

Inhibition et stimulation de la germination des graines d'*Ambrosia trifida* (L.) ⁽¹⁾

par

MAI TRẦN-NGỌC-TIẾNG

Laboratoire de Physiologie générale
Faculté des Sciences - Saigon - Viêt-Nam

ABSTRACT. — The purpose of this study was to break the dormancy of the *Ambrosia trifida* L. seeds, to locate and characterize the inhibitory material from the *A. trifida* fruits.

Many treatments were investigated but only the following were effective : the fruits afterripened after a four-month period of leaching at 3°C ; their germination was hastened by high pressure of oxygen, and the dormancy of the seeds could be broken by thiourea and other SH group compounds. Gibberellic acid was also active on *A. trifida* seeds.

The presence of the inhibitory material was determined by assaying the plant extract using the *Avena* coleoptile straight growth test and the germination of after-ripened *A. trifida* seeds. The techniques of paper chromatography was utilized to isolate and characterize the inhibitory material. Inhibitors were identified with pure chemicals as to their fluorescence, their R_fs in different solvents, and their biological effects on germination.

Strip-loaded chromatography technique showed that two inhibitory spots were present in the *A. trifida* fruit extract : one at R_f. 0-.3 and the other at R_f. 5-9. The changes which took place in the activity of the compounds during the leaching and the storage showed that only zone. 0-1 in the fruit coat and zone. 7-8 in the seeds contained the most active of the inhibitors in *A. trifida*.

Their identification and mode of action will be published somewhere else.

1. — Introduction :

La germination est la reprise de la croissance par l'embryon et la continuation de cette croissance jusqu'à la plantule. En général, les conditions qui

(1) Ce travail constitue une partie des recherches faites en vue de l'obtention du Doctorat es-Sciences (Ph. D) par Mai Tran-Ngoc-Tiêng à Purdue University (U.S.A.) le 25 Mai 1962.

sont favorables à la croissance de la plante-mère le sont aussi pour la germination de ses graines. Cependant, il existe beaucoup de cas dans lesquels les graines restent dormantes même si toutes ces conditions favorables sont remplies. La période de dormance est variable, elle peut durer de quelques mois jusqu'à plusieurs années.

Au cours de la germination, trois phénomènes physiques peuvent être observés : une absorption d'eau, une division et une élongation cellulaire. Normalement après l'imbibition d'eau, on remarque une augmentation de l'intensité respiratoire, fonction qui va fournir de l'énergie requise par les étapes qui suivent. Quand toutes ces phases sont accomplies, les graines peuvent alors entrer en vie active. EVENARI a souligné que la différence entre une graine dormante et une graine non dormante réside soit dans les conditions externes liées au milieu environnant, soit dans les obstacles internes inhérents à la graine.

Les facteurs externes sont : la température, la lumière, l'humidité et l'oxygène, les facteurs internes sont : l'immaturation physiologique de la graine, l'imperméabilité de ses téguments, la présence des inhibiteurs et l'absence des substances de croissance.

L'*Ambrosia trifida* appartient à la tribu des Hélianthées de la famille des Composées. Les fruits sont des akènes secs indéhiscent formés d'un embryon exalbuminé à cotylédons très charnus entouré d'une membrane nucellaire vivante et de deux téguments très durs qui constituent le péricape de l'akène.

Dans les conditions naturelles, ces akènes mûrissent vers le début du mois d'Octobre, se détachent aussitôt de la plante-mère et passent à l'état de vie ralentie jusqu'à début du mois de Mars. A cette période, les akènes commencent à germer alors que le sol est encore recouvert de neige. Les expériences de DARLINGTON et STEINBAUER (1961) ont prouvé que les graines d'*Ambrosia* sont encore viables après avoir été enterrées pendant 40 ans ; pendant ce temps les graines restent dormantes et ne retournent à la vie active que lorsqu'elles rencontrent les conditions favorables.

2. — Essais préliminaires :

Les akènes d'*A. trifida* sont récoltées tous les ans, de 1959 à 1961, au début d'Octobre. Elles sont détachées, lavées et séchées, puis conservées dans les flacons en matière plastique à large col bien fermés. Les essais de germination sont faits aussitôt après la récolte et à toutes les semaines d'intervalle. Ils sont pratiqués de la façon suivante : dix graines nues ou dix akènes sont placées dans des boîtes de Pétri de 10 cm. de diamètre, garnies de deux cercles de papier filtre humectés par 3 ml. d'eau distillée. Ces boîtes de Pétri sont placées sous un éclairage continu à la température du laboratoire (25°C). Un demi centicube d'eau distillée est ajouté à chaque boîte tous les jours pour maintenir les graines dans une atmosphère humide. Le compte est fait au bout de 3 jours et les graines sont considérées comme germées lorsqu'elles présentent une radicule longue de 4 mm. et deux cotylédons déjà verts.

Ces essais de germination prouvent que ni les graines nues, ni les akènes d'*A. trifida* ne peuvent germer au moment à la récolte.

A. — Facteurs externes.

Pour déterminer les conditions favorables à leur germination nous avons cherché à faire varier les conditions externes notamment la température, la lumière, l'eau et l'oxygène.

a) Les températures s'échelonnant de -20°C à 36°C sont essayées — Elles sont employées d'une façon continue ou alternative. Cependant aucun de ces traitements n'a donné de bon résultat.

b) Les lumières continue et intermittante n'ont aucun effet sur la dormance.

c) L'humidité : Les graines sont laissées trempées dans l'eau à 30°C et l'eau étant renouvelée tous les 24 heures. Ce traitement brise la dormance des graines d'*A. trifida* au bout de 3 mois.

d) Oxygène : Les graines et les akènes sont exposées quotidiennement à un courant continu d'oxygène d'une durée de cinq minutes. Les effets de l'oxygène sont figurés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Effet de l'oxygène sur la Dormance
des graines d'*A. trifida* (L.)

Traitement	% de germination	Durée de traitement
18 mois à 3°C		
Akènes intacts	40	6 semaines
Akènes coupés aux 2 extrémités.	100	1 »
18 mois à 25°C		
Akènes intacts	20	4 »
Akènes coupés aux 2 extrémités.	100	1 »
gardées 2 mois à 25°C		
Akènes intacts	0	8 »
Akènes avec 2 extrémités coupées	0	»
Graines nues	0	»
lavées 2 mois à 3°C		
Graines nues	100	1 »
Akènes ayant 2 extrémités coupées	40	»

Discussion :

Les essais préliminaires tentés pour briser la dormance des graines d'*A. trifida* nous permettent de déduire que la façon la plus efficace, pour briser la dormance est soit un lavage à basse température soit un traitement par une forte pression d'oxygène.

L'eau est reconnue importante par son pouvoir solubilisant des engymes et des substances nutritives, les rendant disponibles à l'embryon en croissance.

Elle peut aussi ramollir les téguments des akènes et les rend plus perméables à l'oxygène, stimulant ainsi la respiration cellulaire et le dégagement de l'énergie nécessaire pour la croissance de l'embryon.

L'eau peut encore entraîner les inhibiteurs éventuels qui pourraient exister dans la graine.

