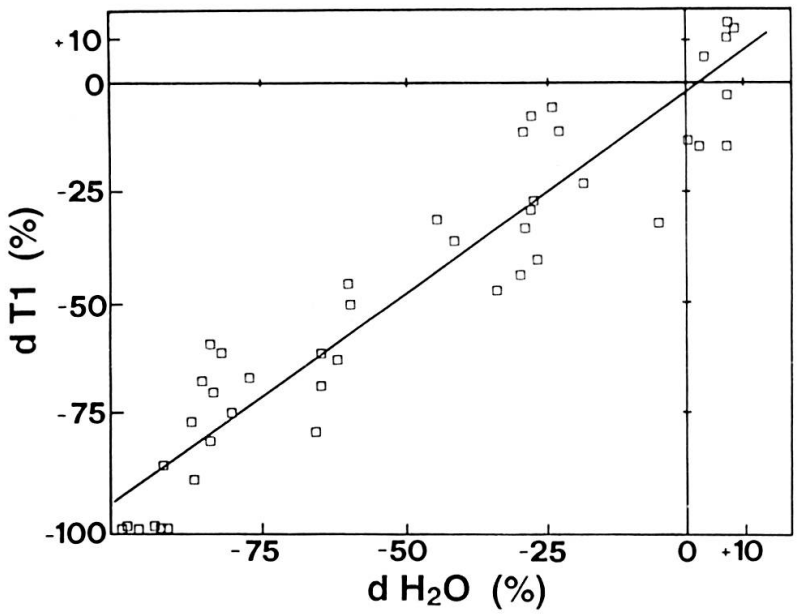

FIG. 5.

Variation du temps de relaxation longitudinal T1 (d T1) dans les grains de germes d'avoine âgés de 8 jours après un traitement à la chaleur (100 °C, 20 min.) exprimé par rapport au T1 avant l'échauffement en fonction de la perte relative en eau (d H_2O) au cours du même traitement. La droite représentée est celle ajustée par la méthode des moindres carrés.

l'eau. Dans le temps, la concentration relative en eau est gouvernée par l'export de matière hors du grain du germe. T1 reflète bien cette dynamique (figs. 1 et 4) et permet ainsi une mesure non-invasive de la teneur en eau dans cet organe et indirectement de l'état physiologique (stade de développement) de ce tissu.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAGAM A. (1961). *Principes du magnétisme nucléaire*. Presses Universitaires de France, Paris.

CHEN S.-C., ELOFSON M.R. and MACTAGGART J.M. (1979). C^{13}-NMR studies of lipids and starch digestion in intact seeds. *J. Agric. Food Chem.* 27:435-438.

COLNAGO L.A. and SEIDI. P.R. (1983). Application of C^{13}-NMR to the germination et soybean seeds *in-vivo*. *J. Agric. Food Chem.* 31:461-463.

DEGLI AGOSTI R. et GREPPIN H. (1987). Extraction, identification et dosage des sucres du pétiole de l'épinard (*Spinacia oleracea* L. cv. Nobel) pendant la variation de photopériode. *Bot. Helv.* 97:239-340.

DEGLI AGOSTI R., LENK R. et GREPPIN H. (1989). Examen d'une plantule par la RMN. *Saussurea.* 20:89-95.

DEGLI AGOSTI R., NAIDET C. et MILLET B. (1990). Métabolisme du glucose dans le pulvinus secondaire de *Phaseolus vulgaris* L. au cours du mouvement foliaire circadien. *Bot. Helv.* 100:249-256.

DUPRAT F., GALLANT D., GUILBOT A., MERCIER C. et ROBIN J.P. (1980). L'amidon, *In*: MONTIES B. (ed.). *Les polymères végétaux*. Bordas, Paris, pp. 176-231.

ECCLES C.D., CALLAGHAN P.T. and JENNER C.F. (1988). Measurement of the self-diffusion coefficient of water as a function of position in wheat grain using NMR imaging. *Biophys. J.* 53:77-81.

GADIAN D.G. (1982). *NMR and living systems*. Clarendon Press, Oxford.

GRANGE A., DUPANLOUP A., DESCOUTS P. et BENE G. (1980). Evolution du temps spin-réseau, T1, des protons de l'eau biologique au cours de la maturation des graines de haricot. *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci. Paris*. 291:307-309.

ISHIDA N., KANO H., KOBAYASHI T., HAMAGUCHI H. and YOSHIDA T. (1987). Estimation of biological activities by NMR in soybean seeds during maturation. *Agric. Biol. Chem.* 51:301-307.

ISHIDA N., KANO H., KOBAYASHI T. and YOSHIDA T. (1988). The analysis of physical states of water in soybean seeds by NMR. *Agric. Biol. Chem.* 52:2777-2781.

ISHIDA N., KOBAYASHI T., MASUDA R., KANO H., YOSHIDA T. and OGAWA H. (1990). Tracing metabolic changes in soybean cotyledons during germination by NMR. *Agric. Biol. Chem.* 54:1359-1365.

JENNER C.F., XIA Y., ECCLES C.D. and CALLAGHAN P.T. (1988). Circulation of water within the wheat grain revealed by nuclear magnetic resonance micro-imaging. *Nature*. 336:399-402.

LENK R. (1979). Time-evolution of entropy of fluctuation in some biological systems as investigated by NMR. *Chem. Phys. Letters*. 62:399-401.

— (1986). *Fluctuations, diffusion and spin relaxation*. Elsevier, Amsterdam.

LENK R., BONZON M. DESCOUTS P. et GREPPIN H. (1979). La résonance magnétique nucléaire: une approche nouvelle en biologie végétale. *Saussurea*. 10:11-48.

LENK R., DUPANLOUP A., DESCOUTS P. et GREPPIN H. (1984). Réalisation d'un spectromètre RMN pour l'étude des végétaux. *Saussurea*. 15:25-31.

PFEFFER E. P. and GERASIMOWICZ W.V. (eds.). (1989). *Nuclear magnetic resonance in agriculture*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

RICARDO P.P.C. and SANTOS H. (1990). Application of ^{31}P-NMR to monitor phosphorus compounds and their changes during germination of legume seeds. *J. Exp. Bot.* 41:79-87.

SHULMAN R. (1983). La spectroscopie RMN des cellules vivantes. *Pour la Science*. 65:84-93.

YOUNG S. W. (1988). *Magnetic resonance imaging: basic principles*. Raven Press, New-York.

WOLK W.D., DILLON P.F., COPELAND L.F. and DILLEY D.R. (1989). Dynamics of imbibition in *Phaseolus vulgaris* L. in relation to initial seed moisture content. *Plant Physiol.* 89:805-810.

WÜTHRICH K. (1976). *NMR in biological research*. North-Holland, Amsterdam.