Bioversity International

Manuels pour les banques de gènes No. 8

# Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes

N. Kameswara Rao, Jean Hanson, M. Ehsan Dulloo, Kakoli Ghosh, David Nowell et Michael Larinde

ILRI

FAO

CTA

Manuels pour les banques de gènes No. 8

# Manuel de **manipulation des semences** dans les banques de gènes

**N. Kameswara Rao[1], Jean Hanson[2], M. Ehsan Dulloo[1], Kakoli Ghosh[3], David Nowell[3] and Michael Larinde[3]**

[1] Bioversity International
Via del Tre Denari 472a, 00057 Maccarese, Rome, Italie

[2] Institut international de recherche sur le bétail (ILRI)
P.O. Box 5689, Addis Ababa, Ethiopie

[3] Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)
Via delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italie

**Bioversity International** est un organisme scientifique indépendant à caractère international visant à promouvoir la conservation et le déploiement en champ et dans les forêts des ressources phytogénétiques au profit des générations actuelles et futures. Il est un des 15 centres fonctionnant sous l'égide du Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale (GCRAI), une association de membres des domaines privés et publics qui soutiennent les efforts pour utiliser la science de pointe pour réduire la faim et la pauvreté, améliorer l'alimentation et la santé, et pour protéger l'environnement. Bioversity a son siège social à Maccarese, près de Rome, en Italie, et possède des bureaux régionaux dans plus de 20 pays à travers le monde. Il fonctionne sur la base de quatre programmes : (1) Diversity for Livelihoods (La diversité au service de tous) (2) Understanding and Managing Biodiversity (Mieux connaître et gérer la biodiversité) (3) Commodities for Livelihoods (Les denrées de base pour une vie meilleure) et (4) Global Partnerships (Partenariats internationaux)

Le statut international a été conféré à Bioversity au titre d'un accord d'établissement qui, en janvier 2006, avait été signé par les gouvernements des pays suivants: Algérie, Australie, Belgique, Bénin, Bolivie, Brésil, Burkina Faso, Cameroun, Chili, Chine, Congo, Costa Rica, Côte d'Ivoire, Chypre, Danemark, Egypte, Equateur, Grèce, Guinée, Hongrie, Inde, Indonésie, Iran, Israël, Italie, Jordanie, Kenya, Malaisie, Mali, Maroc, Mauritanie, Norvège, Ouganda, Pakistan, Panama, Pérou, Pologne, Portugal, République Tchèque, République Slovaque, Roumanie, Russie, Sénégal, Soudan, Suisse, Syrie, Tunisie, Turquie, et Ukraine.

Pour mener à bien son programme de recherche, Bioversity reçoit une aide financière de plus de 150 donateurs, incluant des gouvernements, des fondations privées et des organismes internationaux. Pour plus de renseignements sur les donateurs et les activités de recherche, consultez les rapports annuels de Bioversity. Des copies imprimées sont disponibles sur demande à bioversity-publications@cgiar.org ou à partir du site web de Bioversity (www.bioversityinternational.org).

Les désignations géographiques utilisées dans cette publication ainsi que la présentation de matériel ne sont en aucun cas le signe d'une opinion, quelle qu'elle soit, exprimée par Bioversity ou le GCRAI quant au statut légal d'un pays, d'un territoire, d'une ville ou une zone ou l'autorité qui les dirige, ou sur la délimitation de ses frontières géographiques ou administratives. De même, les opinions exprimées sont celles des auteurs et ne reflètent pas nécessairement celles de ces organisations.

La mention d'une marque déposée ne constitue pas le cautionnement du produit et n'est faite qu'à titre d'information

**Citation** : Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D et Larinde M. 2006. Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes. Manuels pour les banques de gènes No. 8. Bioversity International, Rome, Italie.

ISBN 978-92-9043-741-3

Bioversity International
Via dei Tre Denari 472/a
00057 Maccarese
Rome, Italie

© Bioversity International, 2006

# TABLE DES MATIERES


Remerciements vi

Partenaires de cette publication vii

Liste des relecteurs ix

Avant-propos x

Préface xii

1. Introduction 1

2. Acquisition et enregistrement du matériel génétique 5

2.1 Acquisition du matériel génétique 5

2.2 Enregistrement du matériel génétique 14

3. Nettoyage des semences 22

4. Détermination du taux d'humidité des semences et déshydratation 31

4.1 Détermination du taux d'humidité 31

4.2 Déshydratation des semences 40

5. Contrôle de la qualité des semences 57

5.1 Test de la viabilité des semences 57

5.2 Test de l'état sanitaire des semences 87

5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes 92

6. Empaquetage et stockage des semences 97

6.1 Empaquetage des semences 97

6.2 Stockage des semences 102

7. Distribution du matériel génétique 109

8. Contrôle et régénération du matériel génétique 117

8.1 Contrôle du matériel génétique 117

8.2 Régénération du matériel génétique 123

Annexe I: Politiques et cadres internationaux influençant l'accès au matériel génétique et son échange 134

Annexe II: Méthodes sérologiques de détection des pathogens des plantes 137

Annexe III: Glossaire 139

Annexe IV: Equipement spécialisé pour les banques de semences 148

Annexe V: Liste des acronyms 165

## DIAGRAMMES DE FLUX

Diagramme de flux 1.1. Séquence générale des opérations dans une banque de semences 4
Diagramme de flux 2.1. Enregistrement du matériel génétique 16
Diagramme de flux 3.1. Nettoyage des semences 23
Diagramme de flux 4.1. Détermination du taux d'humidité des semences 32
Diagramme de flux 4.2. Déshydratation des semences 41
Diagramme de flux 4.3. Protocole de détermination du comportement au stockage des semences 47
Diagramme de flux 5.1. Test de germination 59
Diagramme de flux 6.1. Empaquetage des semences 98
Diagramme de flux 7.1. Distribution du matériel génétique 110
Diagramme de flux 8.1. Contrôle de la viabilité 119

## TABLEAUX

Tableau 4.1. Méthode de détermination du taux d'humidité pour des espèces cultivées et fourragères importantes 34
Tableau 4.2. Espèces pour lesquelles le broyage est obligatoire 35
Tableau 4.3. Enregistrement et calcul du taux d'humidité des semences 36
Tableau 4.4. Taux d'humidité à l'équilibre (approximatifs) de certaines espèces cultivées communes à 25°C 43
Tableau 5.1. Directives pour tester la germination des plantes cultivées les plus communes 61
Tableau 5.2. Fiche modèle de données pour enregistrer les résultats de germination 78
Tableau 5.3. Concentration, températures et durées de coloration au chlorure de tétrazolium 84
Tableau 6.1. Modèle de tableau pour enregistrer les informations sur l'empaquetage des semences 101
Tableau 6.2. Température de stockage et taux d'humidité suggérés pour les collections actives 104
Tableau 8.1. Intervalle suggéré pour contrôler la germination de collections actives ou de base chez les semences oléagineuses et non oléagineuses 118
Tableau 8.2. Pourcentages seuils de germination pour la régénération des accessions 120
Tableau 8.3. Plan de test séquentiel de germination pour un standard de régénération de 85% lorsque l'on teste la germination de semences par groupes de 40 121

Tableau 8.4. Comportement reproductif et mécanismes de contrôle de la pollinisation pour la régénération de plantes cultivées importantes 132

## FIGURES

Figure 2.1. L'extraction des graines des fruits charnus 10

Figure 4.1. Isotherme de taux d'humidité 44

Figure 4.2. Prédiction du temps de déshydratation 45

Figure 5.1. Test de germination des semences sur le dessus de papiers absorbants dans des boîtes de Petri 69

Figure 5.2. Test de germination des semences par la méthode entre les papiers 71

Figure 5.3. Test de germination des semences dans la sable 72

Figure 5.4. Anomalies chez des plantules de pois 74

Figure 5.5. Anomalies chez des plantules d'arachide 75

Figure 5.6. Anomalies chez des plantules de blé 76

Figure 5.7. Anomalies chez des plantules d'oignon 77

Figure 5.8. Scarification manuelle de l'enveloppe des semences 80

Figure 5.9. Pattern de coloration après un test au tétrazolium chez des semences de dicotylédone 85

Figure 5.10. Pattern de coloration après un test au tétrazolium chez des semences de monocotylédones 86

## ENCADRES

Encadré 2.1. Unité de base pour l'enregistrement 18

Encadré 4.1. Options pour la déshydratation initiale 50

Encadré 5.1. Humidification des semences sèches 60

Encadré 5.2. Les plantules avec les défauts suivants sont classées comme anormales 73

# REMERCIEMENTS

Nous sommes particulièrement reconnaissants envers T. van Hintum, L. de Groot, L. Boukema, A. Borner, S. Linington, C. N. Nkhoma, L. M. Engle, N. C. Altoveros, M. Mackey, A. W. Ebert, Xiaorong Hu, M. Wetzel, V. Mahalakshmi, H. Kamau et W. Marandu pour leur lecture critique de la première version du manuscrit. Nous remercions Teodardo Calles pour son aide pour la construction des diagrammes. Nous remercions également le Centre technique de coopération agricole et rurale ACP-UE (CTA), Pays Bas, pour le soutien financier apporté à la préparation de ce manuel. Des remerciements sont également dus au Dr Tran Hong, de l'Université de Reading, pour son avis d'expert sur certains des points techniques couverts dans ce guide. Nous souhaitons également remercier tout le personnel de Bioversity International, et en particulier Annie Huie, qui a aidé à la préparation de ce manuel ainsi que le Dr Florent Engelmann, pour la traduction de ce guide en français. Nous remercions aussi Nicolas Muema pour les illustrations et les dessins. Nous sommes également reconnaissants envers Elizabeth Goldberg, responsable de l'Unité de recherche et de soutien pour le développement des capacités de Bioversity International, pour nous avoir guidés dans le développement de ce manuel et de sa version d'auto-apprentissage. Nous remercions également Paul Neate et son équipe, particulièrement Patrizia Tazza et Frances Ferraiuolo, pour la conception et le style de cette publication.

# PARTENAIRES DE CETTE PUBLICATION

**Bioversity International** est un organisme scientifique indépendant à caractère international visant à promouvoir la conservation et le déploiement en champ et dans les forêts des ressources phytogénétiques au profit des générations actuelles et futures. Il est un des 15 centres fonctionnant sous l'égide du Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale (GCRAI), une association de membres des domaines privés et publics qui soutiennent les efforts pour utiliser la science de pointe pour réduire la faim et la pauvreté, améliorer l'alimentation et la santé, et pour protéger l'environnement. Bioversity a son siège social à Maccarese, près de Rome, en Italie, et possède des bureaux régionaux dans plus de 20 pays à travers le monde. Il fonctionne sur la base de quatre programmes : (1) Diversity for Livelihoods (La diversité au service de tous) (2) Understanding and Managing Biodiversity (Mieux connaître et gérer la biodiversité) (3) Commodities for Livelihoods (Les denrées de base pour une vie meilleure) et (4) Global Partnerships (Partenariats internationaux)

**L'Institut International de Recherche sur le Bétail (ILRI)** rassemble les domaines de la recherche sur le bétail et la réduction de la pauvreté, s'appuyant sur des ressources scientifiques d'excellence et sur du personnel mieux formé pour aboutir à la réduction de la pauvreté et à un développement durable. L'ILRI est un institut de recherche à but non lucratif dont le siège est basé à Nairobi au Kenya, et qui travaille en Afrique, en Asie, en Amérique Latine et dans les Caraïbes. L'ILRI a également des bureaux en Afrique Occidentale, Orientale et Afrique du Sud ainsi qu'en Asie du Sud et du Sud-est, en Chine et en Amérique Centrale. L'ILRI est un des 15 centres fonctionnant sous l'égide du Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale (GCRAI). Sa stratégie se concentre sur trois axes : (1) sécuriser les biens des plus pauvres; (2) améliorer la productivité de leur système d'élevage et (3) augmenter les perspectives face à un marché en perpétuelle évolution. Les programmes de recherche de l'ILRI sont orientés vers 4 domaines : identification des diverses possibilités en matière de recherche et développement ; amélioration des perspectives de commercialisation ; utilisation des biotechnologies pour assurer la qualité du cheptel ; et les personnes, le bétail et l'environnement.

**L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture** joue un rôle de chef de file dans les efforts internationaux de lutte contre la faim. La FAO, qui est au service à la fois des pays développés et des pays en développement, est une tribune neutre

au sein de laquelle tous les pays se réunissent sur un pied d'égalité pour négocier des accords et débattre de politiques. La FAO est également une source de savoir et d'informations. Elle aide les pays en développement et les pays en transition à moderniser et à améliorer les pratiques agricoles, forestières et halieutiques, et à garantir une bonne nutrition pour tous. Depuis sa création en 1945, elle a consacré une attention particulière au développement des zones rurales, où vivent 70 pour cent des populations pauvres et affamées de la planète. Les quatre grands domaines d'activité de la FAO : mettre l'information à la portée de tous; partager l'expertise en matière de politiques; servir de lieu de rencontre pour les Etats; porter les connaissances sur le terrain.

**Le Centre technique de coopération agricole et rurale (CTA)** a été créé en 1983 dans le cadre de la Convention de Lomé entre les États du Groupe ACP (Afrique, Caraïbes, Pacifique) et les pays membres de l'Union européenne. Depuis 2000, le CTA exerce ses activités dans le cadre de l'Accord de Cotonou ACP-CE.

Le CTA a pour mission de développer et de fournir des services qui améliorent l'accès des pays ACP à l'information pour le développement agricole et rural, et de renforcer les capacités de ces pays à produire, acquérir, échanger et exploiter l'information dans ce domaine. Les programmes du CTA sont conçus pour : fournir un large éventail de produits et services d'information et mieux faire connaître les sources d'information pertinentes ; encourager l'utilisation combinée de canaux de communication adéquats et intensifier les contacts et les échanges d'information, entre les acteurs ACP en particulier ; renforcer la capacité ACP à produire et à gérer l'information agricole et à mettre en œuvre des stratégies de GIC, notamment en rapport avec la science et la technologie. Le travail du CTA tient compte de l'évolution des méthodologies et des questions transversales telles que le genre et le capital social.

# LISTE DES RELECTEURS

T. van Hintum, L. Groot et L. Boukema
Centre for Genetic Resources (CGN)
PO Box 16, 6700 AA
Wageningen
Pays Bas

A. Borner
Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
Corrensstraße 3
D-06466 Gatersleben
Allemagne

S. Linington
Millennium Seed Bank Project
Wakehurst Place
Ardingly
Haywards Heath
West Sussex RH17 6TN
Royaume Uni

C.N. Nkhoma
SADC Plant Genetic Resources Centre (SPGRC)
Private Bag CH6
Lusaka
Zambie

L.M. Engle
Geneticist and Head
Genetic Resources and Seed Unit
AVRDC – The World Vegetable Center
60 Yi-Ming Liao 74151
Shanhua, Tainan 741
Taiwan

N.C. Altoveros
Deputy Director and Researcher
Institute of Plant Breeding
University of the Philippines
Los Baños
College 4031, Laguna
Philippines

M. Mackey
Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR)
GPO Box 1571
Canberra ACT 2601
Australie

A.W. Ebert
Coordinator
Plant Genetic Resources and Biotechnology
CATIE
7170 Turrialba
Costa Rica

Xiaorong Hu
ICGR, CAAS
12 Zhong Guan Cun South Street,
Beijing, 100081
Chine

# AVANT-PROPOS

Les banques de gènes sont les entrepôts des ressources phytogénétiques, qui fournissent le matériel brut pour l'amélioration des plantes cultivées. Elles jouent un rôle clé en contribuant au développement durable de l'agriculture, en aidant à augmenter la production alimentaire et en surmontant ainsi la faim et la pauvreté. La résistance inhérente aux ravageurs et maladies peut être introduite dans les plantes cultivées, réduisant la nécessité d'utiliser des produits chimiques qui peuvent avoir des effets néfastes sur les agriculteurs et l'environnement. Les semences conservées dans les banques de gènes sont une ressource vitale et irremplaçable, un héritage qui doit être conservé pour offrir des options futures pour l'agriculture dans un monde confronté au changement climatique et à d'autres défis imprévus. La conservation durable des ressources génétiques dépend des actions effectives des personnels des banques de gènes, qui jouent un rôle critique pour s'assurer que le matériel génétique est conservé d'une manière efficace et efficiente. Ils doivent appliquer des procédures correctes pour manipuler les semences, afin d'assurer leur survie et leur disponibilité pour les générations présentes et futures.

Dans le passé, le Manuel pratique pour la manipulation des semences dans les banques de gènes (Hanson, 1985), publié par le Bureau international pour les ressources phytogénétiques (IBPGR), le précurseur de l'Institut international des ressources phytogénétiques (IPGRI) (maintenant Bioversity international), a aidé les curateurs des banques de gènes et les techniciens à conserver les semences. Les recherches conduites au cours des dernières décades ont produit des avancées dans nos connaissances de la physiologie des semences et de leur comportement au stockage. La Convention sur la diversité biologique (CDB) en 1992, le Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (PGRFA) et les accords qui y sont liés ont changé le cadre global de la propriété du matériel génétique et du partage des avantages. Le développement des organismes génétiquement modifiés (OGM) et les controverses associées ont des implications importantes sur la manière dont les banques de gènes gèrent leur matériel génétique, notamment pour empêcher l'introgression non intentionnelle de gènes exotiques, incluant les transgènes. Toutes ces nouvelles opportunités et ces nouveaux défis rendaient nécessaire une mise à jour du manuel pour les banques de gènes publié en 1985. Ce manuel aborde ces récents changements et a pour but de s'assurer que les manipulations dans les banques de gènes remplissent les exigences d'aujourd'hui. Le nouveau manuel

est complété par un module interactif d'auto-apprentissage, qui se trouve sur le CD-Rom accompagnant cet ouvrage. Le manuel et le module d'auto-apprentissage ont pour but d'aider à relever les défis associés au manque et aux changements fréquents de personnel qualifié dans les banques de gènes, particulièrement dans les pays en développement.

Le manuel et le module d'auto-apprentissage qui l'accompagne fournissent des directives détaillées sur les procédures et des leçons à l'intention des personnels qui n'ont pas l'occasion de suivre des cours sur la conservation des semences et la gestion des banques de gènes. En utilisant le manuel et son module, les personnels des banques de gènes peuvent apprendre eux-mêmes les différentes tâches à accomplir dans une banque de gènes et avoir également une référence rapide sur les procédures essentielles des banques de gènes. Avec cette publication, nous espérons contribuer à assurer que les personnels des banques de gènes dans le monde entier maintiendront avec des standards élevés de survie et de qualité le matériel génétique dont ils ont la charge.

**Laura Snook**
*Directrice du Programme*
*Mieux connaître et gérer la biodiversité*
*Bioversity International*

# PREFACE

Des procédures adéquates de manipulation des semences dans les banques de gènes sont fondamentales pour une conservation efficace à long terme et à coût réduit des ressources phytogénétiques. Elles garantissent que les graines stockées sont de la plus haute qualité possible et qu'elles atteignent une viabilité maximale. L'objectif des banques de gènes est de maintenir des accessions ayant une viabilité élevée pendant de longues périodes. Les avancées réalisées dans nos connaissances de la biologie des semences au cours des dernières décades ont conduit à une compréhension améliorée de la physiologie des semences et du comportement des semences au stockage, ce qui fait des graines le moyen de conservation à long terme le plus facile et le plus pratique. Ceci a conduit au développement de techniques pour la manipulation adéquate des semences et pour leur préparation au stockage dans les banques de gènes.

Dans les années 80, le Bureau international pour les ressources phytogénétiques (IBPGR), le précurseur de l'Institut international des ressources phytogénétiques (IPGRI) (maintenant Bioversity International) a commandé une série de manuels pour les banques de gènes incluant le Manuel pratique pour la manipulation des semences dans les banques de gènes N°1 par Jean Hanson (1985), pour aider les curateurs de banques de gènes et les techniciens en conservation des semences. Cette série épuisée est toujours une référence standard pour le travail dans les banques de gènes et elle reste l'une des rares sources d'informations pratiques pour les curateurs de banques de gènes et pour les techniciens. Au cours des dernières années, très peu d'ouvrages ont été publiés sur ce sujet. Les quelques excellentes publications sur ce sujet sont souvent trop complexes pour pouvoir être utilisées par la moyenne des techniciens, particulièrement dans les pays en développement. Ce manuel est une mise à jour du manuel pratique précédent à l'attention des nouveaux personnels des banques de gènes qui n'ont pas reçu de formation formelle. Il bénéficie des avancées réalisées dans la technologie des semences, dans les techniques de stockage et de gestion des semences au cours des deux dernières décades ; la technologie moderne de communication est utilisée pour le rendre plus largement accessible.

Le besoin pour ce produit a été souligné lors d'une récente évaluation des besoins en formation et capacité pour les programmes nationaux, réalisée par Bioversity et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Comme cela a été exprimé par nos partenaires au cours de diverses réunions et ateliers, le manque

de personnel formé est une contrainte majeure pour conserver le matériel génétique avec compétence et efficacité. Dans les pays en développement, les personnels employés par les banques de gènes pour les opérations de routine n'ont pas les connaissances de base en physiologie des semences et sur les bonnes pratiques de gestion des banques de gènes; les changements fréquents de personnel aggravent également le problème. Ce manuel pratique et simple aidera le personnel des banques de gènes dans leur travail de tous les jours.

Cette publication s'intéresse au stockage des seules semences orthodoxes — c'est-à-dire les semences qui peuvent être déshydratées jusqu'à un taux d'humidité bas et être maintenues à des températures proches de 0°C dans les banques de gènes. Les activités et les procédures majeures du fonctionnement d'une banque de gènes sont généralement les mêmes entre banques de gènes, bien qu'elles puissent varier dans leur contenu et leur envergure.

Depuis la première édition du manuel pratique en 1985, plusieurs nouveaux développements ont eu lieu qui justifient une révision des procédures dans les banques de gènes. La prise d'effet de la Convention sur la diversité biologique (CDB) en 1992 et le Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (PGRFA), en 2004, ont changé la perception de la propriété du matériel génétique et du partage des bénéfices dans le monde. Ces accords fournissent de nouveaux cadres de conduite pour l'acquisition, la conservation et l'utilisation de la biodiversité, et influencent la manière dont les banques de gènes effectuent leur travail. Dans la CDB et le Traité international sur les PGRFA, il est reconnu que : la biodiversité est le droit souverain des nations ; la collecte de matériel génétique doit être effectuée avec consentement préalable en connaissance de cause; l'acquisition de matériel génétique est sujette à des termes agréés mutuellement et des accords de transfert multilatéraux ou bilatéraux.