L'embryon exige de l'oxygène pour germer. Ce gaz pourrait détruire les inhibiteurs de la graine et les réduire à une concentration minimum à laquelle la germination pourrait avoir lieu.

Dans les graines fraîchement récoltés, maintenues à 25°C pendant deux mois, la quantité d'inhibiteurs serait peut-être encore forte de sorte qu'ils résisteraient à une forte pression d'oxygène. Quand ces graines sont lavées par l'eau froide à 3°C, les inhibiteurs seraient entraînés et la faible quantité qui resterait serait détruite par une plus faible pression d'oxygène.

Quant aux basses températures (3° C), elles ont été démontrées par STOCKES comme pouvant dégrader les composés insolubles en composés solubles utilisables par l'embryon. Elles favorisent la migration des réserves de l'albumen vers l'embryon et stimulent l'activité des enzymes de la graine. Elles réduisent aussi la quantité des inhibiteurs.

B. — Facteurs internes.

a) Les téguments de l'akène.

Plusieurs traitements physiques comme l'ébullition dans l'eau, l'immersion dans l'alcool ou les scarifications des téguments n'ont donné aucun bon résultat.

b) Addition de certains composés chimiques :

Certains composés sont ajoutés aux graines parce que leur absence inhibe la germination de certaines espèces. Pour cela.

Les graines d'*A. trifida* sont stérilisées au chlorox au 1/5 pendant cinq minutes puis lavées pendant 24 h. à l'eau distillée.

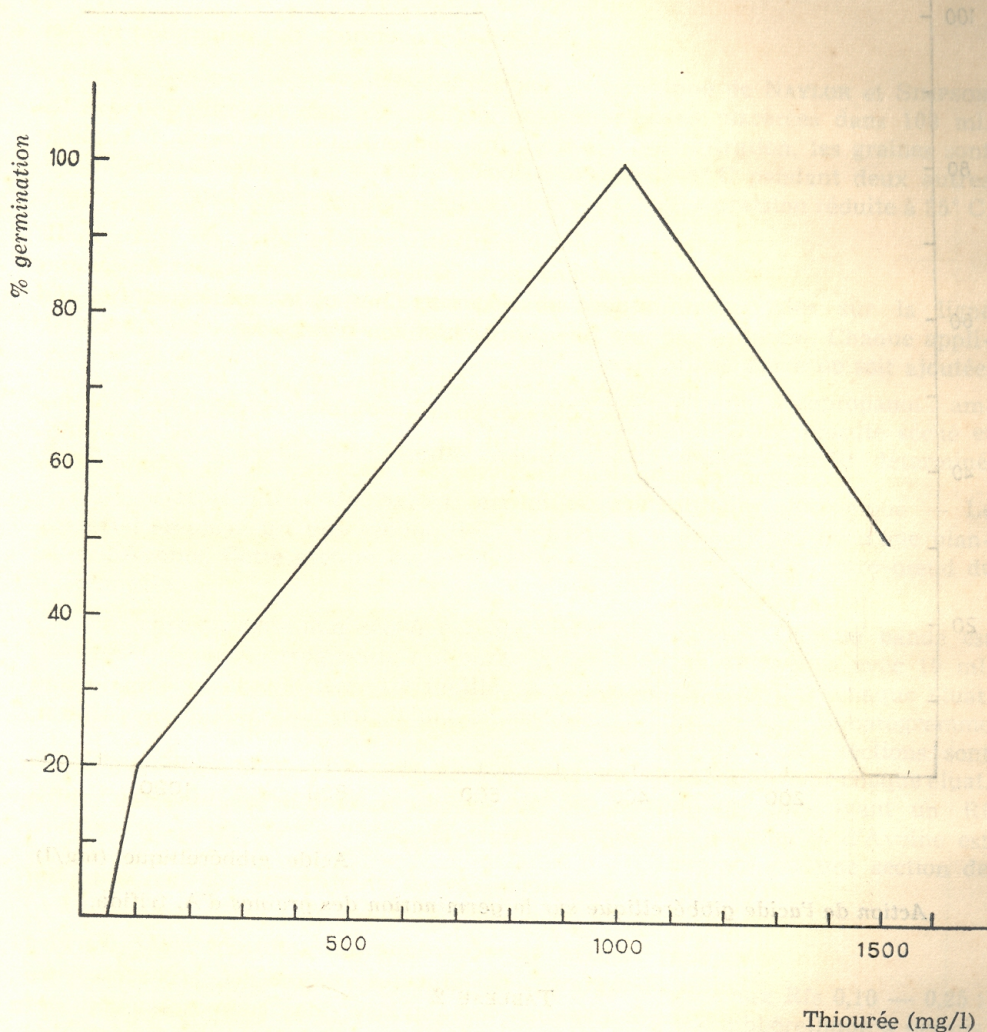
Dix d'entre elles sont laissées germées dans des solutions soit : d'acides aminés comme l-alanine, l-arginine, de glucides comme le saccharose, des enzymes comme la lipase, la papaïne, les amylases, des composés ayant des groupements SH comme la thiourée, la cystéine, la méthionine et des substances de croissance comme la gibbérelline A.

Les résultats prouvent que seuls les composés à groupements SH (notamment la thiourée) et une substance de croissance comme l'acide gibbérellique sont efficaces pour briser la dormance des graines *A. trifida*.

Toutefois l'action de la thiourée est différente de celle de l'acide gibbérellique, la thiourée est efficace jusqu'à la concentration de 1 g. par litre et devient toxique au-dessus de cette concentration (graphique I).

L'effet de l'acide gibbérellique augmente avec la concentration jusqu'à 0,6 mg. par litre et reste stationnaire pour des concentrations plus élevées. (graphique II).

