

Méthode d'analyse

d'évaluation de la qualité des semences

Référence : M-GEVES/SP/GER/MO/024

Version : 1

Juillet 2021

Analyse de la faculté germinative de *Lolium multiflorum Lam.*, *Lolium perenne L.*, *Lolium X hybridum Hausskn*

(Ray-Grass d'Italie (y compris le Ray Grass Westerwold), Ray-Grass Anglais, Ray-Grass hybride).

Groupe d'étude et de contrôle des variétés et des semences (GEVES) – Station Nationale d'Essais de Semences (SNES)

Laboratoire National de Référence dans le domaine de la certification des semences et plants

Le présent document est, sous sa forme électronique, mis à la disposition des utilisateurs en tant que méthode d'analyse. Ce document est la propriété du GEVES. Toute reproduction, qu'elle soit totale ou partielle, n'est autorisée qu'à la condition expresse que la source soit citée : GEVES, Méthode d'analyse d'évaluation de la qualité des semences, Analyse de la faculté germinative de *Lolium multiflorum Lam.*, *Lolium perenne L.*, *Lolium X hybridum Hausskn* (Ray-Grass d'Italie (y compris le Ray Grass Westerwold), Ray-Grass Anglais, Ray-Grass hybride) ; M-GEVES/SP/GER/MO/024, 1 ; ©2021

Historique de la méthode

Modification majeure : une modification majeure est une modification qui porte sur le domaine d'application de la méthode, sur un point critique de la méthode et qui peut avoir une influence sur la qualité du résultat dans la mesure où elle modifie les critères de performance de la méthode. Avant de valider une modification majeure, une étape de validation partielle ou totale est nécessaire.

Modification mineure : une modification mineure est une modification qui n'influence pas les critères de performance de la méthode. Il s'agit de modification de type correction mineure, précision, reformulation. Une modification mineure ne nécessite pas de validation.

Tableau récapitulatif

Version	Date	Type de modification	Principales modifications
1	Juillet 2021		

Sommaire

1. Introduction	4
1.1. <i>Validation de la méthode</i>	4
2. Avertissements et précautions de sécurité	5
3. Objet et domaine d'application	6
4. Termes, sigles et définitions	6
5. Principe de la méthode	6
6. Réactifs et consommables	7
6.1. <i>Eau désionisée</i>	7
6.2. <i>KN03</i>	7
6.3. <i>Substrat buvard</i>	7
7. Matériel	7
7.1. <i>Germoir</i>	7
7.2. <i>Chambre de germination avec lumière</i>	7
7.3. <i>Matériel de prélèvement et de comptage des semences</i>	7
8. Echantillons	7
8.1. <i>Taille, conditionnement</i>	7
8.2. <i>Conservation</i>	7
8.3. <i>Critères d'acceptation</i>	7
9. Mode opératoire	8
9.1. <i>Mise en place de l'essai dans un buvard humidifié</i>	8
9.2. <i>Incubation de l'essai</i>	8
9.3. <i>Lecture des résultats</i>	9
10.1. <i>Vérification des résultats, contrôles (homogénéité, Tolérance...)</i>	9
10.2. <i>Calcul des résultats :</i>	9
10.3. <i>Tolérances</i>	10
10.4. <i>Expression des résultats</i>	10
10.5. <i>Erreur de comptage</i>	10
10.6. <i>Conditions de reprise de l'essai de germination</i>	10
11. Devenir des reliquats d'échantillon après analyse	10
12. Annexes	11
12.1. <i>Bibliographie</i>	11
12.2. <i>Crédits (photos)</i>	11

1. Introduction

La faculté germinative est un des critères clés évalué dans le cadre de la certification des lots de semences. Elle a pour objet de donner une indication sur le potentiel de germination d'un lot de semences. La faculté germinative obtenue est comparée aux normes en vigueur pour déterminer si un lot peut être certifié ou non.

1.1. Validation de la méthode

Cette méthode a été mise au point et validée au niveau de l'ISTA (International Seed Testing Association).

2. Avertissements et précautions de sécurité

S'agissant d'une méthode de laboratoire, il est du ressort de l'utilisateur de la présente méthode d'appliquer cette méthode dans le respect des bonnes pratiques de laboratoires. L'utilisateur est responsable de l'application des règles d'hygiène et de sécurité en conformité avec la réglementation en vigueur.