De plus, le Fonds fiduciaire mondial pour la diversité des cultures (Fonds fiduciaire) a été établi pour soutenir le développement et le financement de la conservation de la diversité des plantes cultivées au niveau mondial. Le Fonds fiduciaire aide à conserver les collections qui ont une importance critique pour la sécurité alimentaire et le développement durable. Afin de recevoir le soutien du Fonds fiduciaire, les banques de gènes doivent satisfaire à un nombre de critères d'éligibilité, dont l'un est que les récipiendaires ont les ressources humaines et les systèmes de gestion nécessaires pour conserver les ressources phytogénétiques et conformes aux standards scientifiques et techniques de gestion convenus. Ceci requiert des directives pour aider les banques de gènes à maintenir des standards de gestion élevés.

Un développement nouveau et controversé qui devrait affecter la gestion du matériel génétique est la manipulation d'organismes génétiquement modifiés (OGM). On attend maintenant des banques de gènes qu'elles prennent des mesures proactives pour empêcher l'introgression non intentionnelle de gènes étrangers, incluant des transgènes, qui ne sont pas déjà présents dans les échantillons qu'elles conservent. Pour cette raison, le Genetic Resources Policy Committee (GRPC) du Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale (GCRAI) a développé des principes directeurs qui traitent des risques d'introduction de transgènes dans les collections, particulièrement aux points critiques des procédures employées dans les banques de gènes. Ces principes et les changements dans les protocoles requis pour les mettre en œuvre sont développés dans cette nouvelle édition.

La publication de ce manuel est une initiative commune de Bioversity International, de l'Institut international de recherche sur le bétail (ILRI) et de la FAO, financée en partie par le Centre technique de coopération agricole et rurale ACP-UE (CTA). Ce manuel est destiné au personnel des banques de gènes, particulièrement aux techniciens qui manipulent des semences orthodoxes ; il essaie d'expliquer simplement les procédures à mettre en œuvre pour la gestion quotidienne de la manipulation des semences dans les banques de gènes. Afin d'augmenter la valeur de ce manuel pour la formation et le développement des capacités, les auteurs l'ont adapté pour créer un module interactif d'auto-apprentissage, qui sera publié par Bioversity International avec le soutien du CTA, comme un outil supplémentaire sur le Web et sur CD-Rom.

Il est important de noter que ce manuel se concentre seulement sur les procédures de manipulation des semences et qu'il ne couvre pas en détails les procédures de documentation, de collecte ou de caractérisation ; ces sujets sont bien traités dans d'autres publications. Les lecteurs sont invités à consulter la littérature pour obtenir une meilleure compréhension de ces importantes activités des banques de gènes.

**Kameswara Rao**
**Jean Hanson**
**Ehsan Dulloo**
**Kakoli Ghosh**
**David Nowell**
**Michael Larinde**

1. Introduction


1. **Introduction**
2. **Acquisition et enregistrement du matériel génétique**
   - 2.1 Acquisition du matériel génétique
   - 2.2 Enregistrement du matériel génétique
3. **Nettoyage des semences**
4. **Détermination du taux d'humidité des semences et déshydratation**
   - 4.1 Détermination du taux d'humidité
   - 4.2 Déshydratation des semences
5. **Contrôle de la qualité des semences**
   - 5.1 Test de la viabilité des semences
   - 5.2 Test de l'état sanitaire des semences
   - 5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes
6. **Empaquetage et stockage des semences**
   - 6.1 Empaquetage des semences
   - 6.2 Stockage des semences
7. **Distribution du matériel génétique**
8. **Contrôle et régénération du matériel génétique**
   - 8.1 Contrôle du matériel génétique
   - 8.2 Régénération du matériel génétique


# 1. INTRODUCTION

Pour les ressources phytogénétiques, le comportement physiologique au stockage et la longévité inhérente des semences de chaque espèce dictent le mode de conservation à utiliser. Le stockage des semences est la méthode préférée pour 90% des six millions d'accessions conservées dans les collections *ex situ* dans le monde entier, parce qu'il est pratique et économique. C'est la principale méthode de conservation pour les espèces qui produisent des semences orthodoxes, qui supportent la dessiccation jusqu'à des taux d'humidité réduits et le stockage à très basse température. La plupart des espèces arables et fourragères, ainsi que de nombreuses espèces ligneuses, produisent des semences qui appartiennent à cette catégorie. Les techniques pour conserver les semences orthodoxes ont été améliorées pendant plusieurs décades. Elles consistent à déshydrater les semences jusqu'à des taux d'humidité bas (3–7% du poids frais, selon l'espèce), à les stocker dans les conteneurs scellés hermétiquement à basse température, de préférence -18°C ou en dessous (FAO/IPGRI, 1994).

Un certain nombre d'espèces ligneuses tropicales et subtropicales produisent des semences qui ne survivent pas à la dessiccation et qui ne peuvent pas tolérer les basses températures et qui ne sont donc pas faciles à stocker; ces espèces sont connues sous le terme d'espèces récalcitrantes. Des techniques existent pour stocker certaines espèces récalcitrantes, mais ces semences ont généralement une viabilité courte et chaque espèce requiert sa propre méthode de stockage. Une troisième catégorie d'espèces qui ont un comportement intermédiaire a également été identifiée. Ces semences tolèrent des combinaisons de dessiccation et de basses températures. Il y a en fait un gradient des semences orthodoxes aux semences récalcitrantes, sans limites bien définies entre les catégories. Bien que des recherches aient été conduites pour surmonter les problèmes associés à la conservation des semences, peu de progrès ont été réalisés au-delà du stockage à court terme des semences non-orthodoxes.

Cette publication s'intéresse au stockage des semences orthodoxes dans les banques de gènes. Les opérations de base d'une banque de semences incluent l'assemblage, le traitement, la conservation, la régénération et la distribution du matériel génétique. Les activités et procédures majeures pour le fonctionnement d'une banque de gènes sont généralement les mêmes dans toutes les banques de gènes, bien qu'elles puissent varier sensiblement. Les banques de semences peuvent être très spécialisées ; par exemple, la banque internationale du riz à Los Baños, Philippines, conserve seulement le riz et ses espèces sauvages apparentées. Le maintien de la viabilité et de l'intégrité génétique des semences restent les pierres angulaires de la gestion d'une banque de gènes. La qualité et la durabilité de toute conservation de matériel génétique dépend de la façon dont les semences sont traitées et conservées. Des procédures de manipulation des semences inappropriées conduisent à l'accélération de la détérioration, ce qui rend la conservation plus coûteuse.

Le fonctionnement d'une banque de gènes implique une série d'activités complexes et interdépendantes (voir Diagramme de 1.1). L'assemblage de matériel génétique au moyen de la collecte dans des zones de diversité génétique connue ou de donations d'autres centres est la première étape vers la conservation *ex situ* de la diversité des plantes cultivées. Après leur réception à la banque de gènes, les échantillons de semences sont enregistrés et ajoutés à la collection, à condition qu'ils satisfassent aux standards requis pour la qualité des semences, leur quantité et les informations qui les accompagnent. La procédure pour intégrer une accession dans une banque de gènes comprend le nettoyage, la détermination du taux d'humidité, la déshydratation, le test de la viabilité et l'empaquetage. Les accessions de matériel génétique doivent être maintenues avec une proportion élevée de semences viables; ceci implique le stockage dans des conditions appropriées, la vérification périodique de la viabilité des semences et leur régénération quand la situation le requiert. La régénération doit être effectuée dans des conditions optimales pour maintenir l'intégrité génétique et maximiser la longévité. Afin de minimiser la dérive génétique, des nombres suffisants de plantes doivent être cultivés et les prélèvements réalisés de manière identique. L'intégrité génétique des espèces à pollinisation croisée doit également être maintenue par pollinisation contrôlée ou isolement. Les semences doivent être récoltées après qu'elles aient atteint le point de maturité physiologique et conditionnées ou "traitées" en conditions optimales pour assurer une viabilité élevée et leur disponibilité pour le stockage. De bonnes conditions climatiques pendant les périodes de post-maturation pré-récolte sont également vitales pour assurer la qualité des semences au moment de leur récolte : un temps sec accélère la déshydratation des semences sur

la plante jusqu'à une teneur en eau qui est favorable à la manipulation, alors qu'un temps humide (avec une humidité relative élevée) retarde la déshydratation des semences sur la plante, ce qui conduit à une détérioration des semences avant même la récolte.

La plupart des banques de gènes ont le mandat de distribuer le matériel génétique aux utilisateurs. Les accessions de matériel génétique sont généralement distribuées en utilisant des accords de transfert de matériel (MTA) qui définissent les termes et les conditions de leur utilisation, et les dispositions concernant le partage des avantages provenant du matériel génétique. Lors de la première réunion de l'organe directeur du Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture, en juin 2006, un accord standard de transfert de matériel (SMTA) a été formalisé ; le SMTA offre un contrat uniforme pour l'utilisation dans tous les échanges de matériel génétique des espèces incluses dans l'Annexe I du Traité. Il inclut des termes spécifiques qui gouvernent l'accès et le partage des avantages, ce qui facilite les échanges de matériel génétique dans le monde entier.

Le travail sur les ressources génétiques inclut la gestion de grandes quantités d'informations, qui nécessitent des systèmes de gestion de la documentation et de gestion des informations. La gestion des informations n'est pas couverte dans ce manuel, mais le lecteur doit consulter le Guide de documentation des ressources génétiques produit par Painting *et al*. (1993).

La gestion des banques de gènes requiert des prises de décisions créatives et adaptées. Au vu de l'augmentation de la pression subie par les banques de gènes pour améliorer leur activité et leur efficacité en termes de coûts, il est nécessaire de développer des stratégies cohérentes de gestion. Des éléments importants de la gestion, à la fois au niveau de la banque de gènes et de la collection, sont analysés et les options pour une gestion plus active et efficace sont discutées dans une publication récente d'Engels and Visser (2003).

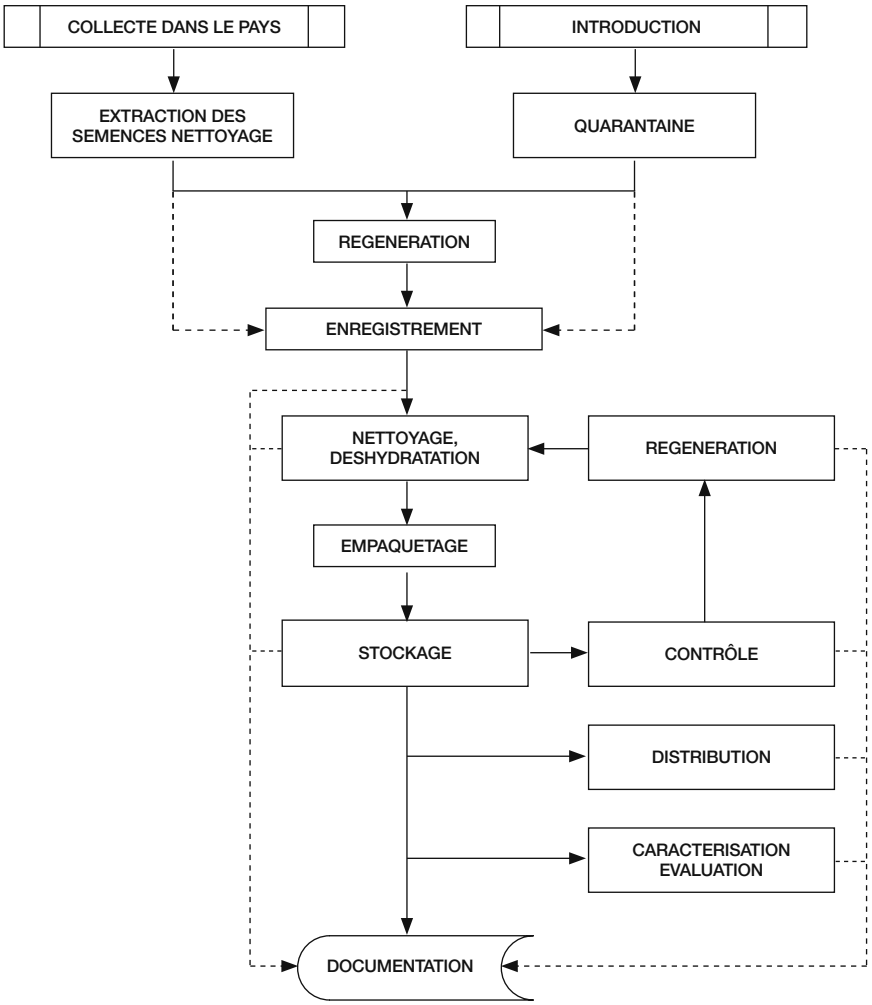
### Lectures complémentaires

Engels, J.M. et Visser, L. (eds.). 2003. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbook for Genebanks No. 6. IPGRI, Rome, Italie.

FAO/IPGRI. 1994. Genebank standards. FAO and IPGRI, Rome, Italie.

Painting K.A., Perry, M.C., Denning, R.A. et Ayad, W.G. 1993. Guidebook for genetic resources documentation: A self-teaching approach to the understanding, analysis and development of genetic resources documentation. IBPGR, Rome, Italie.

**Diagramme de flux 1.1.** Séquence générale des opérations dans une banque de semences.



1. Introduction
2. **Acquisition et enregistrement du matériel génétique**
   2.1 Acquisition du matériel génétique
   2.2 Enregistrement du matériel génétique
3. Nettoyage des semences
4. Détermination du taux d'humidité des semences et déshydratation
   4.1 Détermination du taux d'humidité
   4.2 Déshydratation des semences
5. Contrôle de la qualité des semences
   5.1 Test de la viabilité des semences
   5.2 Test de l'état sanitaire des semences
   5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes
6. Empaquetage et stockage des semences
   6.1 Empaquetage des semences
   6.2 Stockage des semences
7. Distribution du matériel génétique
8. Contrôle et régénération du matériel génétique
   8.1 Contrôle du matériel génétique
   8.2 Régénération du matériel génétique

# 2. ACQUISITION ET ENREGISTREMENT DU MATERIEL GENETIQUE

## 2.1 Acquisition du matériel génétique

### Qu'est-ce que l'acquisition de matériel génétique ?

L'acquisition de matériel génétique est l'obtention de matériel génétique d'une espèce qu'une banque de gènes a le mandat de conserver. C'est l'étape initiale de la conservation des ressources génétiques.

### Pourquoi est-elle réalisée ?

La principale raison d'acquérir du matériel génétique est d'assurer qu'une diversité suffisante est disponible pour répondre aux besoins présents et futurs. Les raisons pour l'acquisition incluent :

- l'érosion génétique : quand la menace de perte de diversité génétique est présente dans une zone particulière et que la conservation *in situ* n'est pas possible ;
- compléter des manques : quand il manque de la diversité ou qu'elle est insuffisamment représentée dans une collection existante ;
- l'acquisition en réponse à un besoin : lorsque l'on a besoin de matériel génétique pour du travail d'amélioration, de recherche ou de développement ;
- l'acquisition opportuniste : la collecte non planifiée, fortuite, d'espèces non cibles lorsque l'occasion se présente.

### Comment est-elle réalisée ?

Le matériel génétique est acquis en :

- le collectant dans les champs d'agriculteurs, des habitats sauvages ou sur les marchés, particulièrement dans les centres de diversité connus ;
- se procurant du matériel intéressant par correspondance ou par des échanges avec d'autres centres d'introduction de végétaux, des banques de gènes, des scientifiques, des cultivateurs privés, des sociétés semencières ou d'autres fournisseurs de matériel génétique.

### Politique d'acquisition de matériel génétique

Les banques de gènes doivent avoir des politiques d'acquisition claires afin que le volume de matériel acquis reste dans les limites des capacités de gestion de chaque banque de gènes. Lorsque l'espace de stockage ou les ressources pour maintenir les collections sont limitées, le matériel génétique doit être acquis en se basant sur les priorités.

### Etablissement de priorités

L'acquisition de matériel génétique doit être basée sur sa valeur ou sur la menace d'extinction perçue. La valeur peut être estimée comme l'utilité des caractères et l'adaptation à des environnements uniques. Les races locales, les cultivars primitifs et les espèces sauvages et apparentées doivent recevoir une priorité d'acquisition élevée, suivis par les stocks génétiques, le matériel élite d'amélioration et les variétés obsolètes et modernes. Il faut considérer la disponibilité des ressources pour la gestion avant d'acquérir des taxons sauvages.

La Convention sur la diversité biologique (CDB) et le Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (PGRFA) fournissent les cadres pour l'acquisition et l'utilisation du matériel génétique. La collecte est liée par la CDB, qui couvre l'accès avec consentement préalable en connaissance de cause selon des termes acceptés mutuellement et le partage des avantages. Le Traité international sur les PGRFA se réfère spécifiquement aux espèces cultivées listées dans l'Annexe I du Traité, que les pays participants ont identifiées comme étant importantes à inclure dans un système d'accès multilatéral. L'accès au matériel génétique dans le cadre de ces deux instruments internationaux est maintenant gouverné par l'Accord standard de transfert de matériel (SMTA), qui a été adopté par l'organe directeur du Traité ; les termes du SMTA couvrent à la fois l'accès au matériel génétique et les bénéfices qui en dérivent, et doivent être pris en compte lors de la collecte et de l'échange de matériel.

## Acquisition de matériel génétique par collecte

La planification et la réalisation de la collecte de matériel génétique ont été couvertes en détails dans les publications de Guarino et al. (1995) et Smith et al. (2003). Le personnel des banques de gènes doit se référer à ces publications pour de plus amples informations.

### Moment d'une collecte de semences

Idéalement, les semences doivent être collectées à leur maturité optimale, lorsque la vigueur des semences, leur tolérance à la

dessiccation et leur longévité sont considérées comme les plus hautes. Alors qu'il est difficile de suivre ces caractéristiques au champ, les changements de la couleur du fruit, des graines ou la formation d'une couche noire (chez les céréales) peuvent être utilisés comme indicateurs visuels pour faire des évaluations préliminaires de la maturité optimale des semences. Ces changements sont bien corrélés avec l'accomplissement de la maturité de masse, mais pas nécessairement avec la longévité maximale des semences. Cependant, ce sont des indicateurs utiles pour les collecteurs de matériel génétique. La dispersion des semences est également un bon marqueur pratique de la maturité des semences.

**Couleur des fruits**

Chez les fruits charnus, les changements de couleur – généralement du vert au jaune, brun ou rouge – se produisent avec la maturité.

- Chez la tomate, la couleur rouge du fruit indique que la plupart des semences sont à leur longévité maximale. Les semences de fruits verts, jaunes/roses ou trop mûrs ont des chances d'être soit immatures, soit trop matures et de mauvaise qualité.
- Chez *Cucurbita moschata*, un changement de la couleur du fruit du vert au jaune-brun et un pédoncule de couleur paille indiquent une vigueur des semences élevée.
- Chez *Capsicum annuum*, la vigueur des semences augmente en même temps que la couleur du fruit change du vert au rouge avec quelques petites taches vertes, puis au rouge intense.
- Chez *Brassica oleracea*, la couleur du fruit (silique) change du vert au jaune, et chez le soja ainsi que de nombreuses autres légumineuses, elle change du vert au jaune-brun puis au brun au fur et à mesure que la graine mature.

**Couleur des graines**

Chez de nombreux fruits secs, la couleur des graines change du vert au jaune ou au brun, au fur et à mesure que la graine mature :

- Chez le soja, la couleur des semences change du vert au jaune-vert puis au jaune.
- Chez *Sesbania bispinosa*, la couleur de l'enveloppe de la graine change du jaune au vert olive, puis au brun verdâtre.

**Formation d'une couche noire**

Chez les céréales, comme le maïs ou le sorgho, la maturation coïncide avec la formation d'une couche d'abscission noire ou brune, nommée "couche noire". La maturité est aussi indiquée par le fait que les mésocarpes et les feuilles inférieures se déssèchent.

- La couche noire est localisée à la base de l'amande, au point d'attache de l'épi, du côté opposé à l'embryon (maïs) ou au sommet du grain (sorgho et millet).

- La couche noire peut être trouvée en grattant doucement pour enlever l'enveloppe de la graine et exposer ainsi la couche d'abscission.

### Variation de la maturité des semences

Les collecteurs de matériel génétique rencontrent souvent des variations dans la maturité des semences, qui sont le résultat des différences de période de floraison entre les plantes et, au sein d'une même inflorescence, sur des plantes individuelles. Ce problème peut être surmonté en collectant des fruits de maturité uniforme — à condition que certains marqueurs et le temps suffisant soient disponibles.

### Conteneurs pour collecter les échantillons

- Utiliser des sacs en papier pour collecter les graines.
- Utiliser des sacs en tissu qui permettent la circulation de l'air (comme des sacs en mousseline) pour collecter des panicules ou des fruits secs.
- Utiliser des conteneurs ouverts tels que des paniers en fil métallique ou en bambou, ou des tubes pour collecter les fruits charnus.
- S'assurer que les fruits ne sont pas écrasés.
- Pendant le transport, ne pas laisser trop monter la température des fruits pour éviter qu'ils fermentent.
- Des sacs en filets de nylon sont également très utiles pour collecter les échantillons, car ils laissent l'air circuler librement. En plus de leur utilisation pour collecter des semences, des gousses et des fruits, ils peuvent être utilisés pour l'extraction des graines et pour faire sécher les graines après extraction. Ils sont disponibles dans toute une gamme de mailles.

### Traitement des semences au champ

Juste après leur récolte, les semences ont souvent des taux d'humidité élevés (10–20%) et courent le risque de se détériorer à cause de contaminations par des champignons ou des bactéries. Les fruits et les semences humides ont des taux de respiration élevés, et si l'oxygène vient à manquer à cause d'une aération inadéquate, la fermentation démarre. La respiration et la fermentation créent toutes deux de la chaleur, ce qui cause des dommages au matériel stocké. Lorsque les missions de collecte sont particulièrement longues, le pré-nettoyage, l'extraction des semences et leur déshydratation au champ deviennent nécessaires pour réduire le volume et le poids pendant le transport, éliminer les contaminants et amener la teneur en eau des semences à niveau sans risques.