GRAPHIQUE I

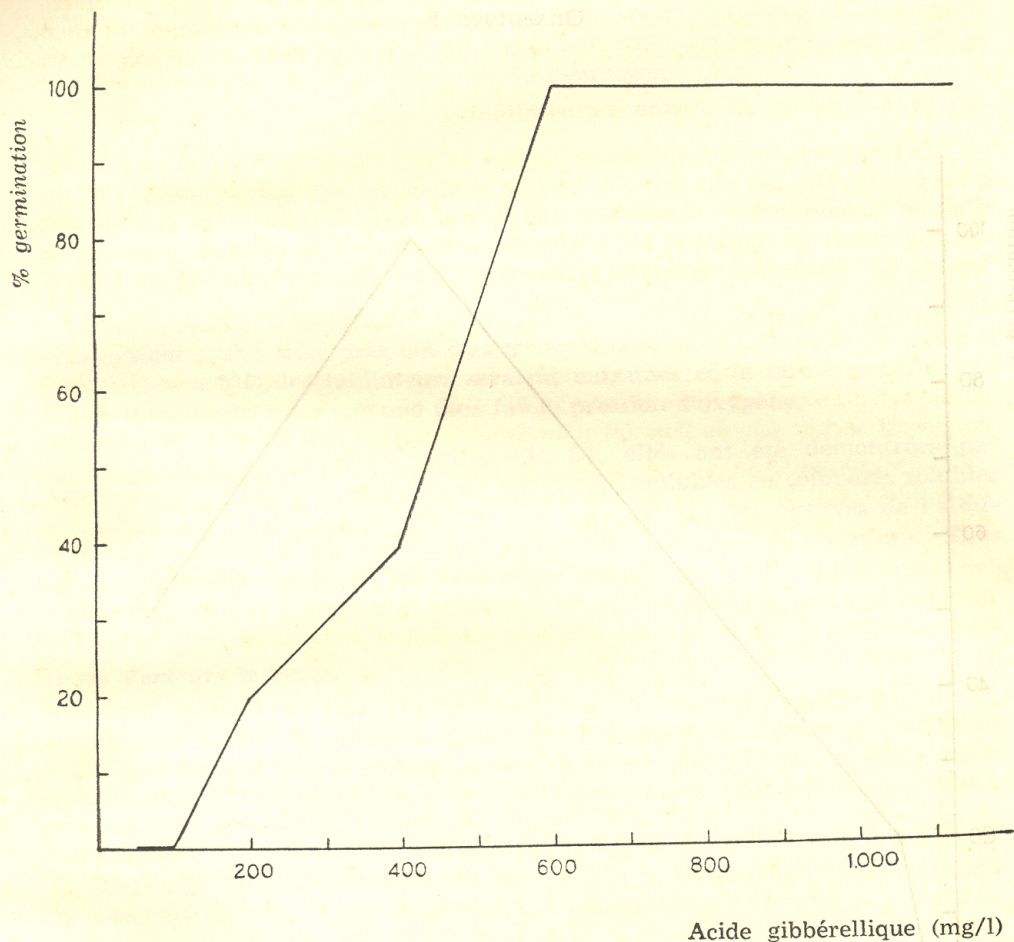


Stimulation de la germination des graines d'A. trifida fraîchement récoltées par la thiourée.

L'action de l'acide gibbéréllique est aussi essayée sur les graines lavées pendant 2 mois à 3° C (groupement II).

Quand on compare l'effet de cette substance sur les graines lavées et celui sur les graines non lavées, on remarque que la concentration optimale pour la germination des graines lavées est 6 fois plus faible que celle pour les graines non lavées. (Tableau 2).

GRAPHIQUE II



Action de l'acide gibbérellique sur la germination des graines d'A. trifida.

TABEAU 2

Action de l'acide gibbérellique sur les graines d'A. trifida lavées et non lavées âgées de 2 mois.

Concentration (mg/l)

	10	30	50	100	200	400	600	800	1.000
Germination :									
Graines lavées	50	50	50	100	100	100	100	100	100
Graines non lavées . . .	0	0	0	0	20	40	100	100	100

Détermination de l'acide gibbérellique :

Ces résultats nous suggèrent qu'au cours du lavage à 30° C, l'acide gibbérellique serait probablement formé, ce qui nous pousse à déterminer et comparer la formation de cet acide dans les graines d'*A. trifida* lavées et non lavées.

a) Extraction de l'acide gibbérellique.

Les extractions ont été faites suivant la technique de NAYLOR et SIMPSON d'après laquelle 50 graines d'*A. trifida* sont laissées macérées dans 100 ml. d'alcool éthylique à 4° C pendant une heure. Après filtration, les graines sont ensuite macérées dans 100 ml. d'alcool éthylique à 4° C pendant deux autres heures. Les filtrats sont réunis et concentrés à 1 ml. sous pression réduite à 35° C.

b) Essais biologiques :

L'extrait concentré est appliqué en lignes horizontales sur la ligne de départ d'un papier filtre Whatman N° 1 de 35 cm. × 40 cm. Chaque application est séchée par un courant d'air froid avant qu'une autre ne soit ajoutée.

Le chromatogramme est développé dans une solution d'isopropanol : ammoniaque : eau (10 : 1. 1) par la méthode ascendante. Il est ensuite séché et découpé en dix bandes horizontales chacune correspondant à un Rf déterminé.

Le « test-feuille » de NITSCH est utilisé comme essai biologique — Le matériel employé est une section de 5 mm. de la première feuille d'une plantule d'Avoine. Cette section est localisée au-dessus du premier entre-nœud de la plantule.

Le chromatogramme séché est divisé en dix bandes. Chaque bande est découpée en petits fragments qui sont élués pendant 24 heures avec 10 ml. d'eau distillée. Dix sections de feuilles sont laissées flotter dans chaque éluat. Le témoin est constitué par l'éluat d'une bande identique du chromatogramme qui n'a pas reçu d'extrait. Au bout de 24 heures toutes les sections sont mesurées et la moyenne des longueurs des sections est calculée pour chaque éluat. Chaque valeur correspond à une bande du chromatogramme ayant un Rf déterminé. L'activité de chaque Rf sur la croissance de feuilles d'Avoine est donnée par le pourcentage de la croissance du témoin qui est une section de feuille flottée dans l'éluat de la bande témoin.

c) Résultats :

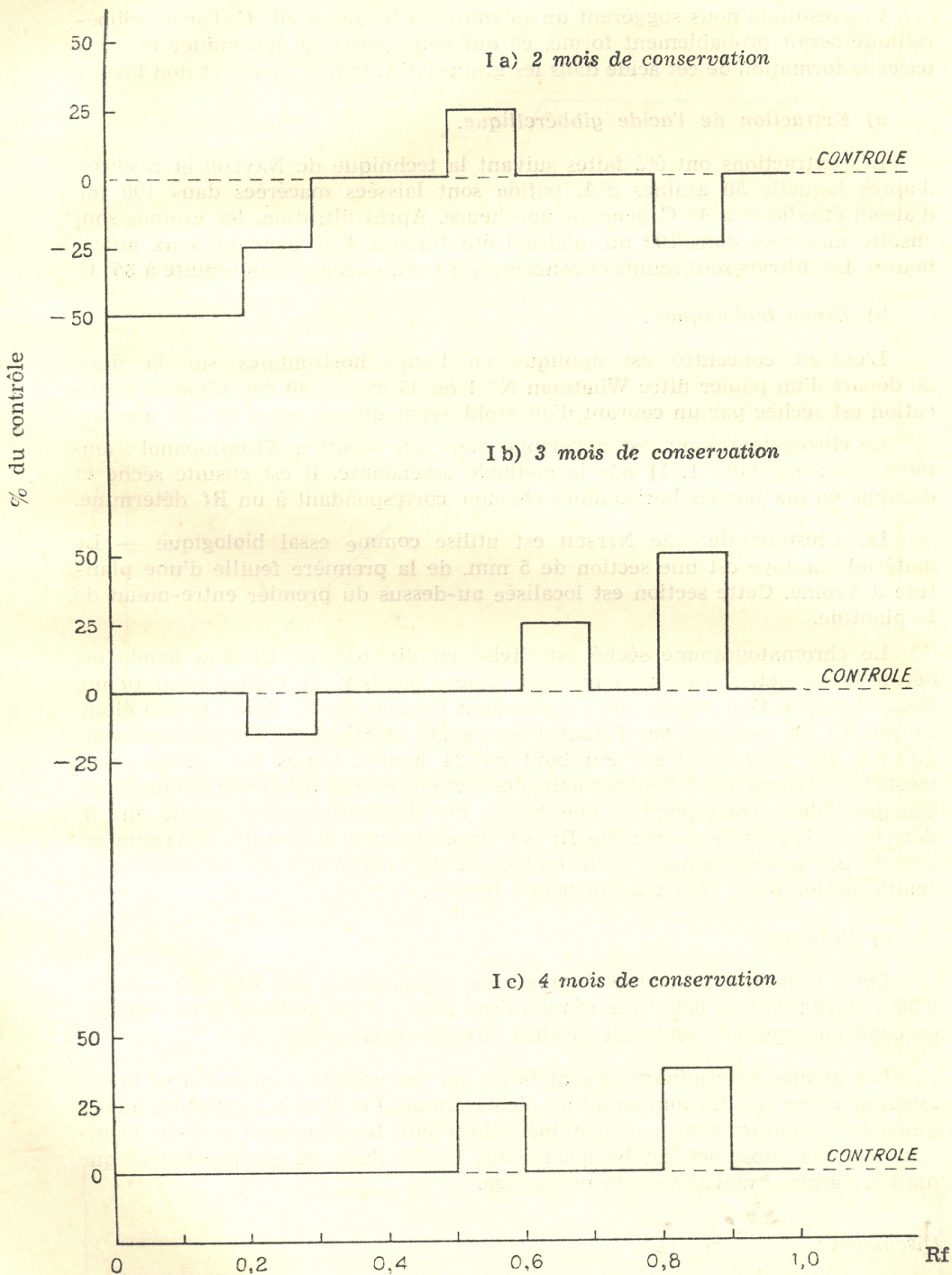
Cette technique permet de localiser les gibbérellines aux Rfs 0,10 — 0,25 ; 0,55 — 0,70 ; 0,75 — 0,90. Une comparaison avec l'acide gibbérellique a permis de confirmer que cet acide est localisé aux Rfs 0,55 — 0,7.