En particulier il est attiré l'attention sur le travail en condition d'exposition à des semences traitées. L'utilisateur de la présente méthode, conscient des risques associés, s'engage à s'assurer du port d'équipements de protection individuelle et/ou d'utilisation d'équipements de protection collective en fonction des risques associés aux produits de traitement appliqués sur les semences.

A l'issue des essais, il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente méthode de s'assurer de l'élimination des déchets dans le respect des obligations légales a minima et en visant à limiter au maximum l'impact de l'activité sur l'environnement.

Dans le cas où la méthode nécessite l'emploi de matériel, l'utilisation de tout matériel doit être faite dans le respect des prescriptions du fabricant.

3. Objet et domaine d'application

Cette méthode permet de déterminer le potentiel de germination d'un lot de semences de l'espèce considérée. Ce potentiel de germination est exprimé en pourcentage de plantules normales.

Cette méthode s'applique pour les espèces : *Lolium multiflorum* Lam., *Lolium perenne* L., *Lolium X hybridum* Hausskn. (Ray-Grass d'Italie (y compris le Ray Grass Westerwold), Ray-Grass Anglais, Ray-Grass hybride)

4. Termes, sigles et définitions

ISTA : règles internationales pour les essais de semences

5. Principe de la méthode

La méthode peut être décrite de la façon suivante :

Echantillon de travail: semences pures

Mise en essai:
Dépôt des semences sur le substrat de germination

Mise en incubation :
Placer les essais en conditions contrôlées (température, lumière, humidité, durée, pré-traitements)

Evaluation des plantules et des semences :
plantules normales, anormales et semences dures, fraîches et mortes

Calcul et expression des résultats:
arrondis et vérification des tolérances

6. Réactifs et consommables

6.1. Eau désionisée

avec un pH compris entre 6 et 7.5 (cf Règles ISTA, Chap. 5.4.4.1).

6.2. KN03

Nitrate de potassium pur à 99%

6.3. Substrat buvard

Il est constitué de fibres de cellulose extraites du bois, du coton, du papier crépé cellulosique ou d'autres matière végétales purifiées. (Cf. Règles ISTA, Chap. 5.4.3.1)

7. Matériel

(Règles ISTA: cf.Chap.5.5 et ISTA Handbook on Seedling Evaluation: section 4 chap.4.1)

7.1. Germeoir

(fond + couvercle) permettant de contenir les essais en buvard papier plat.

7.2. Chambre de germination avec lumière

préalablement caractérisée pour l'homogénéité de sa température dans son espace, et possédant des sondes ou thermomètres permettant un suivi quotidien et régulier de la température (cf. ISTA Handbook on Seedling Evaluation A5.6).

7.3. Matériel de prélèvement et de comptage des semences

(par exemple : plaque en verre scapel/spatule pince et coupelle). Les semences ne doivent pas être sélectionnées lors de l'utilisation du matériel de semis au risque d'avoir une influence sur le résultat de l'analyse (cf. règles ISTA chap. 5.5.2 et ISTA Handbook on Seedling Evaluation Chap.4.1.2.3)

8. Echantillons

8.1. Taille, conditionnement

Echantillon de travail : échantillons de 1250 semences pures

Les échantillons sont conditionnés en sachet en papier.

8.2. Conservation

Les échantillons sont stockés dans un endroit frais et sec (soit autour de 10°C et 50% d'hygrométrie) (cf. Règles ISTA Chap. 2.5.3) avant leur mise en germination.

8.3. Critères d'acceptation

L'échantillon doit contenir un minimum de 400 semences pures

9. Mode opératoire

9.1. Mise en place de l'essai dans un buvard humidifié

- Préparer le buvard plat pour les 4 répétitions de 100 semences de la façon suivante :
- Placer dans chaque germeoir 4 feuilles de papier plat.
- Humidifier le buvard avec d'une solution de nitrate de potassium à 0.2% (KNO₃) (par exemple buvard GE HEALTHCARE ref : 10342594 et réf : 10345573 humidifié à 100% de la Crmax (Capacité de rétention en eau maximale), soit 25 ml¹. (Point de contrôle : Contrôler le buvard pour son absence de toxicité et sa rétention en eau (cf. règles ISTA Chap. 5.4.5, ISTA Handbook on Seedling Evaluation 4.2, A5.3, A5.6).
- Attendre 5 min minimum entre l'humidification du buvard et le semis.
- Réaliser le semis à l'aide d'une plaque en verre scapel/spatule, pince et une coupelle.