- Employer les méthodes du manuel pour le nettoyage et l'extraction des semences afin de conserver la viabilité.
- Si les graines sont collectées avec une surface humide, les sécher d'abord à l'ombre ou dans une pièce bien ventilée en les

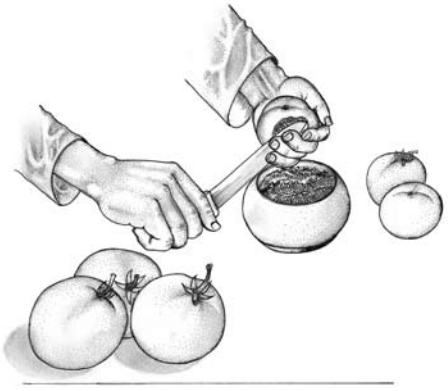
étalant sur du papier journal ou du papier absorbant, avant de les transférer dans sacs en tissu ou en papier.
- Les semences des fruits déhiscents (tels que le gombo, le colza et le sésame) peuvent être extraites en répartissant les fruits sur une bâche à l'ombre.
- Les fruits matures s'ouvrent et relâchent leurs graines au fur et à mesure qu'ils sèchent. Il faut parfois apporter un impact supplémentaire comme ratisser ou secouer les fruits.
- Enlever les fruits vides et les débris et transférer les semences dans des sacs en coton, en nylon ou en papier.
- Avec les fruits à pulpe (comme la tomate ou le concombre), extraire les semences à la main avec précautions, les laver à l'eau courante pour enlever la pulpe et le mucilage, les étaler en une couche fine pour maximiser l'aération et leur permettre de sécher à l'ombre (voir Figure 2.1).
- Toujours conserver les semences dans des conteneurs perméables à l'humidité, comme des sacs en papier ou en coton, et s'assurer que l'air circule librement entre et au travers des sacs.
- Lorsque les conditions climatiques sont chaudes et humides et que les missions de collecte sont longues, il faut déshydrater encore plus les semences en utilisant des dessiccants tels que le silicagel (la proportion recommandée de graines par rapport au silicagel est de 3:2 à 1:1).
- Conserver des couches alternées de silicagel et de graines empaquetées dans un grand conteneur étanche à l'air afin de réduire le taux d'humidité des semences.
- Avec les petits fruits qui contiennent un grand nombre de semences (tels que le kiwi ou la fraise), conserver les semences à l'intérieur des fruits est l'option la plus pratique si les missions de collectes sont courtes et si la logistique le permet.
- L'extraction des graines doit être évitée si les fruits nécessitent un post-mûrissement ou si les semences sont fragiles ou récalcitrantes.

### Transport du matériel collecté jusqu'à la banque de gènes

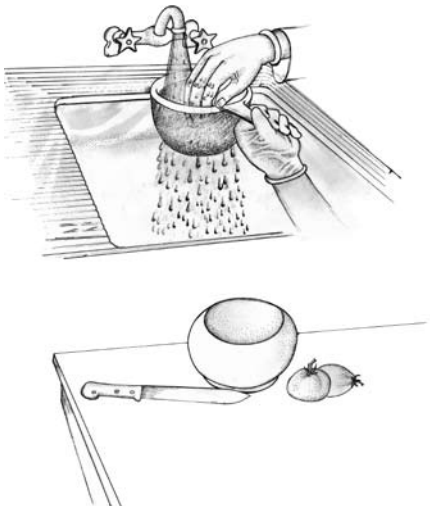
L'équipe d'exploration doit assurer la sécurité du matériel collecté jusqu'à la fin de la mission de collecte, lorsqu'il est transporté à la banque de gènes. L'exposition des semences à des conditions défavorables pendant le transport peut causer des dommages très importants.

- Il faut prendre soin de conserver le matériel à température optimale et à un taux d'humidité sans danger, même quand la distance de transport est courte.
- S'assurer que le conteneur renfermant les semences est bien emballé et qu'aucun dégât n'est causé aux semences ou aux fruits au cours du transport.

Recruter des porteurs pour accompagner l'équipe lorsque la collecte s'effectue au cours de longues expéditions dans des endroits reculés et envoyer le matériel périssable ou les semences ayant une viabilité limitée le plus tôt possible à la banque de gènes.

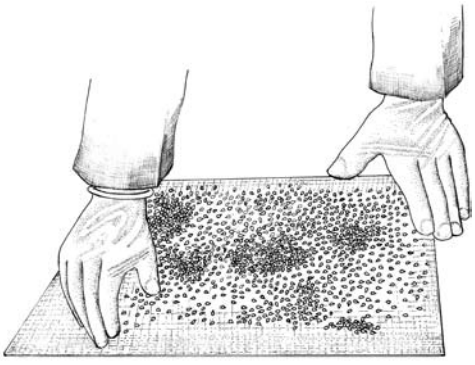


1



2

3



4

**Figure 2.1.** L'extraction des graines des fruits charnus.

### Acquisition du matériel génétique par correspondance et échange

Les échantillons peuvent être obtenus par correspondance si l'on sait que la zone d'intérêt a déjà été collectée. Les banques de gènes doivent demander de la documentation aux pays ou à des entités indépendantes pour certifier que l'envoi est exempt d'organismes génétiquement modifiés (OGM).

### Identification d'échantillons uniques pour acquisition

Le maintien d'échantillons dans une banque de gènes est coûteux ; les banques de gènes doivent vérifier avec soin que les échantillons n'existent pas déjà dans leurs collections avant acquisition. Puisque chaque banque de gènes adopte son propre système de numérotation, il est possible que la même accession soit enregistrée deux fois avec une identification différente. On identifie le plus facilement une duplication dans une collection en comparant les champs pertinents dans les bases de données passeport des banques donatrices et destinataires.

### Acquisition de matériel génétique unique

Obtenir les informations passeport complètes, incluant les noms ou numéros d'identification possibles, le pedigree et la source d'origine.

- Préparer une liste finale des accessions uniques à acquérir.
- Envoyer la liste finale d'accessions à acquérir identifiées à l'expéditeur, pour faciliter le transfert des semences.
- Si le matériel est reçu de l'étranger, vérifier les exigences des autorités phytosanitaires nationales du pays receveur et suivre les procédures pour l'importation des semences décrites ci-dessous.

Les accessions de matériel génétique qui ont été criblées et "purifiées" par sélection pour leurs caractéristiques désirables, ainsi que les mutants identifiés lors de la plantation de matériel génétique, servent de matériel brut important pour l'amélioration des plantes. Ils incluent des sources de résistance aux contraintes biotiques et abiotiques, des lignées mâles-stériles, des nains et d'autres stocks génétiques. Les banques de gènes doivent acquérir ce matériel avec les informations complètes sur son pedigree.

Les banques de gènes peuvent également acquérir du matériel génétique élite généré au cours de programmes d'amélioration pour des caractères spécifiques ou qui ont un rendement élevé prouvé. Au cours de l'acquisition, s'assurer que les détails de pedigree et les données morphologiques complets sont inclus avec le matériel.

La plupart des erreurs sont faites lors de l'entrée des données, particulièrement en ce qui concerne les espaces, la ponctuation, la casse et l'orthographe, qui nécessitent une vérification attentive lorsque l'on compare des bases de données pour identifier des doublons.

**Introduction de matériel génétique et quarantaine post-entrée**
Les banques de gènes acquièrent souvent du matériel génétique provenant de zones dans lesquelles les ravageurs, les pathogènes et les espèces-hôtes ont co-évolué. La classification suivante aidera le personnel des banques de gènes à évaluer le statut phytosanitaire potentiel du matériel à acquérir.

Le risque d'introduire de nouveaux ravageurs et pathogènes est :
1. *faible* pour du matériel génétique collecté ou produit dans la région ou le pays dans lequel est située la banque de gènes ;
2. *intermédiaire* pour du matériel génétique collecté ou produit dans la même région géographique ou le même continent que celui dans lequel le pays hôte est situé ;
3. *élevé* pour du matériel génétique collecté ou produit dans d'autres continents et pour du matériel végétatif.

Afin de réduire le risque d'entrée de ravageurs, pathogènes et mauvaises herbes, certains pays ont une législation qui contrôle l'entrée de matériel de propagation exotique, y compris les semences. L'importateur doit s'assurer qu'il suit toutes les exigences du pays destinataire avant d'importer la moindre semence.

Les caractéristiques des règles d'importation peuvent inclure des dispositions telles que les suivantes :
- Les envois de plantes et semences peuvent devoir être importés à des points d'entrée spécifiques, comme déterminé par les autorités de protection des plantes du pays importateur.
- Les semences et le matériel de plantation peuvent devoir être cultivés en isolement, ou confinés dans une structure de quarantaine post-entrée pour une durée spécifiée, ou remplir certaines conditions.
- Des dispositions supplémentaires peuvent être requises pour des envois consistués de plantes ou produits végétaux.
- L'importation de sol, de terre, sable, compost et débris de plantes accompagnant les semences ou le matériel de plantation est généralement proscrite.

Les envois seront probablement inspectés et désinfectés si nécessaire par les autorités phytosanitaires avant leur autorisation, à condition que toutes les autres exigences du pays importateur aient été satisfaites. Le non respect de ces exigences peut causer des retards malvenus, qui peuvent conduire à la destruction du matériel.

Le matériel issu de semences nécessitant un isolement peut être planté en serre à l'épreuve des ravageurs, dans des cages grillagées ou sur des parcelles en champ. Le personnel des services phytosanitaires

conduit des inspections périodiques pendant la période de croissance des plantes, au cours desquelles les plantes atteintes par des ravageurs associés aux semences sont détruites, alors que les graines collectées sur les plantes saines sont délivrées à la banque de gènes.

### Procédure pour l'importation de semences

Lors de l'étape de planification, prendre en compte les ravageurs que l'on trouve sur l'espèce cible et les exigences phytosanitaires pour l'introduction du matériel génétique.

1. Collecter des informations sur les ravageurs que l'on a des chances de rencontrer dans le pays ou la zone de collecte ou de production des semences.
2. Déterminer sur quelles parties de la plante on trouve ces ravageurs.
3. Vérifier les conditions d'importation des semences avec les autorités phytosanitaires nationales. Si nécessaire, obtenir un *permis d'importation de végétaux*[1] des autorités compétentes et l'expédier à l'envoyeur avant l'importation. Toutes les demandes phytosanitaires doivent être soumises aux autorités phytosanitaires nationales du pays hôte pour approbation.
4. Si une quarantaine post-introduction est nécessaire, chaque accession doit être cultivée en confinement ou en isolement.
5. Les plantes doivent être observées périodiquement et celles sur lesquelles on soupçonne une infection par des ravageurs associés aux semences doivent être détruites par incinération.
6. Toutes les plantes ne présentant aucun symptôme doivent être testées pour la présence d'infections latentes par des virus que l'on trouve dans leur zone d'origine et dans le pays où elles sont maintenues ; les plantes infectées doivent être incinérées.
7. Les semences ne doivent être collectées que sur des plantes saines.

### Organismes génétiquement modifiés (OGM)

Les banques de gènes doivent être conscientes des dangers inhérents à l'introduction par inadvertance de transgènes ou de plantes génétiquement modifiées lors de l'assemblage du matériel génétique, et elles doivent prendre des mesures pour minimiser ces introductions (voir Annexe I ainsi que la section 5.3 de ce manuel). Lorsqu'elles planifient la collecte de nouvelles accessions ou leur acquisition par d'autres moyens, les banques de gènes doivent effectuer une analyse de risques pour déterminer :

1. si des évènements de transgenèse (commerciaux ou de recherche) dans les taxons concernés sont susceptibles d'être présents dans la zone de collecte ou d'acquisition ;

[1] Un permis d'importation est une autorisation écrite des services nationaux de protection des plantes d'importer des produits contrôlés, y compris des plantes et des produits végétaux.

2. la distance entre le site de collecte et les sites où les évènements de transgenèse sont situés ;
3. si les fournisseurs de matériel génétique peuvent fournir une documentation adéquate de leurs pratiques de gestion en ce qui concerne le matériel en question.

**Lectures complémentaires**

Ebbels, D.L. 2003. Principles of plant health and quarantine. CAB International, Wallingford, UK.

FAO (2006). Third Session of the Intergovernmental Technical Working Group on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, Rome, 26–28 October 2005. http://www.fao.org/waicent/FaoInfo/Agricult/AGP/AGPS/pgr/ITWG3rd/docsp1.htm

Guarino, L., Rao, V.R. et Reid, R. (eds.). 1995. Collecting plant genetic diversity. CAB International, Wallingford, UK.

International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. FAO, Rome, Italie. http://www.fao.org/ag/cgrfa/itpgr.htm. (Dernière visite : 11 octobre 2006)

Hay, F.R. et Smith, R.D. 2003. Seed maturity: when to collect seeds from wild plants. Pp. 97–133 in Seed conservation: Turning science into practice. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard and R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, GB.

Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W. et Probert, J.R. (eds.). 2003. Seed conservation: Turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.

## 2.2 Enregistrement du matériel génétique

### Qu'est-ce que l'enregistrement ?

L'enregistrement est l'attribution d'un numéro d'identification unique appelé *numéro d'accession*, pour suivre chaque échantillon de semences reçu par une banque de gènes afin de le distinguer des autres échantillons.

### Pourquoi le fait-on ?

L'enregistrement est réalisé afin de permettre aux banques de gènes de conserver des archives exactes des échantillons et pour produire des listes d'inventaires pour la conservation, la distribution et d'autres aspects de la gestion du matériel génétique.

### Quand le fait-on ?

L'enregistrement est réalisé dès que l'échantillon entre dans la banque de gènes. Pour une gestion et une utilisation efficaces des collections, enregistrer les échantillons s'ils répondent aux conditions décrites ci-dessous.

### Comment le fait-on ?

L'enregistrement est réalisé en plusieurs étapes (voir Diagramme de flux 2.1) :

## Etape 1 : avant l'enregistrement

Avant l'enregistrement, le statut des échantillons doit être vérifié, pour s'assurer que les conditions minimales suivantes sont remplies avant qu'ils soient acceptés dans la banque de gènes.

### Accords et permis d'acquisition

Les échantillons doivent avoir été acquis auprès de collecteurs, de banques de gènes ou d'autres sources avec les accords et les permis d'acquisition ou de transfert de matériel appropriés, en accord avec les règlements nationaux et internationaux concernant leur conservation, distribution et utilisation (voir l'Annexe I pour plus d'informations).

### Informations passeport

Les échantillons doivent être accompagnés d'informations passeport adéquates, particulièrement le nom du cultivar, le numéro du collecteur et le pedigree (pour les stocks génétiques et le matériel amélioré), pour s'assurer que chaque échantillon n'existe pas déjà dans la banque de gènes. Les données passeport minimales requises doivent inclure les informations suivantes :

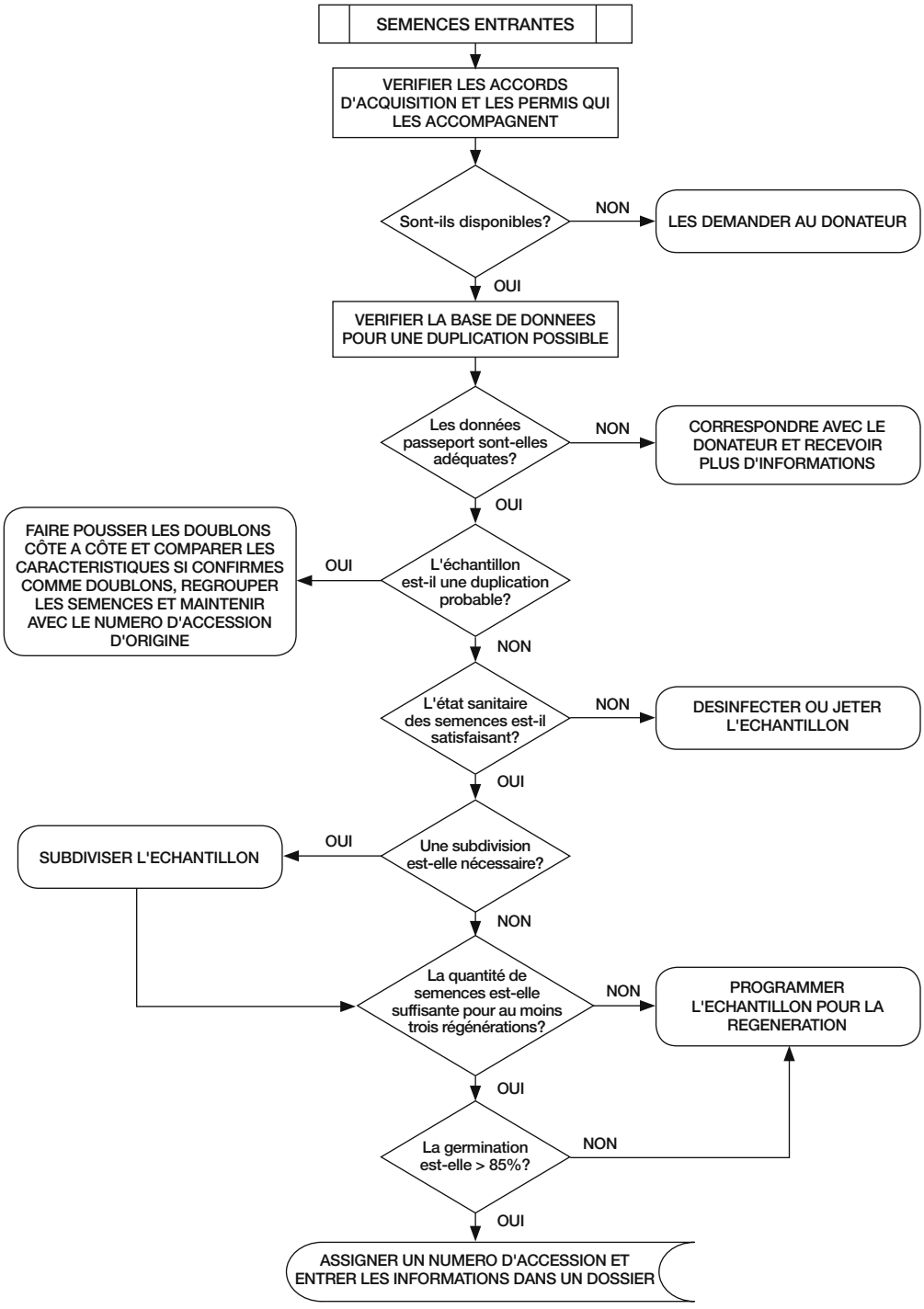
#### A. Echantillons de missions de collecte

- Nom commun de la plante et/ou genre et espèce
- Numéro de collecte
- Lieu du site de collecte
- Pays d'origine
- Date de collecte
- Phénologie
- Source de collecte
- Nombre de plantes échantillonnées

#### B. Echantillons reçus en donation

- Nom commun de la plante et/ou genre et espèce
- Nom de l'accession et/ou autre identification associée à l'échantillon
- Information sur le pedigree et détails de l'institut d'amélioration (pour les lignées de croisement)
- Phénologie
- Source d'acquisition
- Pays d'origine
- Numéro d'accession chez le donateur (si applicable)

**Diagramme de flux 2.1.** Enregistrement du matériel génétique.



### Distinctivité

Les nouveaux échantillons doivent être génétiquement distincts de toute autre accession déjà enregistrée dans la banque de gènes. Deux échantillons peuvent avoir des noms identiques ou très voisins et des caractéristiques des graines identiques, mais être génétiquement distincts, alors que des échantillons avec des noms différents peuvent être génétiquement similaires.

Les approches morphologiques, biochimiques et moléculaires peuvent être utilisées pour identifier les doublons, selon les infrastructures et les ressources disponibles dans la banque de gènes. Les tests suivants peuvent être réalisés :

#### Morphologiques

- Les doublons suspectés sont cultivés l'un à côté de l'autre en champ ou en serre et les différences entre les caractéristiques morphologiques, telles que la hauteur des plantes, la taille des fleurs et des feuilles, ainsi que leur forme et leur couleur sont comparées.
- L'accession candidate est définie comme distincte lorsque l'on trouve qu'elle diffère significativement pour au moins une des caractéristiques des accessions existantes déjà enregistrées.
- Les tests de différences basés sur la morphologie peuvent être similaires au groupe de caractéristiques spécifiques d'une plante cultivée, qui se conforment aux directives techniques établies par l'Union internationale pour la protection des obtentions végétales (UPOV, 1991). Si nécessaire, ces caractéristiques peuvent être évaluées sur deux ou trois saisons. Cependant, cela peut ne pas être réalisable avec des races locales qui ont une variabilité intra-accession élevée.
- La procédure statistique pour évaluer la distinctivité est le test t.

#### Biochimiques

Quand la comparaison phénotypique ne fournit pas une évidence suffisante de la distinctivité, des méthodes telles que l'électrophorèse des protéines de la semence et des isozymes peuvent être utilisées pour améliorer la comparaison des caractères morphologiques et pour distinguer les échantillons.

#### Moléculaires

Les marqueurs ADN tels que les AFLP, SSR et SNP offrent des outils puissants de discrimination et peuvent être appliqués avec succès pour vérifier l'apparentement entre échantillons, à condition que cette approche soit réalisable et économiquement viable. Pour plus de détails sur les méthodes moléculaires, voir de Vicente et Fulton (2003).

S'il est confirmé que les échantillons comparés sont des doublons, il est recommandé aux banques de gènes de regrouper les semences et de les traiter comme une entité. Si l'échantillon est identique à une accession existante, il faut la conserver sous le numéro d'accession d'origine.

### Etat sanitaire des semences

- Chaque échantillon doit être accompagné d'un *certificat phytosanitaire* et de déclarations supplémentaires selon les exigences des règlements phytosanitaires du pays hôte (voir le chapitre 7 pour plus de détails).
- Les échantillons de semences doivent être inspectés par examen visuel sous un stéréomicroscope. Ils doivent être exempts de pathogènes, de champignons en croissance, d'infections bactériennes et virales et d'insectes.

### Qualité et quantité des semences

Les semences doivent être de la plus haute qualité et en nombre adéquat pour le stockage.

- En général, le pourcentage de germination ne doit pas être inférieur à 85% pour les espèces cultivées ou inférieur à 75% pour les espèces sauvages (pour plus d'information sur les tests de germination, voir le chapitre 5).
- La quantité de semences doit être suffisante pour réaliser au moins trois régénérations. Cela garantira que des graines sont encore disponibles pour une autre plantation, même si le premier essai de régénération échoue (voir Encadré 2.1).

---

**Encadré 2.1.** Unité de base pour l'enregistrement.

Le nombre minimum de semences pour l'enregistrement (*unité de base*) peut être estimé à partir de la taille d'un échantillon standard utilisé pour la régénération et de la viabilité de l'échantillon, selon l'équation suivante.

*Nombre de semences requis pour l'enregistrement = Population de plantes désirée pour la régénération × nombre minimum de régénérations / (% de germination × % d'établissement attendu au champ)* [†]

***Exemple :***

Population de plantes désirée pour chaque régénération = 100
Germination = 95%
Etablissement attendu au champ = 90%
Nombre minimum de régénérations (facteur de sécurité) = 3

$$\text{Unité de base ou nombre minimum de semences pour l'enregistrement} = \frac{(100 \times 3)}{(0{,}95 \times 0{,}90)} = 351 \text{ semences}$$

[†] La germination et l'établissement au champ sont exprimés en décimales ; par exemple, 95% est exprimé comme 0,95. L'établissement des plantes est généralement inférieur de 5% au pourcentage de germination dans de mauvaises conditions et de 1% dans de bonnes conditions.

**Que faire si les conditions minimales ne sont pas satisfaites?**
Si l'échantillon ne satisfait pas aux conditions requises, lui assigner un *numéro temporaire* jusqu'à ce que l'échantillon soit prêt à recevoir un numéro d'enregistrement permanent. Le numéro temporaire doit pouvoir être facilement distingué des autres numéros d'accessions

**Accords et permis**
Contacter le collecteur ou le donateur pour les accords nécessaires qui définissent le statut des échantillons pour ce qui concerne leur conservation et utilisation ultérieure.