Les mêmes déterminations sont faites sur les graines non lavées et lavées ayant le même âge. En comparant les histogrammes I et II nous constatons qu'il y a une formation progressive des gibbérellines dans les deux graines mais l'activité de cette substance est beaucoup plus élevée dans les graines lavées que dans les graines non lavées du même âge.

Discussion :

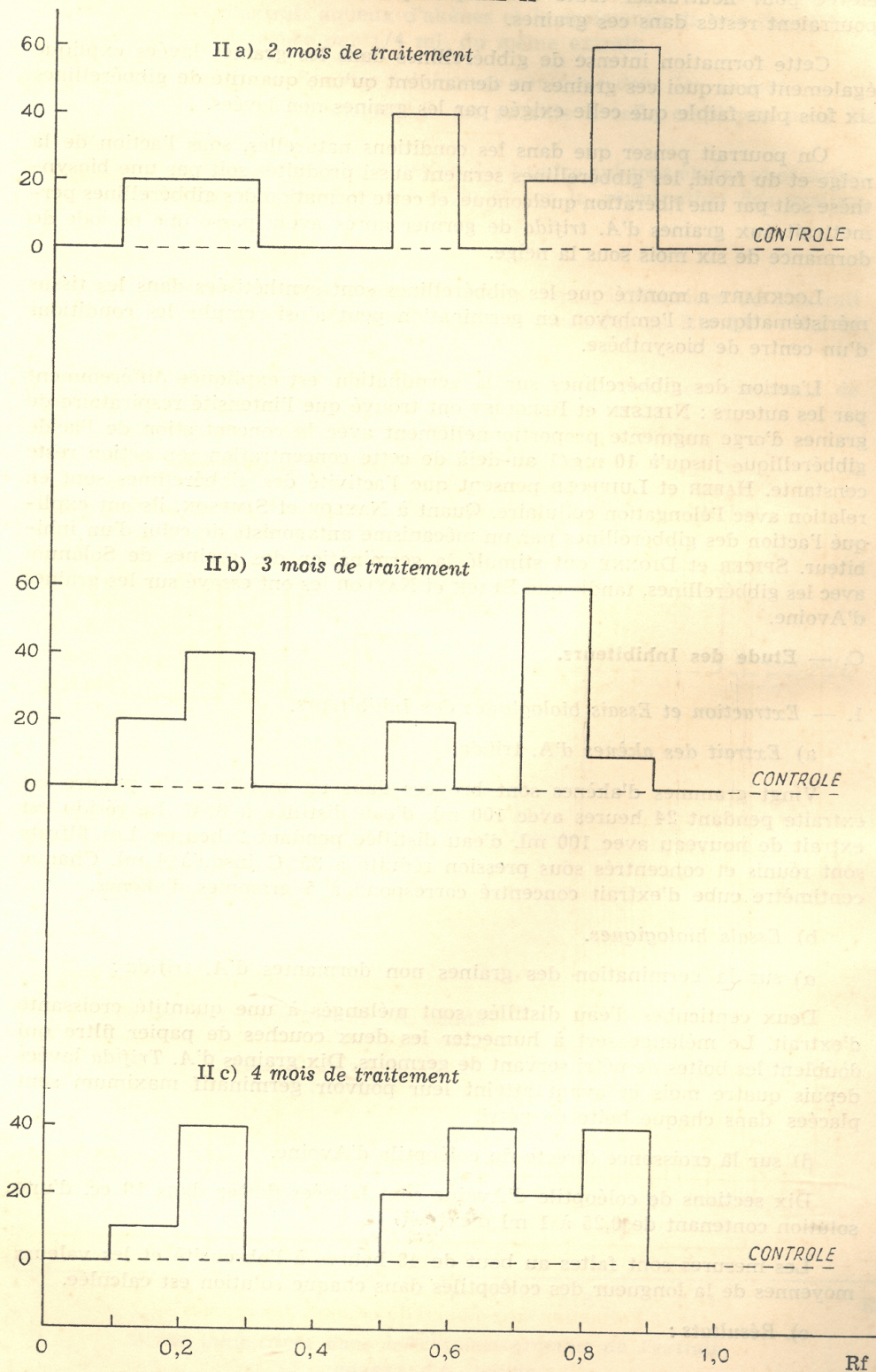
Le pouvoir germinatif des graines lavées atteint 100 % au bout de 4 mois ce qui laisse penser que les gibbérellines sont formés en quantité suffisamment

HISTOGRAMME I



Formation des gibbérellines dans les graines
d'*A. trifida* conservées à 25° C.

HISTOGRAMME II



Formation des gibbérellines dans les graines lavées à 3° C.

élevée pour neutraliser toute action paralysante d'éventuels inhibiteurs qui pourraient restés dans ces graines.

Cette formation intense de gibbérellines dans les graines lavées explique également pourquoi ces graines ne demandent qu'une quantité de gibbérellines six fois plus faible que celle exigée par les graines non lavées.

On pourrait penser que dans les conditions naturelles, sous l'action de la neige et du froid, les gibbérellines seraient aussi produites soit par une biosynthèse soit par une libération quelconque, et cette formation des gibbérellines permettrait aux graines d'*A. trifida* de germer après avoir passé une période de dormance de six mois sous la neige.

LOCKHART a montré que les gibbérellines sont synthétisées dans les tissus méristématiques ; l'embryon en germination peut ainsi remplir les conditions d'un centre de biosynthèse.

