

Méthode d'analyse

d'évaluation de la qualité des semences

Référence : M-GEVES/SP/GER/MO/027

Version : 1

Juillet 2021

Analyse de la faculté germinative de

Trifolium alexandrinum L., *Trifolium fragiferum* L., *Trifolium glanduliferum* Boiss., *Trifolium hirtum* All., *Trifolium hybridum* L., *Trifolium incarnatum* L., *Trifolium isthmocarpum* Brot., *Trifolium michelianum* Savi , *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium resupinatum* L., *Trifolium squarrosus* L., *Trifolium subterraneum* L., *Trifolium vesiculosum* Savi.

(Trèfle d'Alexandrie, Trèfle fraisier, Trèfle glandulaire, Trèfle hérissé, Trèfle hybride, Trèfle incarnat, Trèfle de Jamin, Trèfle de Micheli, Trèfle violet, Trèfle blanc, Trèfle de Perse, Trèfle écailleux/trèfle raboteaux, Trèfle semeur/trèfle souterrain/ trèfle enterreur, Trèfle renflé en vessie/ trèfle en vessie).

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 *Trifolium alexandrinum* L., *Trifolium fragiferum* L., *Trifolium glanduliferum* Boiss., *Trifolium hirtum* All., *Trifolium hybridum* L., *Trifolium incarnatum* L., *Trifolium isthmocarpum* Brot., *Trifolium michelianum* Savi , *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium resupinatum* L., *Trifolium squarrosus* L., *Trifolium subterraneum* L., *Trifolium vesiculosum* Savi. (Trèfle d'Alexandrie, Trèfle fraisier, Trèfle glandulaire, Trèfle hérissé, Trèfle hybride, Trèfle incarnat, Trèfle de Jamin, Trèfle de Micheli, Trèfle violet, Trèfle blanc, Trèfle de Perse, Trèfle écailleux/trèfle raboteaux, Trèfle semeur/trèfle souterrain/ trèfle enterreur, Trèfle renflé en vessie/ trèfle en vessie) ; M-GEVES/SP/GER/MO/027, 1 ; ©2021

Historique de la méthode

M-GEVES/SP/GER/MO/027, version 1

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

12.1. <i>Bibliographie</i>	12
12.2. <i>Crédits (photos)</i>	12

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 : *Trifolium alexandrinum* L., *Trifolium fragiferum* L., *Trifolium glanduliferum* Boiss., *Trifolium hirtum* All., *Trifolium hybridum* L., *Trifolium incarnatum* L., *Trifolium isthmocarpum* Brot., *Trifolium michelianum* Savi , *Trifolium pratense* L., *Trifolium repens* L., *Trifolium resupinatum* L., *Trifolium squarrosum* L., *Trifolium subterraneum* L., *Trifolium vesiculosum* Savi. (Trèfle d'Alexandrie, Trèfle fraisier, Trèfle glandulaire, Trèfle hérissé, Trèfle hybride, Trèfle incarnat, Trèfle de Jamin, Trèfle de Micheli, Trèfle violet, Trèfle blanc, Trèfle de Perse, Trèfle écailleux/trèfle raboteaux, Trèfle semeur/trèfle souterrain/ trèfle enterreur, Trèfle renflé en vessie/ trèfle en vessie).

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. Acide sulfurique

(H₂SO₄) uniquement pour le *Trifolium vesiculosum Savi*

6.3. Substrat buvard

Il est constituée : 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 : tête de comptage par aspiration). 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 feuille de papier plat.
- Humidifier le buvard avec de l'eau (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).
- Réaliser le semis à l'aide de la tête de comptage

9.2. Incubation de l'essai

- Placer les germeoirs dans une chambre de germination.
- La température doit être de 20°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 7 jours, sauf pour le *Trifolium vesiculosum Savi.*, (Trèfle renflé en vessie/ trèfle en vessie.), la durée de l'essai est de 14 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).

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 15 : Type – E Groupe A.2.1.1.1:*

- Définition du groupe A.2.1.1.1
 - o A : Espèces agricoles ou horticoles
 - o 2 : Dicotylédones
 - o 1 : Germination épigée
 - o 1 : Pas d'allongement de l'épicotyle
 - o 1 : Racine principale obligatoire

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



Fig. 1. Plantule normale de Trèfle

Pour chaque répétition indiquer : le nombre de plantules normales, de plantules anormales, de semences dures, 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 dures, 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 dures, 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

±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

Dans le cadre de la certification des semences, un taux maximum de semences dures peut être comptabilisé dans le résultat de faculté germinative. Lorsque ce taux est supérieur à la limite définie et que la faculté germinative est inférieure à la limite de certification (cf. tableau ci-dessous), alors une reprise de l'essai doit être réalisée en utilisant préalablement à la mise en germination, un traitement de levée de la dormance tégumentaire. Ce traitement est réalisé en mettant les semences à tremper dans de l'acide sulfurique concentrée à 99 % pendant 5 minutes. Un rinçage puis un séchage des semences est réalisé avant le semis.

Espèces	Taux maximal de semences dures	Faculté germinative minimale (incluant le taux de semences dures)
<i>Trifolium alexandrinum</i> L., <i>Trifolium fragiferum</i> L.,	20%	80%
<i>Trifolium glanduliferum</i> Boiss.,	0%	70%
<i>Trifolium hirtum</i> All.,	30%	70%
<i>Trifolium hybridum</i> L.,	0%	70%
<i>Trifolium incarnatum</i> L.,	20%	80%
<i>Trifolium isthmocarpum</i> Brot., <i>Trifolium michelianum</i> Savi , <i>Trifolium pratense</i> L.,	20%	75%
<i>Trifolium repens</i> L.,	0%	70%
<i>Trifolium resupinatum</i> L.,	30%	75%
<i>Trifolium squarrosum</i> L.,	20%	80%
<i>Trifolium subterraneum</i> L., <i>Trifolium vesiculosum</i> Savi.	20%	75%
	40%	80%
	0%	70%

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 Trèfles : © GEVES – Mars 2020 Tous droits réservés.