**Duplications d'accessions**
Confirmer la duplication et considérer les semences comme un nouveau lot de semences sous le numéro d'accession d'origine.

**Informations passeport manquantes**
Ecrire au collecteur ou au donateur du matériel génétique pour demander les informations manquantes.

**Mauvais état sanitaire des semences**
Si les semences contiennent des pathogènes ou des insectes, envoyer l'échantillon à un phytopathologiste ou un entomologiste pour traitement. S'il est possible d'acquérir un échantillon de remplacement, incinérer immédiatement l'échantillon et prendre note de l'action réalisée et de sa justification; demander un nouvel échantillon au donateur.

**Qualité et quantité de semences inadéquates**
Régénérer l'échantillon immédiatement.

Si les échantillons sont enregistrés sans données passeport adéquates, leur identité et statut biologique resteront inconnus, empêchant ainsi leur utilisation. Un échec de régénération d'échantillons ayant une viabilité faible ou comportant un très petit nombre de semences aura pour résultat la perte de l'accession, ce qui laissera des manques dans l'inventaire.

### Restructuration des échantillons

Chez les espèces autogames, si un échantillon comprend un mélange physique de deux lignées ou espèces, ou plus, elles peuvent être subdivisées et maintenues comme des accessions distinctes. Dans ce cas, subdiviser l'échantillon dans ses différents composants aide au maintien efficace de l'intégrité génétique. *Il faut noter qu'une subdivision ne doit pas être effectuée si la variation dans l'échantillon original est continue, comme chez les plantes fortement allogames.*

## Etape 2 : Procédure d'enregistrement

Si l'échantillon satisfait aux conditions minimales décrites ci-dessus, il peut être accepté pour enregistrement et un numéro d'accession lui est attribué en utilisant la procédure suivante :

1. Classer le matériel par ordre alphabétique par nom de variété ou par ordre numérique par numéro de collecte, selon l'identification fournie.

2. Vérifier tous les paquets en les comparant avec la liste accompagnant les échantillons.
3. Si aucune liste n'est fournie ou si les semences ne correspondent pas aux données, préparer une nouvelle liste. Revérifier pour confirmer que tous les paquets ont été inclus.
4. Vérifier le dossier des données passeport pour déterminer le dernier numéro d'accession donné.
5. Assigner le numéro supérieur suivant d'accession au premier échantillon de la liste et des numéros consécutifs aux échantillons suivants.
6. Ecrire clairement le numéro d'accession sur le paquet en utilisant un feutre indélébile, ainsi que sur la liste des nouveaux échantillons.
7. Entrer les détails dans les dossiers de données passeport du système de documentation de la banque de gènes. Pour chaque accession, enregistrer toutes les données passeport, les données originales d'identification et la date d'enregistrement dans les champs appropriés du dossier de données passeport.
8. S'il manque des données, laisser le champ vide et contacter le donateur pour qu'il fournisse les données manquantes.

### Procédures de numérotation pour les nouvelles banques de gènes

Le système de numérotation d'une banque de gènes doit être simple et pratique à utiliser.

- Utiliser un système strictement numérique qui soit séquentiel (1, 2, 3). Les numéros assignés sont généralement précédés d'un acronyme (comme GBK pour la Banque de gènes du Kenya) pour identifier chaque échantillon avec sa banque d'enregistrement. Des informations supplémentaires comme l'année d'acquisition et le code de la plante ne doivent pas être incorporés dans un numéro d'accession.
- Si des collections de matériel génétique de grande taille sont conservées, une numérotation d'accessions séparée mais séquentielle peut être donnée pour chaque culture. Cependant, cette approche n'est pas recommandée si la banque de gènes est petite ou si elle contient de nombreuses espèces.
- Eviter d'assigner des numéros "réservés" pour des plantes particulières (par exemple, 1 à 500 pour le maïs, 501 à 1000 pour le niébé) ou pour des espèces sauvages, lorsque l'on utilise un système numérique unique.

### Documentation

La documentation des informations reçues avec un échantillon est un aspect important de l'enregistrement. Les informations documentées

lors de l'enregistrement comprennent les données passeport, qui fournissent des informations de base pour l'identification et la gestion générale d'accessions individuelles.

Une grande partie de ces informations est soit enregistrée lorsque l'échantillon est collecté, ou bien accompagne l'échantillon s'il est reçu en provenance d'autres sources. L'utilisation de listes de descripteurs reconnus au niveau international pour documenter les informations passeport simplifie l'échange de données entre banques de gènes. La liste de descripteurs passeport standard multi-plantes (MCPD) développée par la FAO et l'IPGRI est disponible sur www.bioversityinternational.cgiar.org/publications/pdf/124.pdf.

### Lectures complémentaires

Engels J.M. et Visser, L. (eds.). 2003. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbook for Genebanks No.6. IPGRI, Rome, Italie.

de Vicente, C. et Fulton, T. 2003. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity : Learning module Vol 1. IPGRI, Rome, Italie.

International Union for the Protection of New Plant Varieties (UPOV). 1991. International Convention for the Protection of New Varieties of Plants. UPOV, Genève. (http://www.upov.int)

1. Introduction
2. Acquisition et enregistrement du matériel génétique
   2.1 Acquisition du matériel génétique
   2.2 Enregistrement du matériel génétique
3. Nettoyage des semences
4. Détermination du taux d'humidité des semences et déshydratation
   4.1 Détermination du taux d'humidité
   4.2 Déshydratation des semences
5. Contrôle de la qualité des semences
   5.1 Test de la viabilité des semences
   5.2 Test de l'état sanitaire des semences
   5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes
6. Empaquetage et stockage des semences
   6.1 Empaquetage des semences
   6.2 Stockage des semences
7. Distribution du matériel génétique
8. Contrôle et régénération du matériel génétique
   8.1 Contrôle du matériel génétique
   8.2 Régénération du matériel génétique

# 3. NETTOYAGE DES SEMENCES

### Qu'est-ce que le nettoyage des semences ?

Le nettoyage des semences est l'enlèvement des débris, du matériel inerte, des semences abîmées ou infectées et des semences d'autres espèces, pour augmenter la qualité des échantillons pour le stockage (voir Diagramme de flux 3.1).

### Pourquoi nettoyer les semences ?

Le nettoyage des semences est nécessaire pour :

- Réduire le volume pendant le transport en enlevant les matériaux étrangers ;
- Améliorer la pureté des échantillons en enlevant les semences abîmées et immatures ;
- Optimiser l'espace de stockage et réduire les coûts.

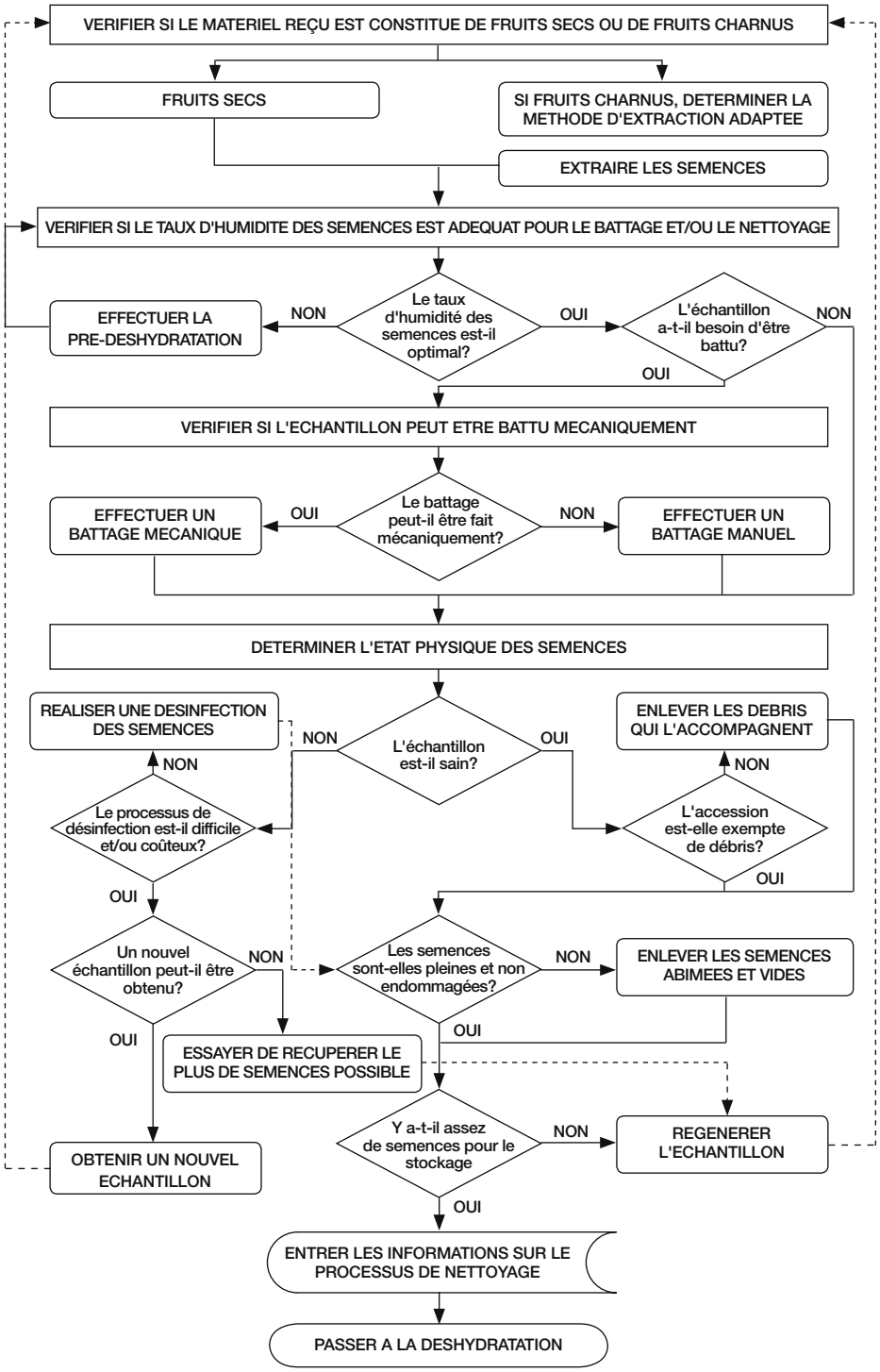
Chez les espèces fruitières, un certain pré-nettoyage peut être nécessaire pour enlever les feuilles et les rameaux afin de réduire le volume et d'empêcher la dissémination possible de maladies et de ravageurs.

### Quand nettoyer les semences ?

Les semences doivent être nettoyées immédiatement après la récolte ou peu après leur arrivée à la banque de gènes. Les fruits peuvent être mous et charnus, comme les drupes avec une pulpe charnue, ou durs et parcheminés, comme les gousses. L'extraction des semences est donc la première étape du nettoyage des semences.

Si les semences ne peuvent pas être manipulées immédiatement, les fruits peuvent être stockés pour une courte durée avant l'extraction des semences. Les fruits mous sont stockés de manière optimale à 10–15°C dans une humidité suffisamment élevée pour prévenir leur dessèchement. Les fruits durs ou secs sont stockés de façon optimale à l'ombre en couches fines. Il est essentiel que l'air circule librement entre les fruits humides. Pour faciliter cela, les fruits doivent être conservés dans des conteneurs ventilés tels que des plateaux avec des trous ou des fonds en grillage, ou dans des sacs en filets de nylon.

**Diagramme de flux 3.1.** Nettoyage des semences.



Le coût de la maintenance des accessions dans les banques de gènes est élevé. Seules des semences propres et de qualité élevée doivent être conservées en stockage.

## Extraction des semences des fruits

Les semences doivent être matures avant leur extraction. Sinon, il est possible de faire mûrir les fruits avec les graines à l'intérieur en les laissant dans un environnement frais et bien ventilé. Les conditions de stockage doivent simuler celles que l'on trouve sur la plante-mère. Les procédures d'extraction des semences varient selon le type de fruit.

### Extraction des graines de fruits secs déhiscents

Les banques de gènes reçoivent généralement les semences de fruits secs déhiscents après le battage. Cependant, dans certains cas, elles sont reçues dans les fruits comme des épis ou des inflorescences, ce qui nécessite leur séparation de la végétation.

De nombreux fruits secs déhiscents (capsules, siliques, follicules et gousses déhiscentes) s'ouvrent déjà au cours du séchage lorsqu'ils sont étalés en une couche fine avec une circulation d'air suffisante. Le détachement physique des graines des fruits varie avec l'espèce. Chez certaines, un mouvement mineur comme le ratissage, le fait de secouer ou d'agiter est suffisant pour une extraction complète. Les semences de certaines espèces comme certaines légumineuses conservent une attache forte par le funicule et les semences peuvent nécessiter une extraction manuelle ou par battage. Le battage est également nécessaire quand les semences sont reçues sous la forme d'épis (maïs, millet, etc.) ; il doit être réalisé quand le taux d'humidité est entre 12 et 16%, pour minimiser les dégâts causés aux semences.

Les semences peuvent être battues manuellement ou mécaniquement.

- Le battage manuel est la méthode préférée, parce qu'il y a une probabilité plus faible d'abîmer les semences pendant le battage. Les semences peuvent être battues en les plaçant dans des sacs ou en les étalant sur une aire de battage et en les battant avec des bâtons. Une autre méthode pour détacher les semences fortement attachées aux gousses est de les frotter doucement entre deux surfaces rugueuses telles que du caoutchouc, du papier de verre ou des pierres, en faisant attention à ne pas scarifier ou écraser les semences.
- Lorsque l'on utilise des batteuses mécaniques, il est essentiel que les batteuses soient nettoyées avec une brosse ou à l'air comprimé entre deux lots pour :
  - éviter la contamination avec des semences d'accessions battues précédemment ;
  - empêcher de transférer les maladies et ravageurs d'une accession à l'autre.

### Extraction de semences de fruits secs non déhiscents

Certains fruits non déhiscents doivent être cassés mécaniquement pour

pouvoir extraire leurs semences. Une certaine déshydratation initiale est nécessaire pour augmenter leur fragilité et faciliter l'extraction.

- Les semences de gros fruits (comme l'arachide et les haricots) peuvent être extraits en ouvrant chaque fruit manuellement ou par traitement mécanique, sans abîmer les graines.
- Les fruits non déhiscents plus petits (comme chez le poix-chiche et les crucifères) peuvent être cassés en les battant comme décrit ci-dessus.
- Les gousses avec un matériau gommeux (telles que *Prosopis cineraria*) nécessitent plusieurs séances de battage et un séchage intermittent.

### La technique de transpiration pour les herbes fourragères

La transpiration est une technique utile pour améliorer la maturité et faciliter le battage et le nettoyage des semences de certaines herbes tropicales qui sont étroitement enserrées dans des glumes. Elle consiste à empiler les épis fraîchement coupés, à les envelopper dans de l'herbe ou une bâche pour leur permettre de chauffer ou de transpirer à l'ombre, et à les empêcher de se dessécher pendant trois ou quatre jours. Après cette période, les graines matures sont facilement séparées sans battage. La pile doit être surveillée de près et tournée de temps en temps pour empêcher une montée en température excessive ; des températures trop élevées pendant la transpiration peuvent causer une détérioration des semences.

### Extraction des semences de fruits charnus

La méthode d'extraction des fruits charnus varie avec le type de fruit.

- Le mieux est de couper le fruit en deux ou de couper sa partie distale et de l'écraser pour en faire sortir le contenu dans un récipient.
- Les petites graines de fruits pulpeux peuvent être extraites en écrasant la pulpe, en la mélangeant avec de l'eau, en laissant les graines sédimenter et en enlevant la pulpe.
- Les semences de grandes dimensions peuvent être extraites de la pulpe avec des pinces (comme les *Citrus* spp.). La pulpe peut aussi être détachée en lavant les semences dans des tamis sous l'eau courante ou en les frottant contre un treillis métallique et en les rinçant pour enlever la pulpe. Un mixeur peut être utilisé pour broyer de grandes quantités de pulpe, mais on broie facilement trop fort et on abîme les semences. Utiliser une agitation brève, intermittente, à vitesse réduite. Couvrir les lames du mixeur avec une couche de caoutchouc peut également réduire les dégâts. L'extraction manuelle est préférable, afin d'éviter de causer des dommages physiques aux semences pendant ce processus.
- Après le lavage, sécher les semences en couches fines sur des feuilles de papier absorbant avec une circulation d'air et à l'ombre, en évitant la chaleur.

**Graines mucilagineuses**

Si un mucilage entoure les semences (comme chez la tomate, le concombre et certains melons) et qu'il ne peut pas être enlevé par lavage, il existe un nombre d'options :

- Frotter doucement les graines mouillées sur un treillis métallique (la taille des mailles doit retenir les graines alors que la pulpe passe au travers) avec une main gantée.
- Frotter doucement les semences avec du sable propre et grossier, puis enlever le sable et le mucilage avec de l'eau.
- Il est également possible de commencer par déshydrater les semences et d'enlever ensuite le mucilage. S'assurer que les semences ne collent pas à la surface de séchage et qu'elles sont bien séparées, pour empêcher qu'elles se collent entre elles pendant le séchage.
- Pour enlever le mucilage, la fermentation (à 20–25°C pendant jusqu'à trois jours), un traitement à l'acide (une solution d'HCl à 2–4% ajoutée à la solution visqueuse dans la proportion de 1/1 pendant une heure), une digestion enzymatique (solution de pectinase à 0,1% poids/volume à la proportion de 1:40 pendant 24 heures) et le bicarbonate de sodium (solution à 10% mélangée à la solution visqueuse dans une proportion de 1:1 appliquée pendant 18–24 heures) sont également employés. Cependant, les traitements prolongés peuvent endommager les semences et ils doivent être utilisés avec prudence.

**Fruits avec une pulpe fortement adhérente**

Les fruits chez lesquels la pulpe est fortement adhérente aux semences (comme l'amandier) peuvent être manipulés avec les méthodes suivantes :

- Faire tremper les fruits dans des seaux ou des conteneurs appropriés, jusqu'à ce qu'ils soient mous, mais pas jusqu'à ce qu'ils commencent à fermenter, comme l'indiquent les bulles et l'odeur. Séparer manuellement les semences de la pulpe.
- Ecraser les fruits imbibés pour séparer la chair des graines.

Après le dépulpage, laver soigneusement les semences pour enlever toute trace de pulpe. Le lavage sous l'eau courante est la meilleure méthode.

Ne pas essayer de déshydrater les semences si l'on sait qu'elles sont récalcitrantes et qu'elles ne supportent pas la dessiccation jusqu'à des teneurs en eau basses.

**Fruits à noyaux**

Les fruits à noyaux (comme la pêche, la prune ou l'abricot) peuvent être dépulpés dans un broyeur ménager (les lames doivent être protégées avec du caoutchouc) sans risque d'abîmer les semences. Détacher la chair à la main avec un couteau bien aiguisé est aussi un moyen pratique pour de petites quantités de semences. Après le

dépulpage, laver les noyaux à l'eau courante pour enlever les traces de pulpe et sécher la surface. Si les graines doivent être extraites pour le stockage, sécher les noyaux et ouvrir chaque endocarpe avec une pince, en appliquant la pression au point le plus large de l'axe longitudinal du noyau. Sinon, insérer une lame résistante dans le sillon et tourner.

Il est important que les semences orthodoxes extraites des fruits soient déshydratées rapidement à une température appropriée, jusqu'à des teneurs en eau basses pour le stockage à long terme.

## Comment nettoyer les semences

Le nettoyage ne doit pas abîmer les échantillons ou conduire à un gaspillage. Il peut être réalisé manuellement ou mécaniquement, mais il est fortement recommandé aux banques de gènes de nettoyer les accessions à la main pour les raisons suivantes :

- Le nettoyage mécanique peut conduire à une sélection au sein d'accessions génétiquement hétérogènes (du fait de l'exclusion des très petites et très grosses semences qui passent par les ouvertures mécaniques).
- Les équipements nécessitent un nettoyage rigoureux et souvent des ajustements précis entre les accessions.

### Etape 1 : Séparation des débris

La première étape du nettoyage des semences est d'enlever tous les débris (matériel autre que les semences) de l'échantillon entier.

- Utiliser des tamis à main avec des mailles de différentes tailles pour enlever les petits et gros débris. Lorsque l'on nettoie des accessions génétiquement hétérogènes, il est important de remettre les petites semences dans le reste de l'accession.
- Séparer les graines vides et les autres matériaux légers comme les écales qui n'ont pas été séparés lors du tamisage, par un vannage doux[2] ou dans un souffleur de semences.[3]

### Etape 2 : Examen des semences pour identifier les dégâts causés par les champignons et les insectes

- Etaler les semences sur une surface plate, bien éclairée, d'une couleur contrastée et observer tout signe d'infestation. Utiliser une table lumineuse ou une table de pureté, si disponibles.

[2] Les semences sont placées dans des paniers plats et lancées en l'air. Le vent écarte tous les matériaux légers comme la poussière et les fragments de feuille, alors que les semences, plus lourdes, retombent dans le panier.

[3] Les lots de semences sont placés dans un cylindre vertical à la base duquel de l'air est soufflé par un dispositif alimenté à l'électricité. Le courant d'air qui va vers le haut entraîne vers le haut tout les matériaux légers comme les écales alors que les semences, plus lourdes, sont récupérées à la base.

- Si les semences sont moisies ou infestées :
  - isoler l'échantillon affecté du reste du matériel ;
  - déshydrater les semences avec du silicagel jusqu'à un taux d'humidité bas dans des conteneurs scellés, pour éviter une diffusion plus large des champignons ou des insectes ;
  - si on suspecte une infestation, stocker les semences dans un réfrigérateur à une température voisine de zéro pendant sept jours pour tuer les insectes avant d'enlever les semences infectées, et continuer les procédures normales d'empaquetage et de stockage.

### Etape 3 : Examen des semences pour identifier les dommages mécaniques et les semences vides

- Etaler les semences sur une surface bien éclairée, de couleur contrastée, comme une table lumineuse ou une table de pureté.
- Les examiner pour identifier tout dommage physique ou toute semence vide.
- Séparer manuellement et éliminer toutes les semences abîmées ou flétries repérées à l'œil nu.
- Séparer les semences vides et le matériel léger par soufflage, comme décrit ci-dessus.

### Etape 4 : analyse de pureté

La pureté exprime combien un lot de semences est "propre". Les informations sur la véritable composition du lot de semences sont importantes ; l'analyse de pureté sert de guide pour déterminer la nécessité d'un nettoyage supplémentaire. Au cours d'une analyse de pureté, chaque fraction de semences "pures"[4] de l'échantillon de travail est séparée de la matière inerte et des autres semences.

- Peser un échantillon de travail d'un poids donné (par exemple 250 g) prélevé au hasard dans le lot entier de semences en utilisant une balance électronique.
- Etaler l'échantillon sur la table et séparer manuellement toutes les semences pures avec des pinces ou éliminer les impuretés par soufflage, tamisage, ou en laissant les semences rouler sur une surface en pente.