L'action des gibbérellines sur la germination est expliquée différemment par les auteurs : NIELSEN et BERQUIST ont trouvé que l'intensité respiratoire de graines d'orge augmente proportionnellement avec la concentration de l'acide gibbérélique jusqu'à 10 mg/1 au-delà de cette concentration son action reste constante. HABER et LUIPPOLD pensent que l'activité des gibbérélines sont en relation avec l'élongation cellulaire. Quant à NAYLOR et SIMPSON, ils ont expliqué l'action des gibbérélines par un mécanisme antagoniste de celui d'un inhibiteur. SPICER et DIONNE ont stimulé la germination des graines de *Solanum* avec les gibbérélines, tandis que BLACK et NAYLOR les ont essayé sur les graines d'Avoine.

C. — Etude des Inhibiteurs.

1. — Extraction et Essais biologiques des Inhibiteurs.

a) Extrait des akènes d'*A. trifida*.

Vingt grammes d'akènes sont broyées dans un moulin et la poudre est extraite pendant 24 heures avec 100 ml. d'eau distillée à 3° C. Le résidu est extrait de nouveau avec 100 ml. d'eau distillée pendant 2 heures. Les filtrats sont réunis et concentrés sous pression réduite à 35° C jusqu'à 4 ml. Chaque centimètre cube d'extrait concentré correspond à 5 grammes d'akènes.

b) Essais biologiques.

α) sur la germination des graines non dormantes d'*A. trifida* :

Deux centicubes d'eau distillée sont mélangés à une quantité croissante d'extrait. Le mélange sert à humecter les deux couches de papier filtre qui doublent les boîtes de pétri servant de germoirs. Dix graines d'*A. Trifida* lavées depuis quatre mois et ayant atteint leur pouvoir germinatif maximum sont placées dans chaque boîte de pétri.

β) sur la croissance directe du coléoptile d'Avoine.

Dix sections de coléoptile d'Avoine sont laissées flotter dans 10 cc. d'une solution contenant de 0,25 à 1 ml d'extrait.

Les mesures sont faites au bout de 48 heures à l'obscurité et les valeurs moyennes de la longueur des coléoptiles dans chaque solution est calculée.

c) Résultats :

La germination des graines non dormantes d'*A. trifida* est complètement inhibée par 1 ml. d'extrait aqueux d'akènes et la croissance directe du coléoptile d'Avoine est empêchée par 1/4 ml. du même extrait.

2. — *Détermination des Rfs des Inhibiteurs contenus dans les akènes :*

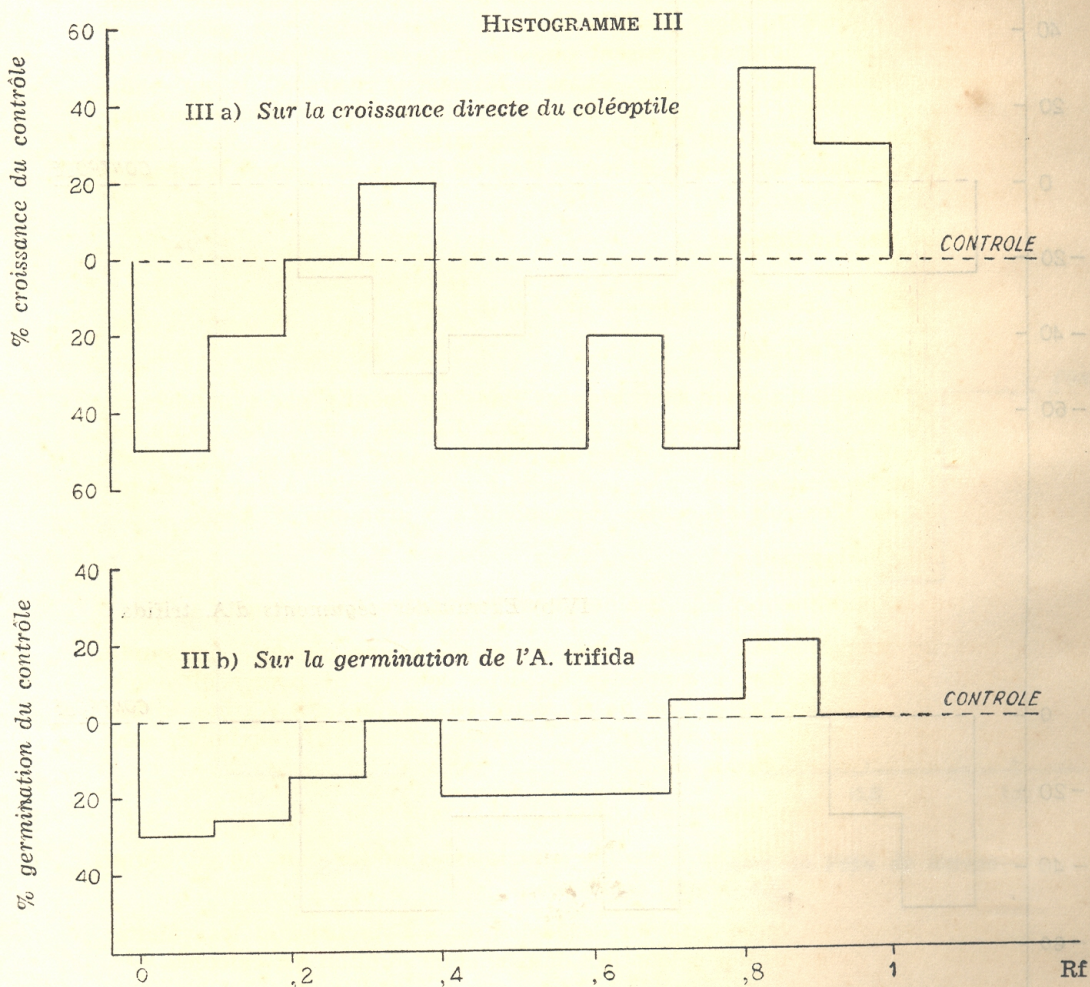
La technique de chromatographie est pareille à celle employée pour la détermination des gibbérellines.

Les chromatogrammes sont divisés en dix bandes qui sont éluées et essayées sur la croissance des coléoptiles d'Avoine et sur la germination des graines non dormantes d'*A. trifida*.

Résultats :

L'histogramme III montre les différentes zones inhibitrices de l'extrait aqueux des akènes d'*A. trifida*. Ces zones sont localisées au Rfs 0,0 — 0,3 et 0,4 et 0,8.