9.2. Incubation de l'essai

Levée de la dormance :

- Placer les germeoirs pendant 7 jours dans une chambre de germination.
- La température doit être de 5°C (cf. Règles ISTA Chap. 5.6.2.3) au niveau des semences pendant toute la durée de la levée de dormance.

Germination et croissance :

- Placer les germeoirs dans une chambre de germination.
- La température doit être de 20↔30°C (±2°C) (cf. Règles ISTA Chap. 5.6.2.3) au niveau des semences pendant toute la durée de l'essai.
- Une photopériode de 8h par 24 heures est appliquée pendant toute la durée de l'essai (cf. Règles ISTA Chap. 5.6.2.4)
- La durée de l'essai est de 10 jours avec un comptage intermédiaire à 5 jours.
- Si au bout de cette durée, les plantules ne sont pas assez développées pour permettre une évaluation correcte, l'essai peut être prolongé de 1 à 7 jours supplémentaires. (Cf. Règles ISTA, Chap. 5.6.4).

¹ Les valeurs sont fournies à titre indicatif, elles peuvent varier légèrement selon le lot de substrat.

9.3. Lecture des résultats

Au terme de l'essai, une évaluation des plantules et semences non germées est réalisée selon les règles ISTA et le ISTA Handbook on Seedling Evaluation – *section 12 : Type – D Groupe A.1.2.3.1:*

- Définition du groupe A.2.1.3.1
 - o A : Espèces agricoles ou horticoles
 - o 1 : Monocotylédone
 - o 2 : Germination hypogée
 - o 3 : Pas de développement de la pousse ; l'apex est enfermé dans une gaine (coléoptile).
 - o 1 : Racine principale obligatoire



Fig. 1. Plantule normale de Ray Grass

Pour chaque répétition indiquer : le nombre de plantules normales, de plantules anormales, de semences fraîches et de semences mortes.

10. Résultats

10.1. Vérification des résultats, contrôles (homogénéité, Tolérance...)

- Les résultats obtenus à l'aide des répétitions doivent être rapportés en 4 répétitions de 100 semences
- L'homogénéité des résultats par répétition est vérifiée à l'aide des tables de tolérance (cf. règles ISTA Chapitre 5, Tableau 5B).
Si les résultats des répétitions ne sont pas homogènes, l'essai de germination doit être repris.

10.2. Calcul des résultats :

Le calcul de la moyenne des 4 répétitions est réalisé pour exprimer en pourcentage (%) :

- Le % de plantules normales, le % de plantules anormales, le % de semences fraîches et le % de semences mortes.
- Les pourcentages de chaque catégorie de plantules et de semences sont arrondis en nombres entiers selon une procédure décrite dans les Règles ISTA Chap. 5.8.2.

10.3. Tolérances

- La tolérance entre les essais doit être vérifiée selon les Règles ISTA Chap. 5.8.1. et en se référant aux tableaux suivants :
 - Entre deux essais : Tableau 5C
 - Entre trois essais : Tableau 5D
 - Entre quatre essais : Tableau 5E
- Si l'écart observé entre les résultats des répétitions est supérieur aux tolérances, l'essai de germination doit être repris.

10.4. Expression des résultats

- Le résultat de l'essai est exprimé en % de plantules normales, en % de plantules anormales, en % de semences fraîches et en % de semences mortes.

10.5. Erreur de comptage

- Au cas où le total des % n'est pas strictement égal à 400, si l'erreur est de plus de 5 semences (en plus ou en moins) au cours de l'essai de germination (c'est-à-dire $\pm 1.25\%$ sur un total de 400 semences) l'essai doit être repris (ne pas appliquer cette règle pour 200 semences).

10.6. Conditions de reprise de l'essai de germination

Plusieurs facteurs peuvent générer une reprise de l'essai de germination. Ces facteurs sont les suivants :

- Problème physiologique ou biologique
- Phytotoxicité
- Interaction avec l'état sanitaire
- Incident technique ou erreurs de comptage ± 5 semences
- Homogénéité entre répétitions de l'essai
- Incompatibilité entre essais

11. Devenir des reliquats d'échantillon après analyse

Les échantillons sont stockés au minimum 1 an après la date de l'analyse dans un endroit frais et sec (cf. Règles de l'ISTA Chap. 2.5.3).

12. Annexes

12.1. Bibliographie

Règles de L'ISTA version 2020.

ISTA Handbook on Seedling Evaluation (4^{ième} édition)

12.2. Crédits (photos)

Fig. 1. Plantule normale de Ray-Grass : © GEVES – Mars 2020 Tous droits réservés.