[4] L'ISTA (2005) spécifie qu'une fraction pure de semences contient : (i) des semences intactes de l'espèce en question ainsi que des semences mortes, flétries, malades, immatures ou pré-germées ; (ii) des akènes et des fruits similaires comme des samares avec ou sans périanthe, sans tenir compte de savoir si ils contiennent une vraie semence, à moins qu'il soit apparent qu'ils n'en contiennent pas ; (iii) des fractions de semences cassées, des akènes, etc. qui ont plus de la moitié de leur taille d'origine. Dans les banques de gènes, la pureté doit être attribuée à des échantillons qui ne sont pas seulement exempts de semences de mauvaises herbes et d'autres plantes cultivées et de matériaux inertes mais aussi de semences vides, immatures, abîmées et infectées.

- Peser la fraction de semences “pures” et exprimer la pureté comme le pourcentage du poids des semences pures sur le poids total de l’échantillon de travail, comme indiqué ci-dessous.

$$\text{Pureté (\%)} = \frac{\text{Poids des semences pures (g)}}{\text{Poids total de l’échantillon de travail (g)}} \times 100$$

**Exemple :**

Poids total de l’échantillon de travail = 250 g
Poids des semences pures = 245,2 g
Matière inerte = 3,5 g
Autres graines = 1,3 g
Pureté (%) = $\frac{245,2}{250}$ x 100 = 98,08%

### Etape 5 : Vérification

Après le nettoyage :

- Re-contrôler visuellement les échantillons pour leur pureté et les semences abîmées.
- Vérifier l’échantillon de référence (voir chapitre 6) ou les données de référence pour une couleur et une forme des semences correspondantes, si les échantillons sont reçus après régénération.
- Après le nettoyage des semences, détruire soigneusement les déchets pour éviter la diffusion d’insectes et de maladies à d’autres matériels.

### Equipement utile

Les équipements suivants sont utiles pour le nettoyage des semences :

- Tamis : Un jeu de tamis gradués empilables comme ceux utilisés pour l’analyse des sols. Les tailles les plus utiles sont les numéros standards 5, 10, 18, 35 et 60, qui correspondent à des mailles de 0,1574"/4 mm, 0,787"/2 mm, 0,394"/1 mm, 0,197"/0.5 mm et 0,0098"/0.25 mm. Des passoires de cuisine avec des grilles de tailles différentes peuvent également être utilisées, ou un tissu à mailles grossières peut aussi être employé.
- Des verres doseurs en Pyrex de différentes tailles : 1, 2 et 4 verres de contenance.
- Des petits plateaux, des bols mixeurs, des passoires, des cuves et d’autres récipients en plastique ; le matériel de cuisine ordinaire est bien adapté.
- Des outils pour découper : un couteau tranchant, un couteau à dents, des lames de rasoir ou un cutter à lames jetables, des ciseaux à bouts fins.
- Une planche à découper.

La pureté doit être attribuée à des échantillons qui sont non seulement exempts de graines de mauvaises herbes et d’autres plantes cultivées, de débris et de matériel inerte, mais aussi de semences vides, immatures, abîmées ou infectées. Les banques de gènes doivent viser la pureté absolue – il est important d’établir des standards aussi hauts que 95% pour la proportion de semences pures dans les accessions. Si une accession n’atteint pas cette valeur après le nettoyage initial, elle doit alors être re-nettoyée autant de fois que nécessaire pour atteindre la pureté absolue.

- Des pinces plates.
- Des limes, du papier de verre, des grilles en fil de fer et autres outils abrasifs.
- Des filtres en papier comme les filtres à café Melitta numéro 6 et du papier filtre
- Une lampe grossissante, une loupe serre-tête et une loupe à main 7–14×
- Des pinces, des pinces fines et des pinces à bout pointu
- Un sèche-cheveux manuel, de préférence à plusieurs vitesses, dont l'unité de chauffage a été déconnectée
- Un souffleur de semences — un appareil mécanique pour vanner les semences pour diminuer la quantité de déchets, particulièrement chez les semences d'espèces herbacées (par ex. un souffleur South Dakota)
- Un petit ventilateur
- Un mixeur avec des lames recouvertes de caoutchouc
- Des vaporisateurs avec jet réglable

## Documentation

De nombreuses banques de gènes ont tendance à ne pas documenter les procédures de nettoyage des semences, sauf pour ce qui concerne la date de nettoyage. Comme les collections de matériel génétique recouvrent souvent une variété de caractéristiques de fruits et de semences, et que les procédures de nettoyage varient selon les plantes et les accessions, il est important que toutes les données associées soient collectées et stockées pour référence future. Les descripteurs suivants peuvent être utilisés pour documenter les informations sur le nettoyage des semences au niveau des accessions :

- Type d'échantillon
- Méthode d'extraction
- Méthode de battage
- Méthode de nettoyage
- Date de nettoyage
- Proportion de semences vides, immatures ou endommagées (%)
- Poids ou nombre total de semences après nettoyage
- Pureté des semences (%)

### Lectures complémentaires

Ellis, R.H., Hong, T.D. et Roberts, E.H. 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks. Volume 1. Principles and methodology. IBPGR, Rome, Italie.

ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edition 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suisse.

Schmidt, L. 2000. Guide to handling of tropical and subtropical forest seeds. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Danemark.

1. Introduction
2. Acquisition et enregistrement du matériel génétique
   2.1 Acquisition du matériel génétique
   2.2 Enregistrement du matériel génétique
3. Nettoyage des semences
4. Détermination du taux d'humidité des semences et déshydratation
   4.1 Détermination du taux d'humidité
   4.2 Déshydratation des semences
5. Contrôle de la qualité des semences
   5.1 Test de la viabilité des semences
   5.2 Test de l'état sanitaire des semences
   5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes
6. Empaquetage et stockage des semences
   6.1 Empaquetage des semences
   6.2 Stockage des semences
7. Distribution du matériel génétique
8. Contrôle et régénération du matériel génétique
   8.1 Contrôle du matériel génétique
   8.2 Régénération du matériel génétique

# 4. DETERMINATION DU TAUX D'HUMIDITE DES SEMENCES ET DESHYDRATATION

## 4.1 Détermination du taux d'humidité

### Qu'est-ce que le taux d'humidité des semences ?

Le taux d'humidité des semences (THS) est la quantité d'eau présente dans une semence. L'eau est présente à la fois sous forme libre et sous forme liée à des composés chimiques dans les cellules, tels que les hydrates de carbone et les protéines.

Le THS est exprimé en termes du poids de l'eau contenue dans une semence comme un pourcentage du poids total de la semence avant déshydratation, connu sur la base du poids humide (ph) ou du poids frais (International Seed-Testing Association [ISTA] 2005).

$$\text{THS (\% pf)} = \frac{\text{poids humide} - \text{poids sec}}{\text{poids humide}} \times 100$$

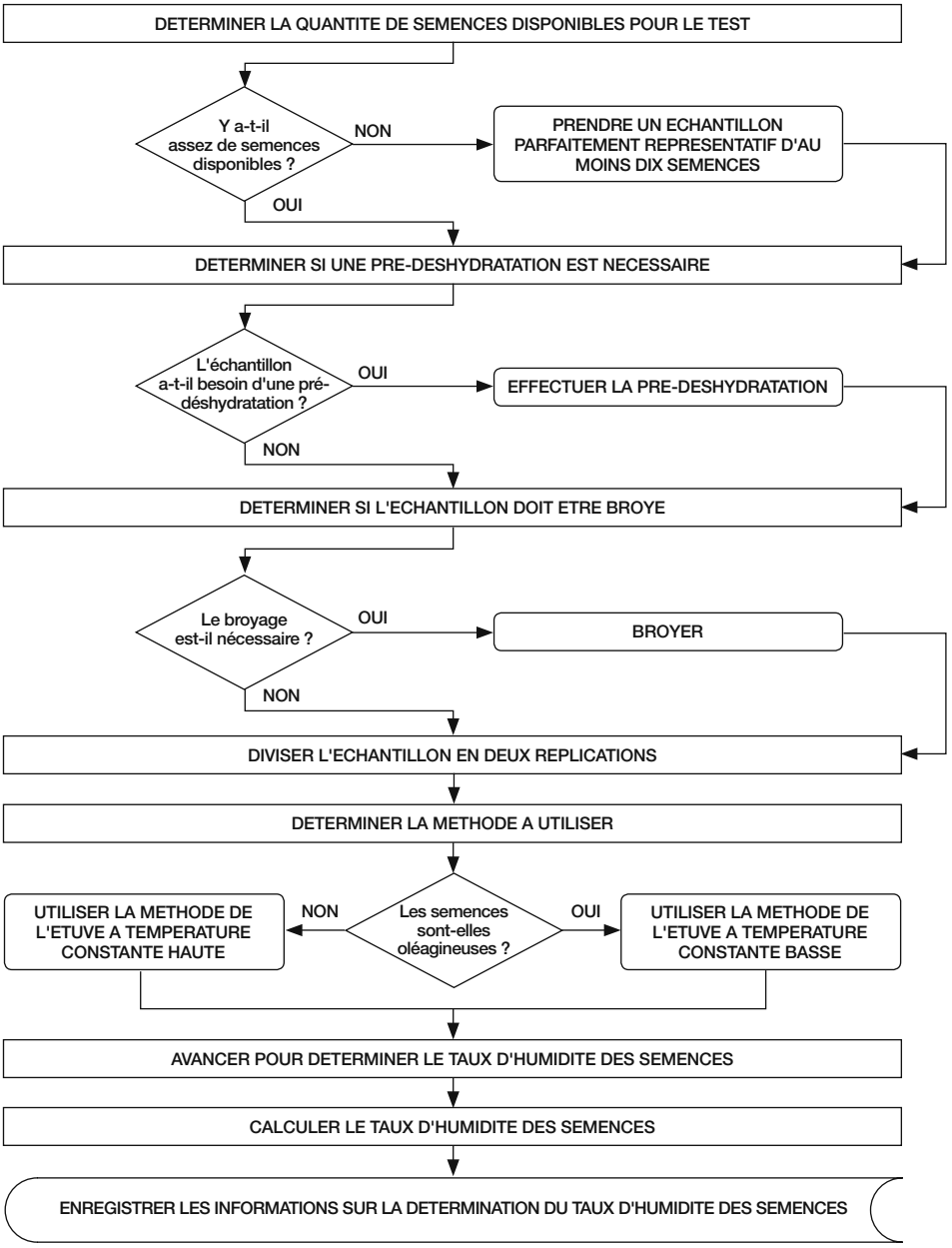
Le taux d'humidité peut également être exprimé sur la base du poids sec (ps) — c'est-à-dire la perte de poids en pourcentage du poids sec des semences.

$$\text{THS (\% ps)} = \frac{\text{poids humide} - \text{poids sec}}{\text{poids sec}} \times 100$$

### Pourquoi est-il important de déterminer le taux d'humidité des semences ?

Le taux d'humidité est le facteur le plus important qui détermine la vitesse à laquelle les semences se détériorent et il a des impacts importants sur la longévité des semences pendant leur stockage dans les banques de gènes. Même de faibles changements du taux d'humidité ont des effets importants sur la vie en stockage. Il est important de déterminer le taux d'humidité avant le stockage pour prédire de manière précise la vie potentielle pendant le stockage de chaque accession.

**Diagramme de flux 4.1.** Détermination du taux d'humidité des semences.



## Détermination du taux d'humidité des semences

Le taux d'humidité des semences peut être déterminé par deux méthodes différentes (voir Diagramme de flux 4.1) :

- la méthode de déshydratation à l'étuve, décrite par l'ISTA (2005) ;
- des humidimètres.

Dans les banques de gènes, le taux d'humidité est généralement exprimé par rapport au poids frais.

### Méthode de déshydratation à l'étuve

La méthode la plus précise pour déterminer le taux d'humidité est la déshydratation à l'étuve, dans laquelle l'eau est extraite des semences par la chaleur dans des conditions contrôlées. Cette méthode est destructrice pour les semences et doit être employée seulement lorsqu'elle est essentielle. Il est recommandé de conduire une détermination précise en utilisant cette méthode après la période de déshydratation, pour déterminer le taux d'humidité initial des semences stockées.

L'ISTA (2005) a prescrit deux différentes méthodes de déshydratation à l'étuve pour déterminer le taux d'humidité, selon la composition chimique des semences :

- la méthode à température basse constante pour les semences oléagineuses ;
- la méthode à température haute constante pour les semences non oléagineuses.

La méthode recommandée pour déshydrater les espèces cultivées et fourragères importantes est donnée dans le Tableau 4.1.

#### Pré-déshydratation

La pré-déshydratation est obligatoire si les semences sont humides et si l'on suppose que leur taux d'humidité est supérieur à 17% (10% pour le soja et 13% pour le riz) ; il doit être réalisé avant la détermination du taux d'humidité par déshydratation à l'étuve. Si une pré-déshydratation est nécessaire, procéder comme suit :

1. Peser deux sous-échantillons de 4–5 g de semences dans leurs conteneurs.
2. Pré-déshydrater les échantillons une nuit dans un endroit chaud et sec comme une paillasse de laboratoire.
3. Les peser de nouveau dans leurs conteneurs et déterminer la perte de poids (perte d'humidité) par soustraction.
4. Calculer le taux d'humidité par rapport au poids frais.

#### Equipement

L'équipement suivant est nécessaire pour déterminer le taux d'humidité par déshydratation à l'étuve :

- Une étuve à convection mécanique (courant d'air forcé) avec un temps de rétablissement de 15 minutes ou moins, capable

de maintenir la température requise dans un intervalle d'1°C et équipée avec un thermomètre précis à 0,5°C ;
- Des conteneurs de déshydratation non corrosifs (en métal ou en verre) avec des couvercles bien ajustés — la taille d'un conteneur doit permettre à la hauteur de l'échantillon réparti uniformément d'être inférieure à 0,3 g $cm^{-2}$ ;
- Un broyeur à vitesse réglable pour obtenir des particules de tailles spécifiées (0,5–0,4 mm) — il ne doit pas produire de chaleur non désirée lorsqu'il broie ;
- Une balance analytique capable de peser à 3–4 décimales (0,001–0,0001 g) ;
- Un dessiccateur équipé à l'intérieur avec une plaque épaisse de métal ou de céramique pour permettre le refroidissement rapide des conteneurs, et contenant dans son fond un agent dessiccant tel que du silicagel ou du chlorure de calcium.
- Des tenailles ou des gants pour manipuler des conteneurs chauds.

**Tableau 4.1.** Méthode de détermination du taux d'humidité pour des espèces cultivées et fourragères importantes (source : ISTA, 2005).

| | | |
|---|---|---|
| **Méthode de l'étuve à température basse constante** | | |
| Crucifères | Caméline (*Camelina*) | Sésame (*Sesamum*) |
| Ricin (*Ricinus*)* | Lin (*Linum*) | Soja (*Glycine*)* |
| Poivrier (*Capsicum*) | Arachide (*Arachis*)* | Toutes les espèces d'arbres |
| Cotonnier (*Gossypium*)* | Oignon (*Allium*) | |
| Aubergine (*Solanum*) | Radis (*Raphanus*) | |
| **Méthode de l'étuve à température haute constante** | | |
| Luzerne (*Medicago*) | Dactyle (*Dactylis*) | Seigle (*Secale*)* |
| Asperge (*Asparagus*) | Cresson (*Lepidium*) | Ivraie (*Lolium*) |
| Orge (*Hordeum*)* | Crételle (*Cynosurus*) | Sainfoin (*Onobrychis*) |
| Haricot (*Phaseolus*)* | Concombre (*Cucumis*) | Serradelle (*Ornithopus*) |
| Betterave (*Beta*) | Cumin (*Cuminum*) | Sorgho (*Sorghum*)* |
| Agrostide (*Agrostis*) | Herbe de Dallis (*Paspalum*) | Courge (*Cucurbita*) |
| Herbe des Bermudes (*Cynodon*) | Festuque (*Festuca*) | Mélilot (*Melilotus*) |
| Scorsonère (*Scorzonera*) | Vulpin (*Alopecurus*) | Fenasse (*Arrhenatherum*) |
| Pâturin (*Poa*) | Laitue (*Lactuca*) | Phléole (*Phleum*) |
| Brome (*Bromus*) | Lupin (*Lupinus*)* | Tomate (*Lycopersicon*) |
| Sarrasin (*Fagopyrum*)* | Maïs (*Zea*)* | Lotier (*Lotus*) |
| Fromenteau (*Phalaris*) | Millet (*Panicum*) | Canche cespiteuse |
| Carvi (*Carum*) | Avoine (*Avena*)* | (*Deschampsia*) |
| Carotte (*Daucus*) | Persil (*Petroselinum*) | Houlque (*Holcus*) |
| Cerfeuil (*Anthriscus*) | Pois (*Pisum*)* | Vesce (*Vicia*)* |
| Chicorée (*Cichorium*) | Herbe de Rhodes (*Chloris*) | Pastèque (*Citrullus*)* |
| Pois-chiche (*Cicer*)* | Riz (*Oryza*)* | Blé (*Triticum*)* |
| Trèfle (*Trifolium*) | | |

*broyage nécessaire

### Taille des échantillons et échantillonnage

La méthode de déshydratation à l'étuve est destructrice et, du fait que la quantité de semences est limitée dans la plupart des banques de gènes, des échantillons de poids réduit doivent être utilisés.

1. Utiliser deux réplications de 0,5–1,0 g de semences ou un minimum de dix semences pour déterminer le taux d'humidité, selon la disponibilité.
2. L'échantillon doit être représentatif de l'accession entière. S'assurer que le lot de semences est bien mélangé et que l'échantillon est prélevé dans de petites portions ayant des positions différentes dans le lot de semences.
3. Une fois l'échantillonnage réalisé, garder les semences dans des conteneurs étanches jusqu'à ce qu'elles soient testées, pour éviter les changements de taux d'humidité.

Souvenez-vous que si l'échantillon provient du stockage au froid, de l'eau risque de se condenser sur les semences. Lors de l'échantillonnage, n'ouvrez pas les conteneurs avant qu'ils aient atteint la température ambiante.

### Broyage

Certaines semences doivent être broyées en petites particules pour permettre un séchage uniforme et complet. Une liste des espèces qui nécessitent un broyage est donnée dans le Tableau 4.2.

- Si l'espèce n'est pas sur la liste, mais que ses semences sont plus grandes que des semences de blé, il faut les broyer.
- Si un broyage est nécessaire, broyer les semences en fragments inférieurs à 4 mm pour les semences de légumes et d'arbres, et à 0,5–1 mm pour les céréales avant de les peser.

## Détermination du taux d'humidité

### Méthode de température constante élevée pour les semences non oléagineuses

Le taux d'humidité est déterminé de la façon suivante :

1. Sécher les conteneurs à 130°C pendant une heure et les laisser refroidir dans le dessiccateur pendant une heure.
2. Marquer et peser chaque conteneur, y compris le couvercle, et enregistrer les poids sur la feuille de données présentée dans le Tableau 5.3 (colonne P1). Pour être précis lors de la détermination du taux d'humidité, la taille et le poids des récipients doivent être proportionnels au poids des échantillons utilisés.

**Tableau 4.2.** Espèces pour lesquelles le broyage est obligatoire (source : ISTA, 2005).

| | | |
|---|---|---|
| *Arachis hypogaea* | *Gossypium* spp. | *Pisum sativum* |
| *Avena* spp. | *Hordeum vulgare* | *Secale cereale* |
| *Cicer arietinum* | *Lathyrus* spp. | *Sorghum* spp. |
| *Citrullus lanatus* | *Lupinus* spp. | *Triticum* spp. |
| *Fagopyrum esculentum* | *Oryza sativa* | *Vicia* spp. |
| *Glycine max* | *Phaseolus* spp. | *Zea mays* |

La période de déshydratation commence quand l'étuve a atteint la température requise après que les échantillons aient été mis dans l'étuve et que la porte ait été fermée.

3. Placer deux sous-échantillons de 0,5–1,0 g, choisis au hasard dans chaque échantillon (pré-déshydratés et broyés si nécessaire) dans deux récipients séparés, qui serviront de deux réplications. Remettre les couvercles, peser de nouveau et enregistrer les poids dans le Tableau 4.3 (colonne P2).
4. Placer les récipients avec leurs couvercles enlevés dans une étuve maintenue à 130–133°C.
5. Déshydrater les semences pendant une à quatre heures, selon l'espèce (quatre heures pour *Zea mays*, deux heures pour les autres céréales et une heure pour les autres espèces).
6. Replacer le couvercle sur chaque récipient à la fin de la période de déshydratation.
7. Transférer les conteneurs dans un dessiccateur et les laisser refroidir pendant 45 minutes.
8. Enregistrer le poids des conteneurs, y compris celui des échantillons, dans le Tableau 4.3 (colonne P3).
9. Calculer le taux d'humidité par rapport au poids humide et l'exprimer en pourcentage à une décimale, en utilisant la formule suivante :

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = \frac{P2 - P3}{P2 - P1} \times 100$$ dans laquelle

P1 = poids d'un récipient avec son couvercle ;
P2 = poids d'un récipient avec son couvercle et l'échantillon avant déshydratation ;
P3 = poids d'un récipient avec son couvercle et l'échantillon après déshydratation.

**Tableau 4.3**. Enregistrement et calcul du taux d'humidité des semences.

| N° accession | Réplication/ N° conteneur | Poids du conteneur vide avec couvercle (g) | Poids du conteneur avec couvercle + semences avant déshydratation (g) | Poids du conteneur avec couvercle + semences après déshydratation (g) | Taux d'humidité % (par rapport au poids frais) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | P1 | P2 | P3 | (P2-P3)/ (P2-P1) × 100 | Moyenne (R I + R II)/2 |
| | R I | | | | | |
| | R II | | | | | |
| | R I | | | | | |
| | R II | | | | | |
| | R I | | | | | |
| | R II | | | | | |
| | R I | | | | | |
| | R II | | | | | |

10. Répéter le test si le taux d'humidité entre les deux réplications varie de plus de 0,2%.

**Exemple :**

| Accession no. | Réplication / N° conteneur | Poids d'un conteneur vide avec couvercie (g) (P1) | Poids d'un conteneur avec couvercie + semences avant déshydratation (g) (P2) | Poids d'un conteneur avec couvercie + semences après déshydratation (g) (P2) |
|---|---|---|---|---|
| | R 1 | 10,3245 | 14,8668 | 14,4356 |
| | R 2 | 10,1442 | 14,9948 | 14,5365 |

***Calcul :***

Rép 1 :

$$\% \text{ taux d'humidité} = \frac{14{,}8668-14{,}4356}{14{,}8668-10{,}3245} \times 100 = 9{,}49$$

Rép 2 :

$$\% \text{ taux d'humidité} = \frac{14{,}9948-14{,}5365}{14{,}9948-10{,}1442} \times 100 = 9{,}45$$

$$\text{Taux d'humidité (par rapport au poids frais)} = \frac{9{,}47+9{,}45}{2} = 9{,}46\%$$

Si les échantillons ont été pré-déshydratés, utiliser la formule suivante pour déterminer le taux d'humidité final :

$$\text{Taux d'humidité final (\%)} = (M1+ M2) - \frac{(M1 \times M2)}{100} \text{ dans laquelle}$$

M1 = taux d'humidité (%) à la première étape de déshydratation (pré-déshydratation)
M2 = taux d'humidité (%) à la deuxième étape de déshydratation (déshydratation à l'étuve)

**Méthode à température constante basse pour les semences oléagineuses**

Pour les semences oléagineuses, utiliser une température plus basse pendant une durée plus longue, afin que seule l'eau soit perdue par les semences. Suivre la procédure décrite ci-dessus, sauf pour les étapes 4 et 5, qui doivent être modifiées comme suit :

1. Placer les récipients avec leurs couvercles enlevés dans une étuve maintenue à 103 ± 2ºC.
2. Déshydrater les semences pendant 17±1 heures.