3. — *Localisation des Inhibiteurs dans les graines et dans les téguments de l'akène d'A. trifida.*



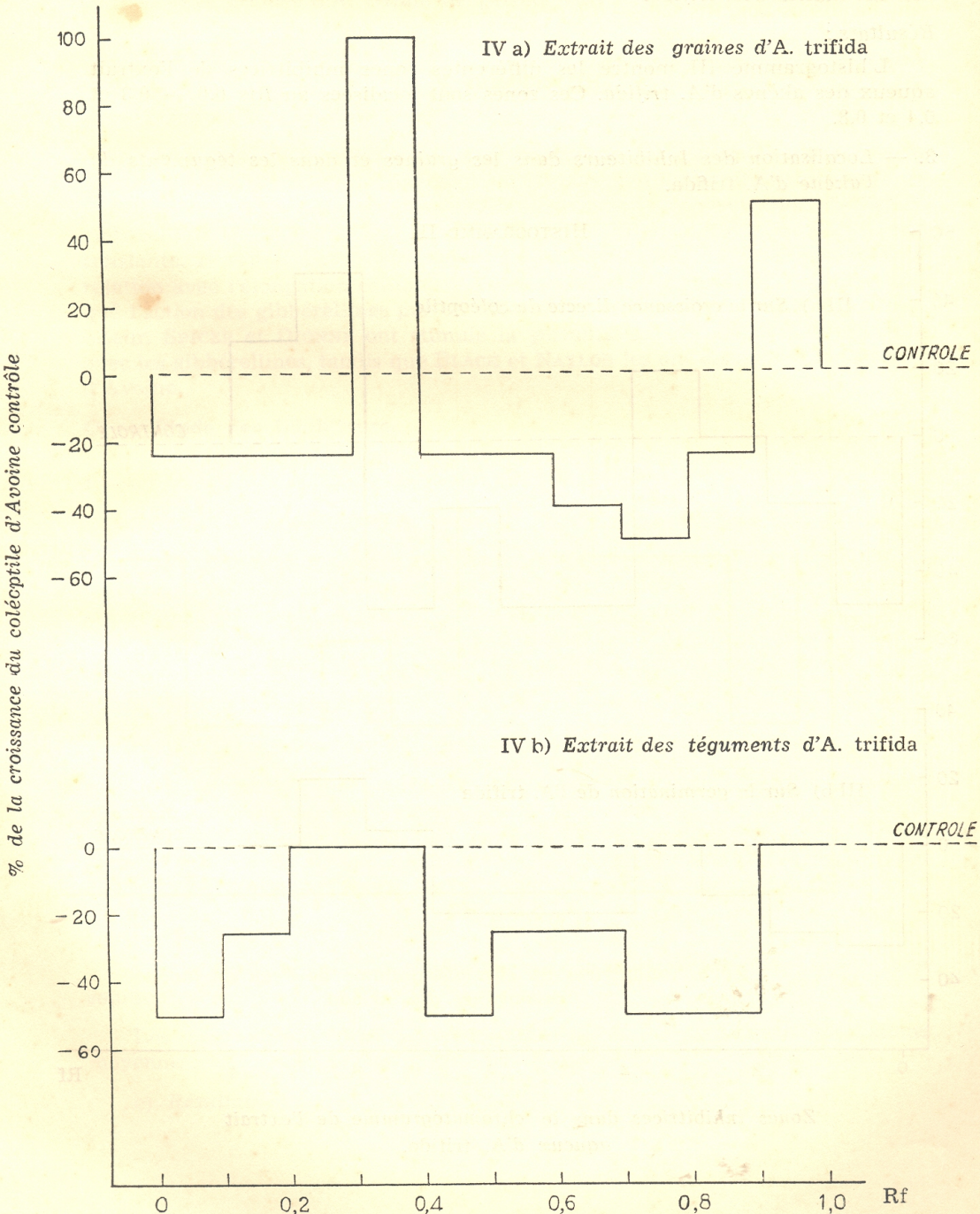
Zones inhibitrices dans le chromatogramme de l'extrait aqueux d'*A. trifida*.

Les extraits aqueux des graines et des téguments sont obtenus séparément de la même façon que celui les akènes entières. Ces extraits sont ensuite chromatographiés et les différentes bandes des chromatogrammes sont utilisées pour la détermination des Rfs des zones inhibitrices comme précédemment.

Résultats :

L'histogramme IV montre que les zones inhibitrices sont localisées aux Rfs 0,0 — 0,2 — et 0,4 — 0,9 dans les téguments et Rfs 0,0 — 0,3 et 0,4 — 0,9 dans les graines.

HISTOGRAMME IV



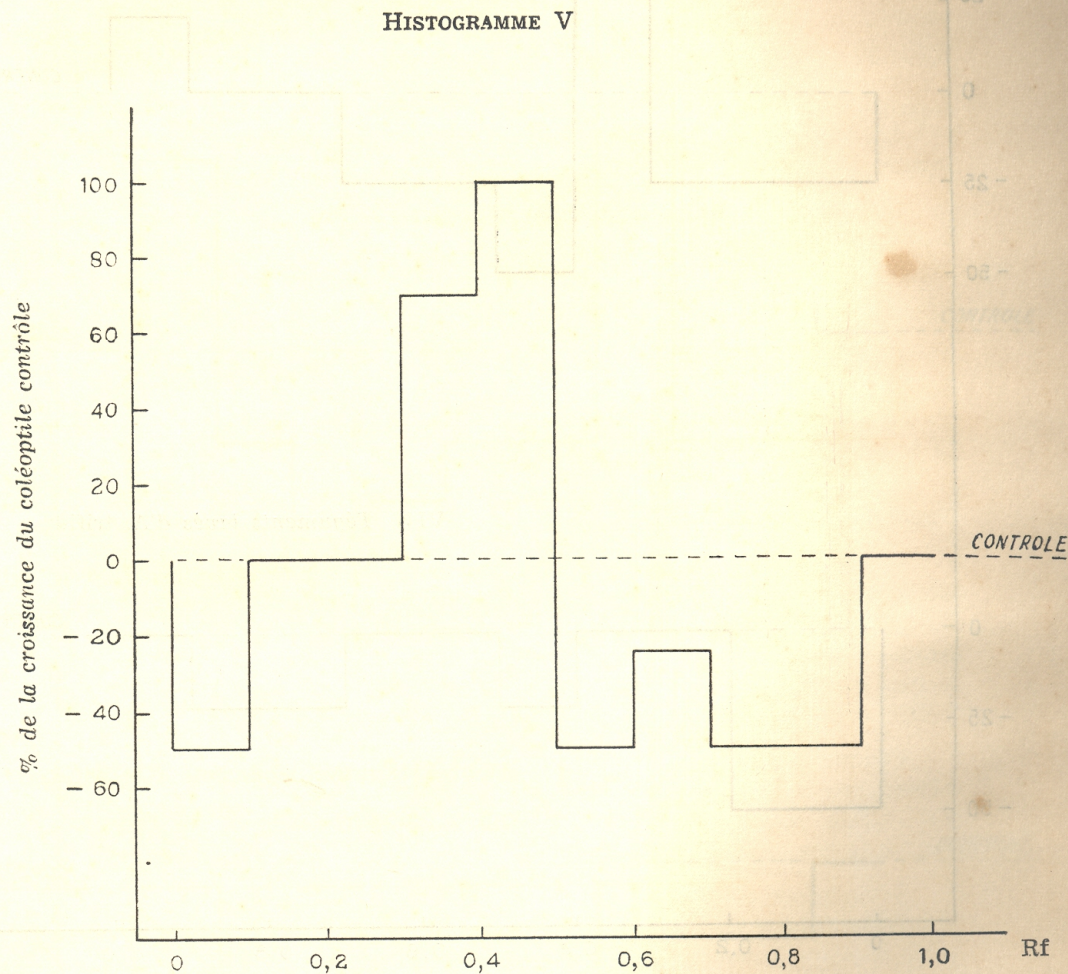
Zones inhibitrices dans les chromatogrammes des graines et téguments d'A. trifida.