L'utilisation d'une température plus élevée et d'une durée de déshydratation plus longue que la normale va conduire à la perte de composés volatils et d'eau, particulièrement chez les semences oléagineuses. Cela conduira à une surestimation du taux d'humidité.

Pendant la détermination du taux d'humidité, l'exposition des échantillons à l'environnement du laboratoire doit être réduite au minimum.

### Balances dessiccateurs

Les balances dessiccateurs combinent un chauffage dernier cri avec une pesée extrêmement précise pour une méthode rapide et précise de l'analyse de la teneur en humidité. En utilisant le principe de la perte de poids au cours de la déshydratation — le standard pour la mesure de l'humidité — la balance pèse automatiquement un échantillon, le déshydrate, mesure la perte de poids due à la déshydratation et calcule le taux d'humidité des semences. L'analyse se termine automatiquement quand la déshydratation est complète et que le poids sec est stable, ou après un certain temps spécifié par l'opérateur. Le résultat final est affiché sur l'écran digital.

Le désavantage majeur des méthodes de déshydratation à l'étuve et avec une balance dessiccateur, particulièrement lorsque l'on a affaire à des accessions contenant un nombre limité de semences, est que les semences sont tuées aux températures utilisées pour la déshydratation ; ces méthodes demandent également beaucoup de temps. Plusieurs banques de gènes utilisent des méthodes rapides et non-destructrices pour contourner ces problèmes, bien que certaines de ces méthodes soient moins précises que la méthode de déshydratation à l'étuve.

## Méthodes non destructrices pour la détermination du taux d'humidité

### *Humidimètres rapides*

Le taux d'humidité des semences peut également être déterminé en utilisant des humidimètres rapides. Toute une variété d'humidimètres rapides est disponible. Ils mesurent les propriétés électriques de l'humidité des semences, soit par conductivité[5] ou capacité.[6] Il est important de noter que ces appareils doivent être calibrés en utilisant la méthode standard de déshydratation à l'étuve pour chaque plante testée, et qu'ils sont plus précis pour des taux d'humidité compris dans une gamme donnée (6–25%), selon le type d'humidimètre utilisé. Ils sont moins fiables au dessus et au dessous de cette gamme. Il est recommandé de n'utiliser les humidimètres que pour une mesure grossière du taux d'humidité avant la déshydratation.

### *Calibration des humidimètres rapides*

La relation exacte entre la lecture d'un humidimètre et le taux d'humidité réel, comme il est déterminé avec la méthode de l'étuve de l'ISTA, est appelée calibration. La calibration doit être basée sur

[5] La conductivité est une mesure de la résistance électrique des semences.

[6] La capacité est une mesure du pouvoir des semences à stocker une charge électrique.

de nombreux échantillons de variétés, régions et années différentes, et doit inclure la gamme de taux d'humidité normalement rencontrés avec l'espèce en question (6–25%). Les courbes de calibration sont établies en traçant les lectures faites à l'humidimètre avec celles obtenues avec la méthode de déshydratation à l'étuve. Une fois que la courbe de calibration est établie, chaque lecture peut facilement être convertie en taux d'humidité exact.

Pour déterminer le taux d'humidité en utilisant un humidimètre calibré, procéder comme suit :

1. Prendre deux échantillons choisis au hasard dans le lot de semences, qui ont le poids et le volume requis pour l'humidimètre utilisé.
2. Placer l'échantillon dans la chambre de mesure et enregistrer la valeur.
3. Le taux d'humidité (en pourcentage du poids) est égal à la moyenne des valeurs des deux échantillons testés.

***Senseurs d'humidité digitaux***

De nombreuses banques de gènes utilisent aujourd'hui des senseurs d'humidité digitaux pour la détermination du taux d'humidité (voir la Figure 3.1.3). Ces méthodes sont basées sur le fait que les semences gagnent ou perdent rapidement de l'humidité en fonction de leur environnement. Des semences humides dans un air sec perdent de l'humidité ; des semences sèches dans un air humide gagnent de l'humidité. Après une durée suffisante, il n'y a plus de mouvement d'humidité entre les semences et l'air ; à ce point, on dit que les semences sont à l'équilibre.

Les senseurs d'humidité digitaux mesurent la quantité de vapeur d'eau dans l'air à l'équilibre avec un échantillon de semences enfermé dans une chambre étanche. La valeur est généralement exprimée en humidité relative à l'équilibre (HRe), et peut être reliée au taux d'humidité conventionnel en utilisant une courbe de calibration développée en utilisant la procédure ci-dessus.

## Lectures complémentaires

Ellis, R.H., Hong, T.D. et Roberts, E.H. 1985. Handbook of Seed Technology for Genebanks. Volume 1. Principles and methodology. IBPGR, Rome, Italie.

ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edition 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Suisse.

Probert, R.J., Manger, K.R. et Adams, J. 2003. Non-destructive measurement of seed moisture. Pp. 367–387 in Seed conservation: Turning science into practice. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard and R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, GB.

## 4.2 Déshydratation des semences

### Qu'est-ce que la déshydratation des semences ?

La déshydratation des semences est la réduction du taux d'humidité des semences jusqu'à des niveaux recommandés pour leur stockage, en utilisant des techniques qui n'affectent pas la viabilité des semences (voir Diagramme de flux 4.2).

### Pourquoi déshydrate-t-on les semences ?

Des semences fraîchement récoltées peuvent avoir un taux d'humidité élevé, qui stimule la respiration et la croissance des embryons des graines, des insectes et des champignons. Les semences doivent donc être déshydratées jusqu'à un taux d'humidité suffisant pour empêcher les dommages, le réchauffement et les infestations au cours du stockage.

### Quand déshydrate-t-on les semences ?

La déshydratation d'un échantillon de semences doit commencer le plus tôt possible après leur réception pour éviter la détérioration. Il est important de s'assurer que les semences ne sont pas laissées dans des remises, des magasins ou des corridors, mais qu'elles sont placées dans un environnement bien aéré et frais (avec une humidité relative basse), dès leur arrivée dans la banque de gènes. Dans une pièce ayant une humidité relative élevée, un appareil mécanique pour diminuer l'humidité (déshumidificateur) peut être nécessaire.

### Jusqu'à quel taux d'humidité les semences doivent-elles être déshydratées ?

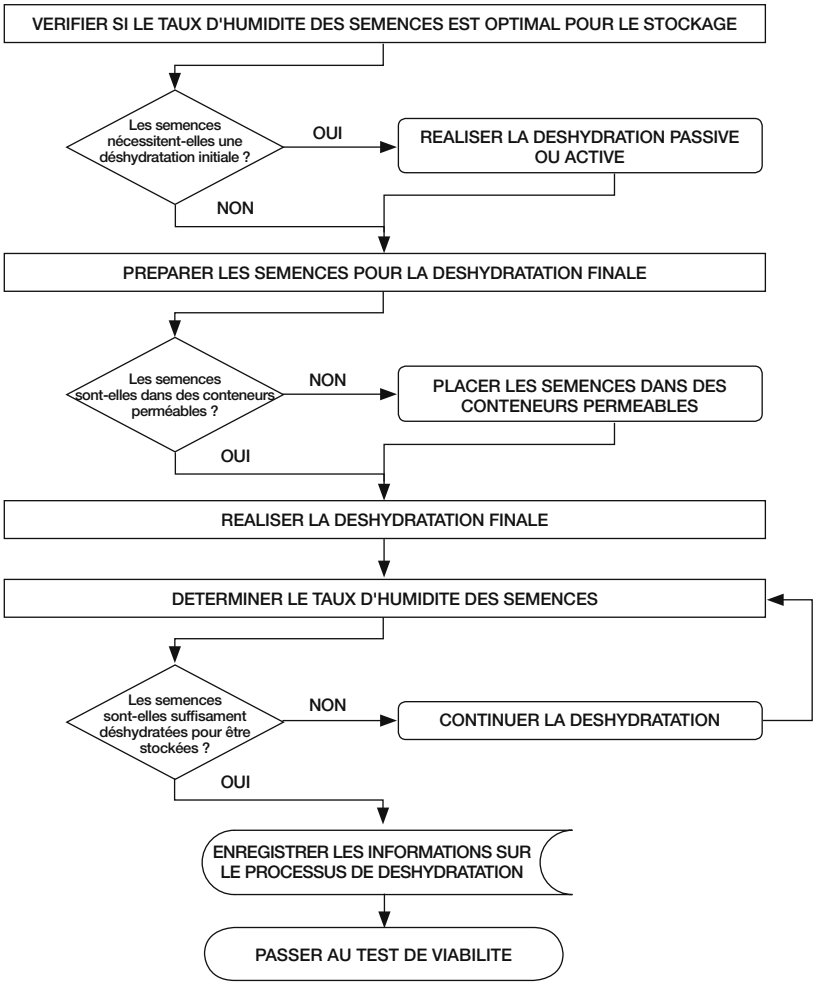
Le taux d'humidité optimal pour le stockage dépend de l'espèce et de la durée de stockage prévue. Il est important d'adopter un régime de déshydratation approprié, dans lequel l'humidité relative et la température de l'air qui déshydrate sont régulées pour atteindre le taux d'humidité visé.

- Le taux d'humidité des semences qui vont être stockées dans une collection de base (voir glossaire) doit être compris entre 3% et 7%, selon l'espèce.[7]

[7] Pour les collections de base, des taux d'humidité des semences à l'équilibre à une humidité relative de 10-15% sont recommandés pour déshydrater les semences (voir *déshydratation déshumidifiée* dans cette section). Le taux d'humidité des semences à l'équilibre dépend de la teneur en lipides – les semences avec une teneur élevée en huile auront un taux d'humidité plus bas que les semences amylacées à la même humidité relative, puisque le volume d'huile dans la semence exclut l'eau (voir Tableau 4.4). Si le contenu en huile ($D_0$) est connu, Cromarty et al. (1992) proposent une équation pour estimer le taux d'humidité des semences à l'équilibre ($M_e$, par rapport au poids sec) à une humidité relative donnée ($R$ en décimales) et à une température donnée ($T$ en °C).

$$M_e = \frac{(1-D_0) \times \sqrt{(-440 \times \ln (1-R))}}{1{,}1+(T/90)}$$

**Diagramme de flux 4.2.** Déshydratation des semences.




- Le taux d'humidité des semences qui vont être stockées dans une collection active (voir glossaire) doit être compris entre 3% et 8% pour les semences ayant de mauvaises caractéristiques de stockage (telles que les semences oléagineuses) et entre 7% et 11% pour les semences ayant de bonnes caractéristiques de stockage (comme les céréales, selon la température utilisée pour le stockage). (Pour de plus amples informations, voir le Tableau 6.2 au Chapitre 6).

### Taux d'humidité critique

Le taux d'humidité critique est le niveau au dessous duquel une réduction supplémentaire du taux d'humidité n'augmente plus la longévité des semences stockées hermétiquement. Ellis, Hong et Roberts, en ayant travaillé depuis 1988 avec plus de 25 plantes cultivées, ont trouvé que le stockage hermétique au taux d'humidité critique assure la longévité maximale des semences à une température de stockage donnée. Les valeurs du taux d'humidité critique varient selon l'espèce, d'environ 6% pour le pois (*Pisum sativum*) et le haricot mungo (*Vigna radiata*), qui sont riches en protéines, à 4,5–5,0% pour des céréales comme le riz, le blé et l'orge, qui sont riches en amidon. Pour les espèces à semences oléagineuses, les valeurs du taux d'humidité critique sont plus basses: 3,3% pour le soja (*Glycine max*); 2,7% pour le lin (*Linum usitatissimum*); 2,4% pour le niger (*Guizotia abyssinica*) et 2% pour l'arachide (*Arachis hypogae*a) et le tournesol (*Helianthus annuus*). Ces valeurs ont été déterminées en stockant les semences à 65°C, après équilibrage à 10–11% d'humidité relative (HR) à 20°C. Cependant, il a été rapporté que les taux d'humidité critiques sont affectés par les températures et il faut être prudent lorsque l'on extrapole des données d'études de vieillissement accéléré par rapport aux conditions de stockage réelles, parce que les conditions thermodynamiques des deux environnements peuvent être assez différentes (voir Vertucci et Roos, 1993). Pour des informations plus spécifiques sur le taux d'humidité critique pour différentes espèces, voir Ellis (1998), Ellis *et al*. (1989, 1990 et 1996) et Walters (1998 et 2003). Des dommages physiques et la rupture de l'enveloppe des graines peuvent être causés par une déshydratation des semences trop rapide ou trop poussée chez quelques espèces telles que l'arachide, le soja, le pois-chiche et *Sterculia foetida*. Pour éviter ce type de dégâts, les semences des espèces sensibles doivent être déshydratées avec précautions de manière progressive, avec une déshydratation initiale lente à une humidité relative légèrement plus élevée, suivie par une deuxième étape de déshydratation.

## Principes de la déshydratation des semences

Les semences sont hygroscopiques et absorbent ou relarguent de l'humidité selon l'humidité relative de l'air ambiant et le gradient de potentiel hydrique entre la semence et l'air environnant. Si la pression de vapeur de l'eau de la semence est plus grande que celle de l'air environnant, la semence va perdre de l'humidité et devenir plus sèche (désorption). Si la pression de vapeur de l'eau de la semence est plus basse que celle de l'air environnant, la semence va gagner de l'humidité par absorption. L'absorption ou la désorption se produisent jusqu'à ce que la pression de vapeur d'eau dans la semence et l'air environnant soient en équilibre.

## Taux d'humidité à l'équilibre et isothermes d'humidité

La teneur en eau des semences à l'équilibre avec l'humidité relative de l'air environnant est appelée taux d'humidité à l'équilibre. La compréhension de la relation entre le taux d'humidité des semences à l'équilibre et l'humidité relative est importante pour déterminer les régimes appropriés de déshydratation pour les semences.

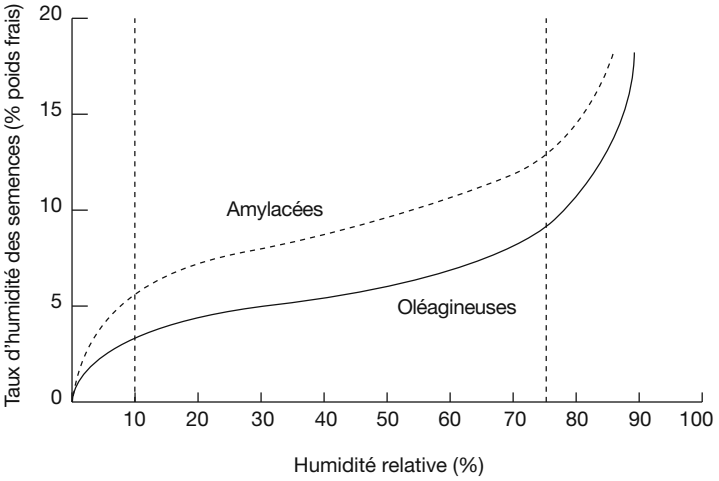
Pour une espèce donnée, il existe une relation identifiable entre l'humidité relative et le taux d'humidité des semences (voir Tableau 4.4). Les semences vont perdre ou absorber de l'eau jusqu'à ce que leur taux d'humidité soit en équilibre avec l'HR de l'air environnant à cette température. La relation entre le taux d'humidité des semences et l'humidité relative est exprimée par un isotherme

**Tableau 4.4.** Taux d'humidité à l'équilibre (approximatifs) de certaines espèces cultivées communes à 25°C.

| Espèce | HR (%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10 | 15 | 20 | 30 | 45 | 60 | 75 | 90 |
| Arachide | - | 6,0 | | 8,4 | 10,0 | 12,1 | 14,4 | 19,5 |
| Aubergine | 4,6 | - | 6,6 | 7,7 | 9,2 | 11,0 | 13,8 | - |
| Avoine | 2,1 | - | 4,0 | 5,8 | 7,6 | 9,4 | 11,2 | |
| Betterave | - | 6,7 | - | 9,1 | 10,8 | 12,7 | 15,0 | 19,1 |
| Blé | 2,9 | | 4,6 | 5,4 | 6,4 | 7,6 | 9,6 | - |
| Carotte | 4,5 | - | 5,9 | 6,8 | 7,9 | 9,2 | 11,6 | - |
| Chou | 2,6 | - | 4,3 | 5,6 | 7,1 | 8,4 | 10,1 | - |
| Concombre | 3,1 | - | 4,9 | 6,3 | 8,0 | 9,8 | 11,9 | - |
| Gombo | 3,3 | - | 4,9 | 5,6 | 6,3 | 7,9 | 10,0 | 15,2 |
| Haricot de Lima | 3,0 | - | 3,9 | 4,2 | 5,6 | - | 9,8 | 13,0 |
| Laitue | 2,8 | - | 4,2 | 5,1 | 5,9 | 7,1 | 9,6 | - |
| Lin | 3,8 | - | 5,8 | 8,4 | 10,2 | 12,7 | 14,4 | 18,8 |
| Maïs | 1,8 | - | 3,2 | 4,6 | 6,3 | 7,8 | 9,4 | - |
| Moutarde | - | 5,7 | - | 8,0 | 9,6 | 11,8 | 13,8 | 18,5 |
| Navet | 3,8 | - | 7,2 | 8,3 | 10,0 | 11,2 | 13,1 | - |
| Oignon | 4,6 | - | 6,8 | 8,0 | 9,5 | 11,2 | 13,4 | - |
| Orge | 2,6 | - | 3,8 | 5,1 | 6,8 | 8,3 | 10,2 | - |
| Pastèque | 5,4 | - | 7,3 | 8,6 | 10,1 | 11,9 | 15,0 | - |
| Pois | 4,6 | 5,6 | 6,5 | 7,9 | 9,8 | 11,8 | 14,0 | 17,6 |
| Potiron | - | 7,0 | - | 8,7 | 10,5 | 12,2 | 14,8 | 20,6 |
| Radis | - | 6,4 | - | 8,6 | 10,5 | 12,0 | 15,2 | 18,8 |
| Riz | 4,1 | - | 5,5 | 6,5 | 7,4 | 9,3 | 13,1 | 18,8 |
| Sarrasin | 3,0 | - | 4,3 | 5,6 | 7,4 | 9,0 | 10,8 | - |
| Seigle | 3,2 | - | 5,0 | 6,3 | 7,8 | 9,2 | 11,1 | - |
| Soja | 2,6 | - | 4,0 | 5,1 | 6,3 | 7,4 | 9,0 | - |
| Sorgho | 3,0 | - | 4,8 | 6,1 | 7,6 | 8,8 | 9,0 | - |
| Tomate | 5,5 | - | 7,0 | 8,5 | 10,4 | 12,1 | 14,6 | 19,8 |

Compilé à partir de : Roberts, E.H. (ed.). 1972. Seed viability. Chapman and Hall, London; Harrington, J. F. 1972. Seed Biology, Vol III. Academic Press, New York: 145–245 et Justice O.L. et Bass L.N. 1978. Principles and practices of seed storage, Agriculture Handbook No. 506. USDA, Washington D.C., USA.

de sorption — c'est simplement un graphe représentant le taux d'humidité des semences par rapport au pourcentage d'humidité relative (voir Figure 4.1). Les isothermes d'humidité dépendent de la composition chimique des semences et diffèrent entre espèces et même entre semences de la même accession récoltées à des stades de développement différents. Les isothermes d'humidité sont très utiles pour estimer le taux d'humidité auquel les semences peuvent être déshydratées dans un environnement donné.




Source: Bradford, K.J. 2004. Seed storage and longevity. pp 76–84. In: Seed production and quality. UC Davis, Seed Biotechnology Center, USA.

**Figure 4.1.** Isotherme de taux d'humidité.

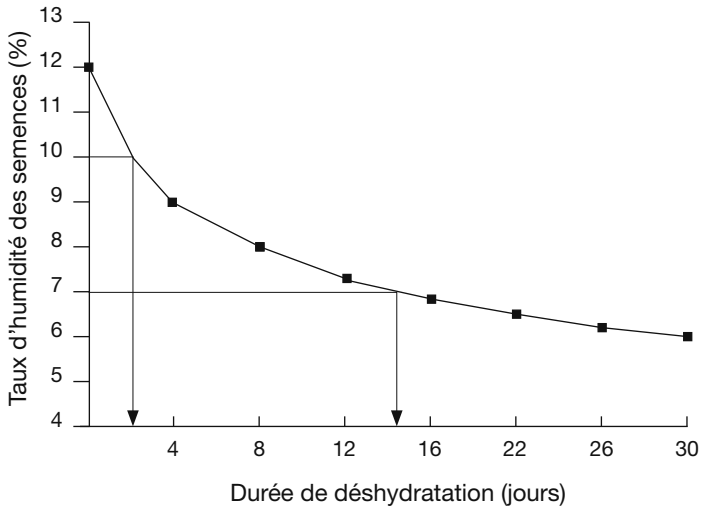
### Comment préparer des isothermes d'humidité

Les isothermes d'humidité peuvent être facilement construits en permettant aux semences d'atteindre l'équilibre dans des environnements ayant une HR connue, maintenue par des solutions saturées en sels à une température donnée. Les solutions saturées en sels ci-dessous produisent une série d'HR à 25°C :

| Sel | HR correspondante (%) |
|---|---|
| Hydroxyde de sodium | 7,5 |
| Chlorure de lithium | 13 |
| Chlorure de magnésium | 32 |
| Nitrate de magnésium | 54 |
| Nitrate d'ammonium | 65 |
| Chlorure de sodium | 75 |
| Chlorure de potassium | 85 |

Les solutions saturées en sels sont préparées en mélangeant le sel avec de l'eau pour former une suspension visqueuse.

1. Placer la suspension visqueuse dans le fonds d'un dessiccateur.
2. Placer un poids connu de semences dans des conteneurs en treillis métallique ou des sacs faits en moustiquaires et les placer sur la plaque du dessiccateur. Le mélange de sel ne doit pas venir au contact des semences.
3. Sceller le couvercle sur le dessiccateur.
4. Laisser suffisamment de temps pour que l'humidité des semences s'équilibre avec l'air environnant à l'intérieur du dessiccateur — cela peut prendre plusieurs semaines. Les semences vont soit absorber soit perdre de l'humidité, selon le gradient de pression de vapeur d'eau entre les semences et l'air environnant. Quand le poids des semences reste inchangé, le taux d'humidité à l'équilibre est atteint.
5. Déterminer le taux d'humidité des semences à l'équilibre à chaque HR en déshydratant à l'étuve, comme décrit dans la section précédente. Marquer le taux d'humidité des semences à l'équilibre sur l'axe des Y d'un graphe et l'HR des solutions de sels respectives sur l'axe des X, comme indiqué sur la Figure 4.2.




Exemple : des semences reçues à la banque de gènes ont un taux d'humidité initial d'environ 10% et doivent être déshydratées à 7% pour le stockage. Sur le graphe ci-dessus, les lignes allant de la courbe à l'axe des X indiquent approximativement deux et 15 jours. La différence entre les deux valeurs (15 – 2 = 13 jours) est le temps requis pour déshydrater les semences d'un taux d'humidité de 10% à un taux d'humidité de 7%.

**Figure 4.2.** Prédiction du temps de déshydratation.

### Evaluation de la sensibilité à la dessiccation

Tester la tolérance des semences à la dessiccation est un prérequis pour choisir le régime de déshydratation approprié, si le comportement des semences à la dessiccation n'est pas encore connu. Les semences récalcitrantes ne peuvent pas survivre à la dessiccation en dessous de taux d'humidité comparativement hauts. La sensibilité à la dessiccation peut être évaluée en mesurant le pourcentage de germination à différents intervalles de déshydratation (voir Diagramme de flux 4.3).

- Les semences qui tolèrent la dessiccation (qui ne montrent pas de perte de viabilité) jusqu'à un taux d'humidité de 5% ou moins (valeurs en équilibre avec 10–15% HR à 20°C) ont de fortes probabilités de montrer un comportement orthodoxe au stockage.
- Les semences qui tolèrent la dessiccation jusqu'à un taux d'humidité de 10–12% (valeurs en équilibre avec une HR de 40–50% à 20°C), mais dont la viabilité diminue lorsqu'elles sont soumises à une dessiccation supplémentaire jusqu'à un taux d'humidité inférieur, ont une forte probabilité d'avoir un comportement intermédiaire au stockage.
- Les semences qui sont tuées par une dessiccation à un taux d'humidité de 15–20% (valeurs en équilibre avec une HR >70% à 20°C) ont de fortes probabilités d'être récalcitrantes.

*Des informations sur le comportement au stockage d'une large gamme d'espèces sont disponibles sur www.rbgkew.org.uk/data/sid. Une grande partie des informations incluses dans ce site Web provient du Compendium on Seed Storage Behaviour par Hong et al. (1996). Une version électronique de la base de données de ce compendium est également disponible en étant téléchargée depuis le site Web des publications de Bioversity : www.bioversityinternational.org/publications/index.asp.*

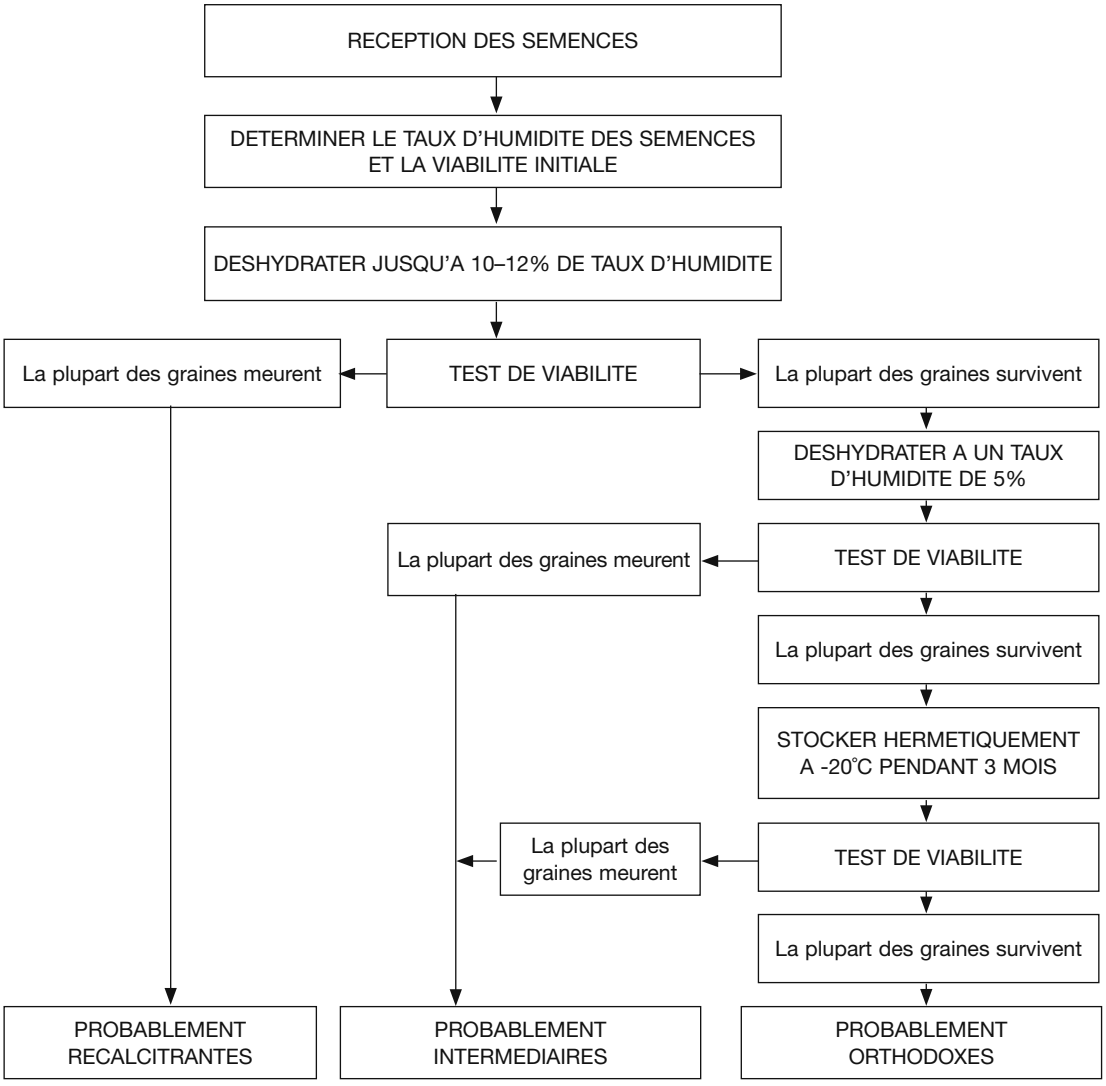
## Procédures de déshydratation des semences

### Etape 1 : Prédire le taux d'humidité et la durée de déshydratation

Evaluer la nécessité de la déshydratation en estimant le taux d'humidité des semences reçues à la banque de gènes. Une mesure rapide du taux d'humidité peut être effectuée en utiliser un humidimètre calibré, comme décrit dans la section 4.1.

- Si l'humidité est au dessus des limites pour le stockage en sécurité (3–7% pour la conservation, selon l'espèce), la déshydratation est nécessaire.

**Diagramme de flux 4.3.** Protocole de détermination du comportement au stockage des semences.




Source : Hong et Ellis (1996).

### Prédiction de la durée de déshydratation

La durée de la période de déshydratation peut être prédite en utilisant l'une ou l'autre des méthodes décrites ci-dessous. Si la banque de gènes n'a pas d'expérience préalable de la déshydratation des semences d'une espèce particulière, il peut être nécessaire de faire des essais, afin de prédire la durée de déshydratation appropriée.

***Prédiction de la durée de déshydratation par perte de poids***

1. Déterminer le taux d'humidité de l'échantillon de semences en utilisant les méthodes décrites dans la section 4.1.
2. Peser l'échantillon de semences qui requiert une déshydratation.
3. Calculer le poids des semences au taux d'humidité requis en utilisant l'équation :

$$\text{Poids final des semences} = \text{poids initial des semences} \times \frac{(100 - \text{taux d'humidité initial})}{(100 - \text{taux d'humidité visé})}$$

**Exemple :**

Poids initial des semences = 250 g
Taux d'humidité initial = 12%
Taux d'humidité visé en fin de déshydratation = 8%
Poids final des semences au taux d'humidité de 8% =

$$250 \times \frac{(100 - 12)}{(100 - 8)} = 239 \text{ g}$$

4. Garder l'échantillon dans un tissu en mousseline ou un sac en mailles de nylon et lui permettre de se déshydrater, en pesant périodiquement l'échantillon, jusqu'à ce que le poids requis soit atteint.

***Prédiction de la durée de déshydratation à partir de courbes moyennes de déshydratation***

En général, les semences se déshydratent selon un mode exponentiel jusqu'à ce que le taux d'humidité à l'équilibre soit atteint. La vitesse de déshydratation de différents lots de semences de la même espèce sera plus ou moins égale dans les mêmes conditions d'environnement. Les courbes de déshydratation peuvent donc être utilisées pour prédire la durée de déshydratation de tous les lots de semences d'une espèce donnée dans des conditions données. Ceci évite des vérifications fréquentes du taux d'humidité des semences pendant la déshydratation et limite la consommation de semences.

**Comment préparer des courbes de déshydratation moyennes**

1. Collecter 250–500g de semences de chacune des 3–5 accessions (qui ont des caractéristiques différentes, telles que la taille des semences, leur masse, leur forme, leur composition chimique) d'une espèce donnée. Utiliser des lots de semences avec des semences en excès ou ceux dont on se débarrasse à cause de leur faible viabilité.
2. Déterminer le taux d'humidité de chaque lot de semences en utilisant la méthode de déshydratation à l'étuve décrite précédemment.

3. Déshydrater les échantillons en utilisant la même méthode et les mêmes conditions que celles utilisées en pratique.
4. Mélanger les semences dans un conteneur et prélever chaque jour un petit échantillon pour déterminer le taux d'humidité.
5. Répéter chaque jour jusqu'à ce que plus aucun changement du taux d'humidité ne soit enregistré.
6. Reporter les données sur un graphe avec le taux d'humidité en pourcentage sur l'axe des Y et la durée de déshydratation sur l'axe des X.
7. Les changements du taux d'humidité en fonction du temps peuvent être décrits en faisant passer une courbe exponentielle (courbe moyenne de déshydratation) par l'ensemble des données.

La courbe moyenne de déshydratation peut être utilisée comme guide parce que les autres lots de semences de la même espèce doivent se déshydrater à la même vitesse. Ceci peut être répété avec les semences de toutes les espèces et leurs courbes de déshydratation peuvent être tracées pour différentes conditions.

**Utilisation des courbes moyennes de déshydratation pour prédire la durée de déshydratation**

1. Utiliser le graphe préparé pour les semences de l'espèce particulière qui est déshydratée.
2. Déterminer le taux d'humidité initial de l'échantillon par la méthode de déshydratation à l'étuve.
3. Sélectionner le taux d'humidité final qui est requis pour le stockage de cette espèce.
4. Tracer une ligne horizontale à partir des taux d'humidité initiaux et désirés sur l'axe vertical des Y traversant le courbe de déshydratation.
5. Noter sur l'axe des X le jour correspondant aux points d'intersection avec la courbe de déshydratation pour chacun des taux d'humidité.

La différence entre les deux points sur l'axe des X indique la durée de déshydratation requise pour atteindre le taux d'humidité désiré (voir Figure 4.2).

## Etape 2 : Préparer les semences pour la déshydratation

1. Il est préférable de placer les semences dans des sachets perméables[8] étiquetés pour chaque accession. Lorsque l'on

[8] Les sachets utilisés pour la déshydratation doivent être suffisamment perméables pour permettre à l'humidité de s'échapper aisément. Selon la taille des semences, des sachets en mousseline ou taillés dans une moustiquaire sont les mieux adaptés pour cet usage.

utilise des sachets, deux étiquettes doivent toujours suivre le lot de semences — l'une placée à l'extérieur du sachet et l'autre à l'intérieur avec les semences. Les étiquettes doivent être résistantes et écrites avec un feutre indélébile.
2. Ne pas conserver une grande quantité de semences dans un seul sachet. Séparer les accessions dans plusieurs sachets en couches fines, pour faciliter la déshydratation rapide.
3. Fermer les sachets comme il faut afin d'éviter que les semences ne s'échappent ou ne se mélangent.

### Etape 3 : Déshydratation des semences

Plusieurs méthodes sont disponibles pour déshydrater les semences. Les méthodes employées les plus communes et sûres sont la *déshydratation déshumidifiée* et la *déshydratation au silicagel*. D'autres méthodes comme la *déshydratation avec des solutions saturées en sel* peuvent aussi être utilisées.

Eviter d'utiliser des températures élevées pour la déshydratation, car elles réduisent la durée de vie des semences pendant le stockage.

Toutes ces méthodes reposent sur le fait de laisser les semences dans un environnement à HR basse et de laisser le taux d'humidité des semences atteindre l'équilibre à température relativement basse (10–25°C). Noter que les semences atteindront l'équilibre à des vitesses différentes selon l'espèce, la taille des semences et les conditions de déshydratation. La plupart des semences vont commencer par se déshydrater rapidement, puis la vitesse de déshydratation va diminuer au fur et à mesure que l'on s'approche d'un taux d'humidité bas.

Si le taux d'humidité des semences est trop élevé (>15%), il est recommandé de déshydrater les semences en deux étapes :
1. une déshydratation initiale pour réduire le taux d'humidité jusqu'à des niveaux sans danger afin d'éviter une dessiccation rapide et d'abîmer les semences fragiles (comme les dégâts dus au clivage chez le soja) (voir encadré 4.1 pour les options de déshydratation initiale) ;

---

**Encadré 4.1.** Options pour la déshydratation initiale.

- A l'extérieur, à l'ombre sur des étagères ouvertes en treillis métallique, si le climat s'y prête –
  - nécessite des mesures de contrôle supplémentaires contre les oiseaux, les insectes et la rosée
- Déshydratation passive dans une pièce avec une bonne ventilation et circulation de l'air –
  - non réalisable sous des climats chauds et humides sous les tropiques humides
- Déshydratation active sous ventilation forcée

2. une déshydratation finale jusqu'au taux d'humidité recommandé pour la conservation dans les banques de gènes.

**Déshydratation déshumidifiée**

Cette méthode comprend la déshydratation des semences dans un environnement où l'HR est gardée basse en utilisant des déshumidificateurs. Les standards pour les banques de gènes FAO/IPGRI (1994) recommandent une gamme de 10–15% HR et une température de 10–25°C pour déshydrater les semences. Pour des banques de gènes plus petites, des enceintes de déshydratation des semences conçues pour fournir ces conditions existent. Les banques de gènes plus grandes auront besoin de pièces modulaires de plein pied pour la déshydratation des semences. Le cabinet ou la salle de déshydratation doit avoir un mécanisme de sécurité pour réguler la température et empêcher la surchauffe en cas d'accident mécanique.

1. Placer les semences qui ont été empaquetées dans des sacs en tissu sur les étagères ouvertes de la salle de déshydratation ou de l'enceinte de déshydratation des semences. Bien s'assurer que les sacs de semences ne sont pas trop serrés et qu'il y a assez d'espace pour permettre une bonne circulation de l'air entre eux.
2. Laisser les semences dans la salle ou l'enceinte de déshydratation jusqu'à ce que le taux d'humidité soit dans la gamme requise pour le stockage. Si le taux d'humidité initial et le poids de l'échantillon sont connus, la longueur de la période de déshydratation peut être prédite en utilisant les courbes moyennes de déshydratation ou en mesurant la perte de poids comme décrit auparavant (voir étape 1).
3. Alternativement, prélever un sous-échantillon et déterminer si le taux d'humidité requis a été atteint ou non, en utilisant les méthodes décrites dans la section 4.1.

**Déshydratation au silicagel**

Les petits échantillons peuvent être déshydratés en utilisant du silicagel. La procédure pour déshydrater les semences en utilisant du silicagel bleu est expliquée ci-dessous.

1. Placer du silicagel bleu auto-indicateur[9] dans un dessiccateur ou un bocal en verre avec un couvercle étanche. Pour une déshydratation efficace, le poids du silicagel doit être égal

[9] Les utilisateurs du traditionnel silicagel bleu auto-indicateur sont sévèrement mis en garde contre les possibles effets cancérigènes du chlorure de cobalt, qui est utilisé comme indicateur. Le silicagel doit être manipulé sous hotte aspirante dès qu'il y a un risque de générer de la poussière. Les alternatives au silicagel bleu comme le silicagel auto-indicateur granuleux orange à incolore ou le silicagel enrobé (2-5 mm), qui produit moins de poussière, sont disponibles chez la plupart des fournisseurs de produits de laboratoire et doivent être utilisés lorsque c'est possible.

à celui des semences. Pour une déshydratation plus rapide, certaines banques de gènes utilisent un rapport silicagel: semences de 3:1.
2. Placer les semences dans des sacs perméables et les laisser à proximité du silicagel.
3. Garder le dessiccateur à une température fraîche (approximativement 20°C).
4. Changer le silicagel tous les jours ou lorsque la couleur change du bleu foncé au rose ou au bleu pâle.
5. Régénérer le silicagel en le chauffant à 100°C jusqu'à ce qu'il redevienne bleu foncé. Le laisser refroidir dans un conteneur étanche avant de le réutiliser.
6. Laisser les semences avec du silicagel frais dans le conteneur jusqu'à ce que le taux d'humidité des semences soit dans la gamme requise pour le stockage.
7. Empaqueter les semences dans des conteneurs appropriés une fois que le taux d'humidité recommandé ou le poids des semences à l'équilibre est atteint, et lorsque le niveau de germination et le taux de mortalité sont acceptables.

**Déshydratation au chlorure de calcium**

Les semences peuvent également être déshydratées en utilisant des granules de chlorure de calcium anhydre. Le chlorure de calcium est sans danger, non toxique et bon marché. On le trouve facilement dans les drogueries et on s'en débarrasse facilement en le vidant dans l'évier. La méthode de déshydratation est très similaire à celle employée avec le silicagel, mais le produit est jeté après déshydratation, ou il peut être réutilisé pour préparer des solutions saturées en sel.

1. Placer des granules de chlorure de calcium anhydre dans un dessiccateur ou un bocal en verre avec un couvercle étanche et un treillis métallique sur le produit. Fermer le conteneur pour éviter l'absorption de l'humidité de l'air.
2. Placer rapidement les semences dans des sacs perméables sur la plaque du dessiccateur ou le treillis métallique.
3. Laisser le dessiccateur à une température fraîche (environ 20°C).
4. Lorsque la couche supérieure du chlorure de calcium devient dure et brillante, le retourner de telle sorte que le fonds se retrouve sur le dessus. Une fois qu'il devient complètement dur, il peut être réutilisé pour préparer une solution saturée en sel, comme décrit plus bas.
5. Laisser les semences avec le chlorure de calcium dans le conteneur jusqu'à ce que le taux d'humidité des semences soit dans la gamme requise pour le stockage.

6. Emballer les semences dans des conteneurs appropriés une fois que le taux d'humidité recommandé ou le poids des semences à l'équilibre est atteint, et que la germination et l'état sanitaire des semences sont acceptables.

**Solutions saturées en sel**

Les semences peuvent être préparées pour le stockage en les déshydratant dans des conteneurs étanches au dessus de solutions saturées en sels minéraux, tels que le chlorure de calcium et le chlorure de lithium. Le chlorure de calcium maintient un HR de 30% à 25°C et peut être utilisé pour déshydrater les semences en vue de leur conservation à moyen terme. De manière similaire, le chlorure de lithium procure une HR de 13% et le bromure de calcium une HR de 18% à 20°C, et ils peuvent être utilisés pour la conservation à long terme. Des mélanges de chlorure de calcium et de chlorure de lithium peuvent également être utilisés pour atteindre des taux d'humidité des semences plus bas à moindre coût qu'avec du chlorure de lithium seul. L'HR exacte et le taux d'humidité visé doivent être déterminés pour le rapport spécifique des produits chimiques utilisés.

Pour préparer le mélange de sels :

1. Mélanger le sel à l'eau pour former une solution visqueuse.
2. Placer la solution visqueuse dans un dessiccateur ou un récipient ouvert et placer le récipient dans un conteneur étanche plus grand, qui sera utilisé pour déshydrater les semences.
3. Etaler les semences en une couche fine à l'intérieur de leur conteneur et le placer dans le dessiccateur ou dans le conteneur plus grand. Le mélange de sel ne doit pas venir au contact des semences. Fermer hermétiquement le couvercle du conteneur le plus grand qui contient les semences et la solution visqueuse.
4. Laisser suffisamment de temps pour permettre au taux d'humidité d'atteindre l'équilibre avec l'air à l'intérieur du récipient — cela peut prendre plusieurs semaines. Faire circuler l'air à l'intérieur du conteneur accélérera le processus de déshydratation.

**Autres méthodes peu onéreuses**

***Réfrigérateur à dégivrage automatique***

Si l'on ne dispose pas de sels minéraux, les semences peuvent être déshydratées en utilisant un réfrigérateur à dégivrage automatique.

L'action du dégivrage automatique va maintenir une HR basse à l'intérieur du réfrigérateur. Il est difficile de contrôler l'HR exacte, mais cette méthode est satisfaisante si de meilleurs moyens ne sont pas disponibles. L'HR varie entre 10–40% dans de nombreux réfrigérateurs, ce qui correspond à des taux d'humidité appropriés pour la conservation à moyen ou à long terme.

1. Etaler les semences en une couche fine dans un récipient ouvert.
2. Placer le récipient dans un réfrigérateur à dégivrage automatique et laisser les semences atteindre l'équilibre avec l'humidité à l'intérieur du réfrigérateur.
3. Bien fermer le récipient de déshydratation, le sortir du réfrigérateur et le laisser atteindre la température ambiante avant de l'ouvrir, pour éviter la condensation d'humidité sur les semences.
4. Sceller les semences dans des conteneurs étanches et les transférer en conditions de stockage.

***Déshydratation à l'ombre***

La déshydratation à l'ombre peut être un moyen efficace de réduire le taux d'humidité des semences dans des environnements dans lesquels l'HR est basse (inférieure à 40%) ; plus basse est l'humidité, plus efficace sera le processus de déshydratation. La déshydratation à l'ombre est particulièrement utile pour la déshydratation initiale. Ne pas déshydrater au soleil car on pense que cela affecte la viabilité à long terme des semences chez certaines espèces.

1. Etaler les semences en une seule couche sur un drap ou sur des claies métalliques placées à l'ombre, en s'assurant que l'air circule librement. Tout appareil qui peut augmenter le flux d'air sur les semences (comme un ventilateur) augmentera l'efficacité de la déshydratation.
2. Recouvrir les semences d'un filet protecteur pour empêcher la prédation par les animaux (oiseaux, rats, etc.).
3. La nuit, replier le drap et le conserver dans pièce fraîche.
4. Laisser suffisamment de temps pour que le taux d'humidité des semences atteigne l'équilibre avec l'HR ambiante — cela peut prendre plusieurs jours.