4. — Détermination des Rfs des Inhibiteurs contenus dans l'eau de lavage des akènes d'*A. trifida*.

L'eau de lavage des akènes d'*A. trifida* est gardée à 3° C. Deux litres de cette eau est concentrée à 5 ml. qui sont employés pour la détermination des Rfs des Inhibiteurs comme précédemment.

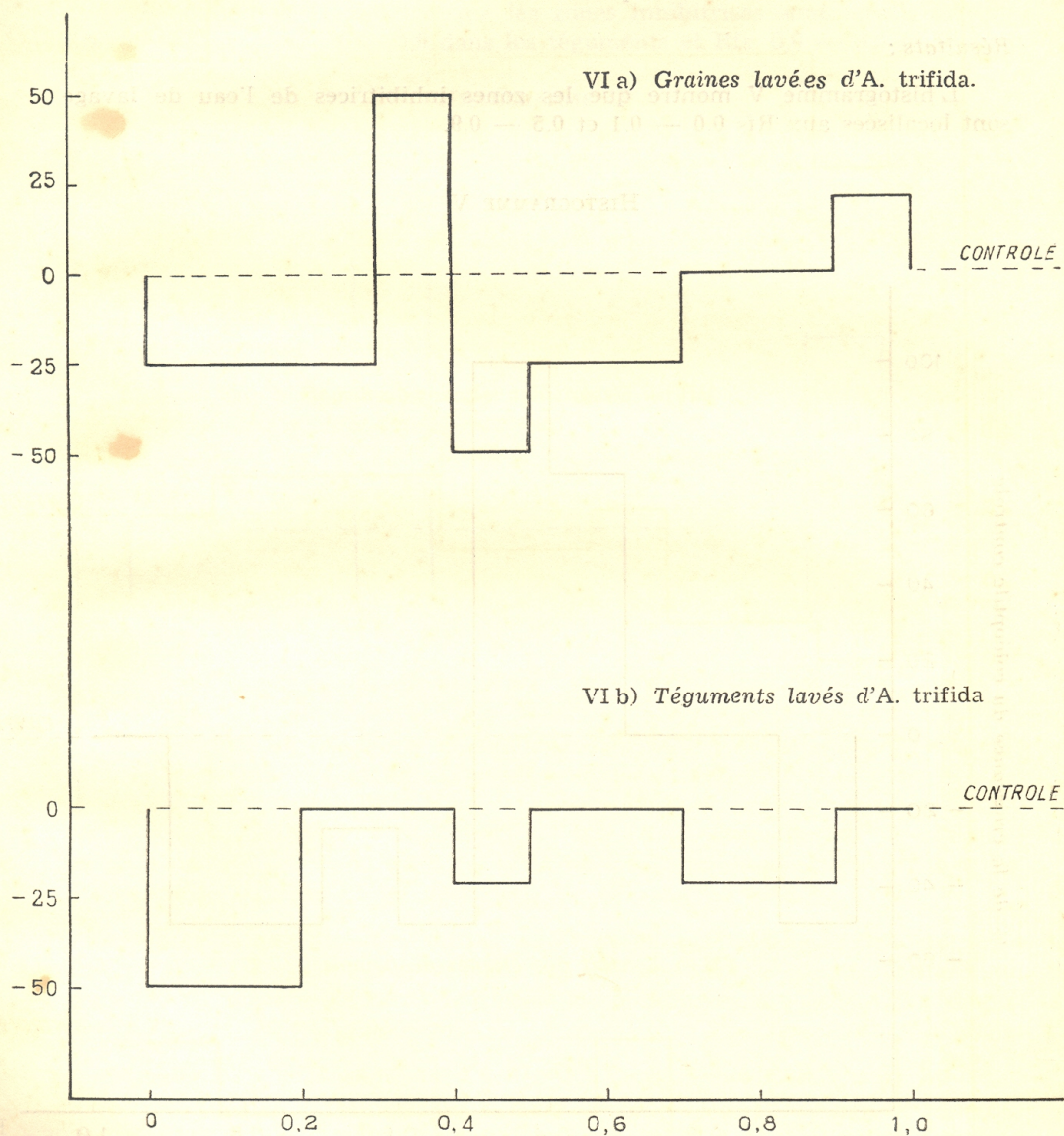
Résultats :

L'histogramme V montre que les zones inhibitrices de l'eau de lavage sont localisées aux Rfs 0,0 — 0,1 et 0,5 — 0,9.



Zones inhibitrices du chromatogramme de l'eau de lavage des akènes d'*A. trifida*.

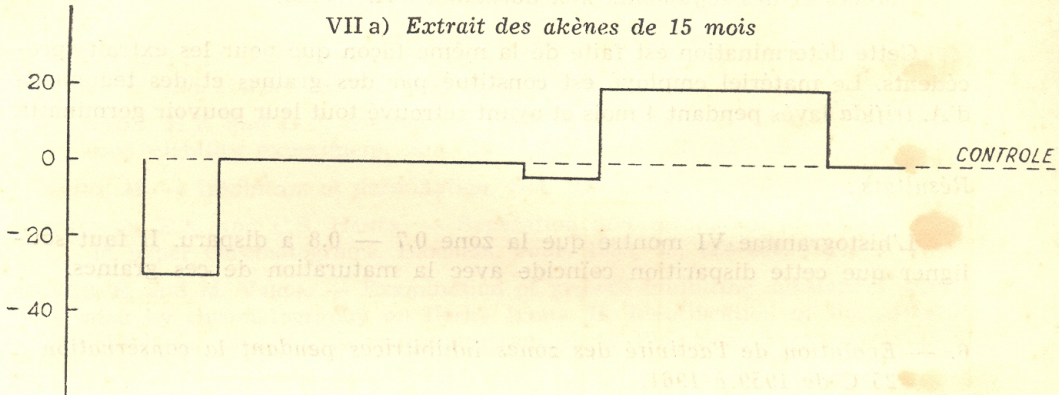
HISTOGRAMME VI



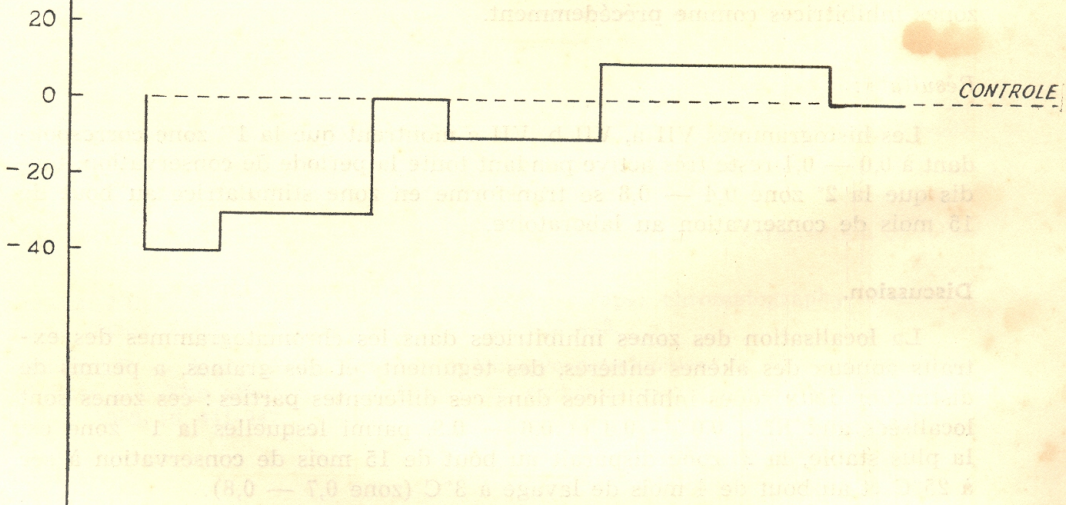
Zones inhibitrices des chromatogrammes des graines
et des téguments lavés d'*A. trifida*.

HISTOGRAMME VII

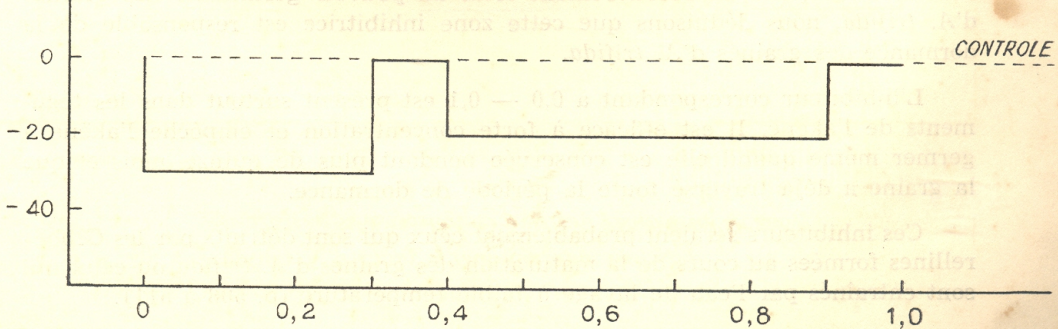
VII a) Extrait des akènes de 15 mois



VII b) Extrait des akènes de 6 mois



VII c) Extrait des akènes de 0 mois



Evolution des zones inhibitrices au cours de la conservation

des akènes d'A. trifida.

5. — Détermination des Rfs des zones inhibitrices dans l'extrait des graines lavées et des téguments non dormants d'*A. trifida*.

Cette détermination est faite de la même façon que pour les extraits précédents. Le matériel employé est constitué par des graines et des téguments d'*A. trifida* lavés pendant 4 mois et ayant retrouvé tout leur pouvoir germinatif.

Résultats :

L'histogramme VI montre que la zone 0,7 — 0,8 a disparu. Il faut souligner que cette disparition coïncide avec la maturation de ces graines.

6. — Evolution de l'activité des zones inhibitrices pendant la conservation à 25°C de 1959 à 1961.

Les extraits aqueux des akènes d'*A. trifida* gardés à la température du laboratoire pendant une période de zéro à 15 mois sont fait.

Ces extraits sont employés pour la détermination des différents Rfs des zones inhibitrices comme précédemment.

Résultats :

Les histogrammes VII a, VII b, VII c montrent que la 1^{re} zone correspondant à 0,0 — 0,1 reste très active pendant toute la période de conservation, tandis que la 2^e zone 0,4 — 0,8 se transforme en zone stimulatrice au bout de 15 mois de conservation au laboratoire.

Discussion.

La localisation des zones inhibitrices dans les chromatogrammes des extraits aqueux des akènes entières, des téguments et des graines, a permis de distinguer deux zones inhibitrices dans ces différentes parties : ces zones sont localisées aux Rfs : 0,0 — 0,3 et 0,6 — 0,8, parmi lesquelles la 1^{re} zone est la plus stable, la 2^e zone disparaît au bout de 15 mois de conservation à sec à 25°C et au bout de 4 mois de lavage à 3°C (zone 0,7 — 0,8).

Comme la disparition de la zone 0,6 — 0,8 dans la graine nue comme dans l'akène correspond au recouvrement total du pouvoir germinatif des graines d'*A. trifida*, nous déduisons que cette zone inhibitrice est responsable de la dormance des graines d'*A. trifida*.

L'inhibiteur correspondant à 0,0 — 0,1 est présent surtout dans les téguments de l'akène. Il est efficace à forte concentration et empêche l'akène à germer même quand elle est conservée pendant plus de quinze mois et que la graine a déjà traversé toute la période de dormance.

Ces inhibiteurs seraient probablement ceux qui sont détruits par les Gibbérellines formées au cours de la maturation des graines d'*A. trifida* ou ceux qui sont entraînés par l'eau de lavage à faible température (p. 508 à 511).

La séparation, l'identification et le mode d'action de ces inhibiteurs feront l'objet d'une publication ultérieure.

BIBLIOGRAPHIE

- BLACK, M. and J.M. NAYLOR. — Prevention of the onset of seed dormancy by gibberellic acid. *Nature* 1959, 184, 468-469.
- DARLINGTON. H.T. and G.P. STEINBAUER. — The eight-year period for Dr. Beal's seed viability experiment. *Am. Jour. Bot.* 1961, 48, 321-325.
- EVENARI, M. — Inhibitors of germination. *Bot. Rev.* 1949, 49, 150.
- ISHENWOOD, F.A. and C.S. HANES. — Separation and estimation of organic acids on paper chromatograms. *Biochem. Jour.* 1953, 55, 824-830.
- KOWES, E. and M. VARGA. — Examination of growth-inhibiting substances separated by chromatography on fleshy fruits. II. Identification of the growth-inhibiting zones on the chromatogram. *Acta Biologica. Szegediensis* 1957, 3, 213-223.
- » — Comparative examination of water and ether soluble substances in dry fruits. *Phyton.* 1959, 20, 93-99.
- LOCKHART, J. — Studies on the organ of production of the natural gibberellin factor in higher plants. *Plant Physiol.* 1957, 32, 204-207.
- NAYLOR, J.M. and F.M. SIMPSON. — Dormancy studies in seed of *Avena fatua* L. A gibberellin-sensitive inhibitory mechanism in the embryo. *Can. Jour. Bot.* 1961, 39 (2), 281-295.
- NIELSEN, N. and G. BERQUIST. — The stimulation of the respiration of seeds with gibberellic acid and its analytical significance. *Physiol. Plant.* 1958, 2, 329-331.
- NITSCH, J.P. — Gibberellins dans l'albumen de Pommier. *Bulletin Société Botanique de France*, 10, 1958, 479-482.
- SPICER, P.B. and L.A. DIONNE. — Use of gibberellin to hasten germination of *Solanum* seed. *Nature* 1961, 181, 327-328.
- STARK, J.B., A.E. GOODBAN and H.S. OWENS. — Paper chromatography of organic acids. *Analytical Chemistry* 1951, 23, 413-415.
- STOKES, P. — A physiological study of embryo development in *Heracleum sphondylium* L. The effect of temperature on embryon development. *Ann. Bot. N.S.* 1952, 16, 441-447.
-