Dans les pays tropicaux qui ont une HR élevée, il est plus difficile et plus cher de maintenir une salle de déshydratation à une HR très basse. Une combinaison de méthodes incluant des technologies bon marché telles que la déshydratation au silicagel et les sels saturés peut être employée pour réduire efficacement le taux d'humidité des semences jusqu'à des niveaux acceptables.

## Documentation

Les descripteurs suivants peuvent être utilisés pour documenter les informations concernant la détermination du taux d'humidité et les procédures de déshydratation pour des accessions individuelles :

- Taux d'humidité des semences au moment de leur réception (%)
- Méthode utilisée pour la détermination de l'humidité
- Méthode et durée de la pré-déshydratation (si nécessaire)
- Méthode de déshydratation finale
- Durée de la déshydratation finale
- Taux d'humidité final après déshydratation (%)
- Date de la détermination du taux d'humidité final
- Poids de 100 ou 1000 graines (g)
- Poids sec total des semences (g)

### Lectures complémentaires

Cromarty, A. 1984. Techniques for Seed-drying. Pp. 88–125 in Seed management techniques for genebanks. (J.B. Dickie, S. Linington and J.T. Williams, eds.). Proceedings of a workshop held at the Royal Botanic Gardens, Kew, 6–9 July 1982. IBPGR, Rome, Italie.

Cromarty A. S., Ellis, R.H. et Roberts, E.H. 1982. The design of seed storage facilities for genetic conservation. IBPGR, Rome, Italie.

Ellis, R.H. 1998. Longevity of seeds stored hermetically at low moisture contents. Seed Science Research 8 (Suppl. 1): 9–10.

Ellis, R.H., Hong, T.D. et Roberts, E.H. 1989. A comparison of the low-moisture-content limit to the logarithmic relation between seed moisture content and longevity in twelve species. Annals of Botany 63: 601–611.

Ellis, R.H., Hong T.D., Roberts, R.H. et Tao, K.L. 1990. Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture. Annals of Botany 65: 493–504.

Ellis, R.H. Hong, T.D., Astley, D., Pinnegar, A.E. et Kraak, H.L. 1996. Survival of dry and ultra-dry seeds of carrot, groundnut, lettuce, oilseed rape, and onion during five years' hermetic storage at two temperatures. Seed Science and Technology 24: 347–358.

Ellis, R.H., Hong, T.D. et Roberts, E.H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Volume 1. Principles and methodology. IBPGR, Rome.

FAO/IPGRI, 1994. Genebank standards. FAO and IPGRI, Rome, Italie.

Hong, T.D. et Ellis, R.H. 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical bulletin No.1. IPGRI, Rome.

Hong, T.D., Linington, S.H. et Ellis, R.H. 1996. Seed storage behaviour: A compendium. Handbooks for Genebanks No. 4. IPGRI, Rome.

Linington, S. H. 2003. The design of seed banks. Pp. 591–636 in Seed conservation: Turning science into practice. (R.D. Smith,

J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard and R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, GB.

Probert, R.J. 2003. Seed viability under ambient conditions, and the importance of drying. Pp. 337–365 in Seed conservation: Turning science into practice. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard and R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, GB.

Vertucci, C.W. et Roos, E.E. 1993. Theoretical basis for seed storage II: The influence of temperature on optimal moisture levels. Seed Science Research 3: 201–203.

Walters, C. 1998. Ultra-dry technology: Perspective from the National Seed Storage Laboratory, USA. Science Research 8 (Suppl. 1): 11–14.

Walters, C. 2003. Principles of preserving germplasm in gene banks. Pp. 113–138. In: Strategies for survival. (E. Guerrant, K. Havens and M. Maunder, eds.). Island press, Covelo, CA, USA

1. Introduction
2. Acquisition et enregistrement du matériel génétique
   2.1 Acquisition du matériel génétique
   2.2 Enregistrement du matériel génétique
3. Nettoyage des semences
4. Détermination du taux d'humidité des semences et déshydratation
   4.1 Détermination du taux d'humidité
   4.2 Déshydratation des semences
5. Contrôle de la qualité des semences
   5.1 Test de la viabilité des semences
   5.2 Test de l'état sanitaire des semences
   5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes
6. Empaquetage et stockage des semences
   6.1 Empaquetage des semences
   6.2 Stockage des semences
7. Distribution du matériel génétique
8. Contrôle et régénération du matériel génétique
   8.1 Contrôle du matériel génétique
   8.2 Régénération du matériel génétique

# 5. TEST DE LA QUALITE DES SEMENCES

## 5.1 Test de la viabilité des semences

### Qu'est-ce que la viabilité des semences ?

La viabilité des semences est la mesure du nombre de semences dans un lot de semences qui sont vivantes et peuvent se développer en plantes qui vont se reproduire dans les conditions appropriées au champ.

### Pourquoi doit-on déterminer la viabilité des semences ?

Il est très important que les semences stockées dans une banque de gènes soient capables de produire des plantes lorsqu'elles sont semées au champ. Elles doivent avoir une viabilité élevée au début du stockage et la maintenir pendant le stockage. Les semences avec une viabilité initiale élevée survivront également plus longtemps au stockage. La viabilité des semences décline lentement au début, puis plus rapidement au fur et à mesure que les semences vieillissent. Il est important de savoir quand ce déclin se produit afin d'agir pour régénérer l'accession. Une détérioration excessive conduira à la perte du matériel.

### Quand faut-il déterminer la viabilité ?

La viabilité des accessions doit être déterminée :

- Avant que les semences soient empaquetées et placées dans la banque de gènes ;
- A intervalles réguliers pendant le stockage.

Le test de la viabilité peut prendre quelques jours à quelques semaines, selon l'espèce. Si possible, les résultats des tests de viabilité doivent être rendus disponibles avant que les semences ne soient empaquetées et placées dans la banque de gènes, afin que les semences de mauvaise qualité puissent être identifiées et régénérées.

En attendant les résultats des tests de viabilité, ou s'il y a un retard dans la mise en œuvre de ces

Le stockage de semences avec une viabilité initiale élevée va maximiser la longévité de l'accession. Le suivi de la viabilité au cours du stockage facilite l'identification opportune des accessions qui nécessitent une régénération pour assurer la disponibilité continue du matériel génétique conservé.

tests, les semences doivent être placées dans un environnement frais pour minimiser leur détérioration.

### Comment doit-on déterminer la viabilité ?

De nombreuses méthodes différentes existent pour tester la viabilité des semences. La méthode la plus précise et fiable est le test de germination. Il existe aussi des tests biochimiques, qui ont l'avantage d'être plus rapides, mais qui ne sont pas aussi précis que le test de germination. Ils demandent également des connaissances particulières pour être réalisés et interprétés. Ces tests ne sont généralement pas recommandés pour un usage général pour tester la viabilité des semences dans les banques de gènes.

### Qu'est-ce qu'un test de germination ?

Un test de germination est réalisé pour déterminer quelle proportion de semences dans une accession va germer dans des conditions favorables et produira des plantules normales (des plantules qui comportent les structures essentielles, racines, tiges et des réserves alimentaires suffisantes), capables de se développer en plantes matures pour leur reproduction (voir Diagramme de flux 5.1).

### Comment teste-t-on la germination ?

Les besoins de base pour la germination des semences sont : de l'eau, de l'oxygène, de la lumière et une température adaptée. Les semences d'espèces différentes ont des besoins différents et on ne peut établir un ensemble général de conditions pour faire germer les semences de toutes les espèces. Les semences de certaines espèces sont plus tolérantes et germent dans une large gamme de conditions, mais la germination complète ne peut être obtenue que dans les conditions optimales.

Pour les espèces ayant des semences de grandes dimensions qui ont un faible taux de multiplication des semences et pour celles qui ont des problèmes de régénération des semences (comme les espèces sauvages), il peut devenir difficile d'utiliser 200 graines pour un test de germination Dans ce cas, Deux réplications de 50 ou 25 graines chacune peuvent être utilisées, selon la quantité disponible.

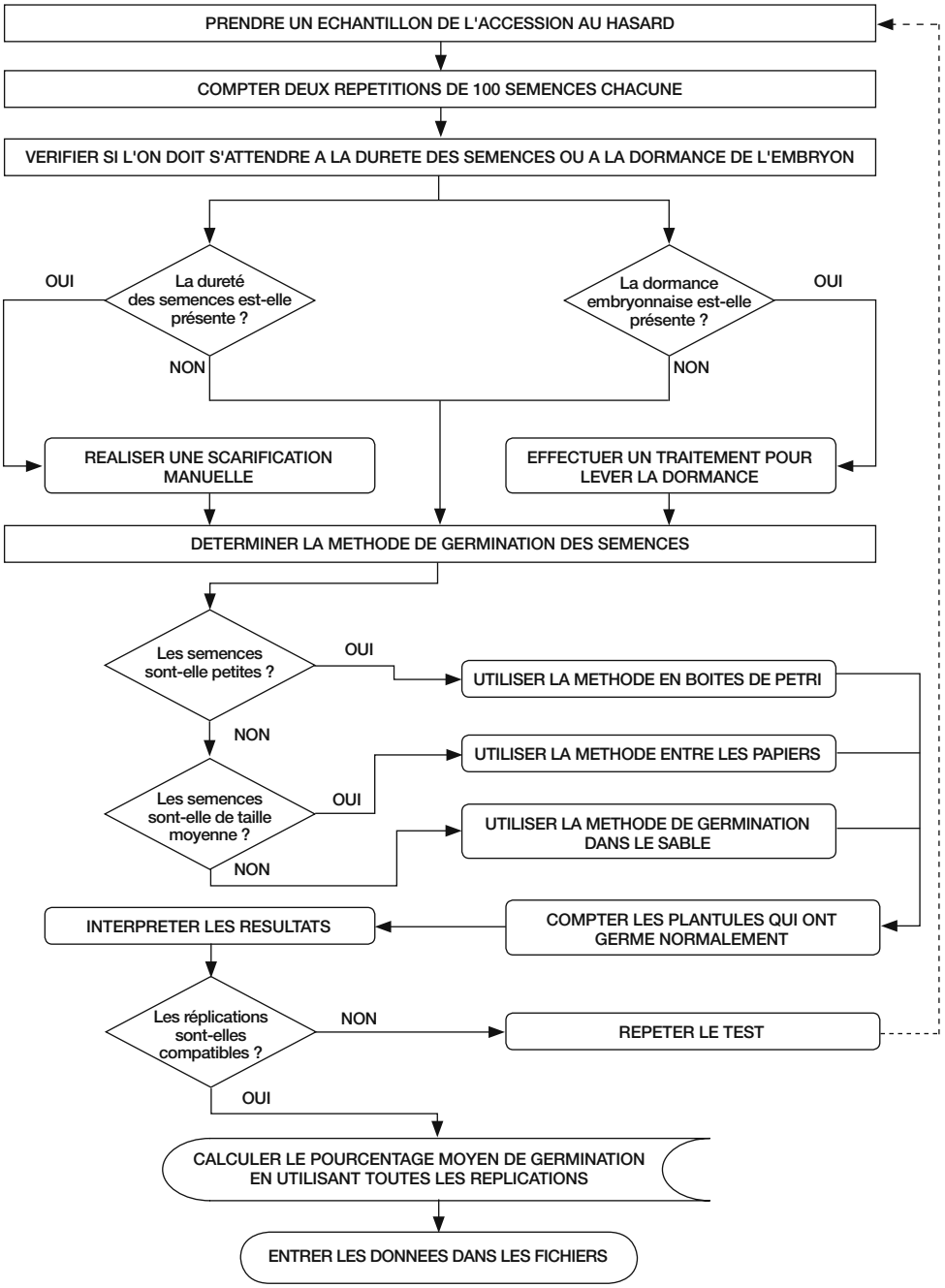
### Combien de semences doit-on tester ?

- Un test de germination avec une taille d'échantillon fixée utilisant 200 semences est recommandé pour déterminer la viabilité au début du stockage.
- Les Standards internationaux pour les banques de gènes (FAO/IPGRI, 1994) recommandent d'utiliser un minimum de deux réplications avec 100 graines par réplication. Si les résultats du test montrent que la germination est en dessous de 90%, 200 graines supplémentaires doivent être testées en utilisant la même méthode. On prend la moyenne des deux tests comme viabilité totale.

### Quand une semence a-t-elle germé ?

La germination d'une semence peut être définie comme la reprise de croissance de l'embryon et l'émergence ou la protrusion de la radicule des structures qui la recouvrent. Pour tester les

**Diagramme de flux 5.1.** Test de germination.



semences dans les banques de gènes, la germination n'est pas complète tant que la plantule ne peut être jugée normale selon des critères spécifiques pour chaque espèce (voir Association of Seed Analysts [AOSA], 2005; ISTA, 2005). C'est parce que l'objectif du test des semences est de donner une indication de la façon dont les semences vont se comporter comme propagules au champ.

## Test de germination

### Etape 1 : Préparation du test de germination

1. Vérifier les besoins spécifiques en température, lumière et tout autre traitement requis pour tester la germination d'une espèce donnée (voir Tableau 5.1).
2. Vérifier que l'équipement et l'environnement approprié sont disponibles pour satisfaire ces conditions. Si ce n'est pas le cas, les meilleures alternatives possibles doivent être trouvées.
3. Prendre au hasard un échantillon de semences de chaque accession après avoir légèrement secoué le lot de semences dans son conteneur ou en les étalant sur une surface propre et en mélangeant minutieusement.
4. Compter 200 semences (ou moins, selon leur disponibilité) pour chaque test. Remettre les semences en excès dans leur conteneur.
5. Diviser ces semences en au moins deux réplications.
6. Si les semences sont très sèches (avec un taux d'humidité inférieur à 8%), et qu'elles risquent de subir des dommages dus à l'imbibition, il peut être nécessaire d'augmenter le taux d'humidité (ce processus est appelé *humidification*) jusqu'à 15–17% avant de tester la germination. (voir encadré 5.1).

---

**Encadré 5.1.** Humidification des semences sèches.

***Petites graines***

1. Etaler les semences de manière uniforme sur une boîte de Petri.
2. Placer trois serviettes en papier très humides à plat à l'intérieur d'une grande boîte en polyéthylène.
3. Placer les boîtes de Petri (sans couvercles) contenant les semences sur le dessus du papier humide et fermer la boîte avec un couvercle bien ajusté.
4. Placer la boîte dans un incubateur à 20°C pendant 24 heures ou plus, selon le taux d'humidité initial.

***Grosses graines***

1. Placer les semences dans des sacs perméables faits en toile de moustiquaire ou un matériau similaire.
2. Placer les sacs sur le dessus d'une jauge au dessus de l'eau dans un dessiccateur. Il faut faire attention à éviter le contact direct entre les semences et l'eau.
3. Placer le dessiccateur à 20°C pendant environ 48 heures. La couche de semences ne doit pas avoir plus d'une graine d'épaisseur pour permettre à toutes les semences d'absorber l'humidité de l'atmosphère de manière équivalente.

**Tableau 5.1**. Directives pour tester la germination des plantes cultivées les plus communes. Se référer à ISTA (2005) ou AOSA (2005) pour des informations sur d'autres plantes.

| Plante | Espèce | Substrat* | Température (°C)** | Premier Dernier comptage (jours) | Traitements spéciaux ; Instructions supplémentaires pour des semences fraîches et dormantes |
|---|---|---|---|---|---|
| Amarante | *Amaranthus* spp. | DP | 20/30 ; 20 | 7, 14 | |
| Arachide | *Arachis hypogaea* | EP ; S | 20/30 ; 25 | 5, 10 | Ethephon à 0,2% |
| Aubergine | *Solanum melongena* | DP ; EP ; S | 20/30 | 7, 14 | Lumière ; $KNO_3$ |
| Avoine | *Avena sativa* | EP ; S | 20 | 5, 10 | Stratifier à 5°C ou 10°C pendant cinq jours et tester dix jours |
| Betterave | *Beta vulgaris* subsp. *vulgaris* | DP ; EP ; S | 20/30 ; 20 | 3, 10 | Prélaver et sécher à un maximum de 25°C |
| Blé | *Triticum aestivum* | DP ; EP ; S | 20 | 4, 7 | Préchauffer (30°–35°C) ; stratifier ; $GA_3$ |
| Carotte | *Daucus carota* | DP ; EP | 20/30; 20 | 6, 14 | $GA_3$ 50 ppm |
| Chicorée | *Cichorium intybus* | DP | 20 ; 20/30 | 5, 14 | Lumière ; $KNO_3$ |
| Choux | *Brassica oleracea* var. *capitata* | DP ; EP | 20/30 ; 20 | 3, 10 | Stratifier à 5°C ou 10°C pendant trois jours ; $KNO_3$ et lumière |
| Choux fleur | *Brassica oleracea* var. *botrytis* | DP ; EP | 20/30 ; 20 | 3, 10 | Stratifier à 5°C ou 10°C pendant trois jours ; $KNO_3$ et lumière |
| Citrouille | *Cucurbita maxima* | EP ; S | 20/30 ; 25 | 4, 7 | Garder le substrat plutôt sec |
| Colza annuel | *Brassica napus* | EP , DP | 20/30 | 3, 7 | |
| Concombre | *Cucumis sativus* | DP ; EP | 20/30 | 3, 7 | Garder le substrat plutôt sec |
| Coriandre | *Coriandrum sativum* | DP ; EP | 15 | 6, 21 | |
| Coton | *Gossypium* spp. | EP ; S | 20/30 ; 25 | 4, 12 | Raclage ; scarification mécanique des graines dures |
| Courge | *Cucurbita pepo; C. moschata* | EP ; S | 20/30 | 4, 7 | Garder le substrat plutôt sec |
| Courge amphore | *Lagenaria siceraria* | EP ; S | 20/30 ; 20 | 14 | |
| Dactyle aggloméré | *Dactylis glomerata* | DP | 15/25 | 7, 21 | Lumière ; stratifier à 5°C ou 10°C pendant sept jours |
| Eleusine | *Eleusine corocana* | DP | 20/30 | 8 | $KNO_3$ |
| Fève | *Vicia faba* | EP ; S | 20 | 4, 14 | Stratifier à 10°C pendant trois jours |
| Fléole des prés | *Phleum pratensis* | DP | 20/30 | 5, 10 | Lumière ; $KNO_3$ et stratifier à 5°C ou 10°C pendant cinq jours |
| Fraisier | *Fragaria ananassa* | DP | 20/30 ; 20 | 28 | Lumière |
| Gombo | *Abelmoschus esculentus* | EP ; DP | 20/30 | 4, 14 | |
| Haricot | *Phaseolus vulgaris* | EP ; S | 20/30 ; 25 ; 20 | 5, 8 | |

| Plante | Espèce | Substrat* | Température (°C)** | Premier Dernier comptage (jours) | Traitements spéciaux ; Instructions supplémentaires pour des semences fraîches et dormantes |
|---|---|---|---|---|---|
| Haricot de Lima | *Phaseolus lunatus* | EP ; S | 20/30 ; 25 | 5, 9 | |
| Herbe des Bermudes | *Cynodon dactylon* | DP | 20/30 | 7, 21 | Lumière ; $KNO_3$ |
| Ivraie vivace | *Lolium perenne* | DP | 15/25 ; 20 | 5, 14 | $KNO_3$ et stratifier à 5°C ou 10°C pendant cinq jours |
| Jarosse gesse cultivée | *Lathyrus sativus* | EP ; S | 20 | 4, 14 | Scarification mécanique des semences dures |
| Laitue | *Latuca sativa* | DP ; EP | 20 | 7 | Lumière ; scarification |
| Lentille | *Lens culinaris* | EP, S | 20 | 5, 10 | Scarification mécanique des semences dures |
| Lin | *Linum usitatissimum* | EP ; DP | 20/30 ; 20 | 3, 7 | |
| Lupin | *Lupinus angustifolius; L. albus* | EP ; S | 20 | 3, 10 | |
| Luzerne | *Medicago sativa* | DP ; EP | 20 | 4, 7 | Scarification mécanique des graines dures |
| Maïs | *Zea mays* | EP ; S | 20/30 ; 25 ; 20 | 4, 7 | |
| Mélilot blanc | *Melilotus albus* | DP ; EP | 20 | 4, 7 | |
| Melon | *Cucumis melo* | EP ; S | 20/30 | 4, 10 | Garder le substrat plutôt sec |
| Mil | *Pennisetum glaucum* | DP ; EP | 20/30 ; 25 | 3, 7 | |
| Millet | *Setaria italica* | DP | 20/30 | 4, 10 | |
| Moutarde noire | *Brassica nigra* | DP ; EP | 20/30 ; 20 | 3, 7 | Lumière ; $KNO_3$ et stratification à 10°C pendant trois jours |
| Moutarde brune | *Brassica juncea* | DP ; EP | 20/30 | 3, 7 | Lumière ; stratification à 10°C et tester cinq jours supplémentaires |
| Niébé | *Vigna unguiculata* | EP ; S | 20/30 ; 25 | 5, 8 | |
| Oignon | *Allium cepa* | EP ; DP | 20 | 6, 10 | |
| Orge | *Hordeum vulgare* | EP ; S | 20 | 4, 7 | Stratifier à 5°C ou 10°C pendant cinq jours |
| Pastèque | *Citrullus lanatus* | EP ; S | 20/30 ; 25 | 4, 14 | Garder le substrat plutôt sec ; Tester à 30°C |
| Piment oiseau | *Capsicum frutescens* | DP ; EP | 20/30 | 6, 14 | Lumière et $KNO_3$ |
| Pois | *Pisum sativum* | EP ; S | 20 | 8 | |
| Pois d'Angole | *Cajanus cajan* | EP | 25 | 5, 10 | Scarification mécanique des semences dures |
| Pois-chiche | *Cicer arietinum* | EP | 20 | 5, 8 | Scarification mécanique des graines dures |

| Plante | Espèce | Substrat* | Température (°C)** | Premier Dernier comptage (jours) | Traitements spéciaux ; Instructions supplémentaires pour des semences fraîches et dormantes |
|---|---|---|---|---|---|
| Pomme de terre | *Solanum tuberosum* | DP ; EP | 20/30 ; 20 | 8, 16 | $GA_3$, 2000 ppm |
| Radis | *Raphanus sativus* | DP ; EP | 20/30 ; 20 | 4, 6 | |
| Ricin | *Ricinus communis* | EP ; S | 20/30 | 7, 14 | |
| Riz | *Oryza sativa* | DP ; EP ; S | 20/30 ; 25 | 5, 14 | Préchauffer à 40°C pendant cinq jours |
| Safran bâtard | *Carthamus tinctorius* | DP ; EP | 20 ; 25 ; | 4, 14 | Lumière à 15°C |
| Sarrasin | *Fagopyrum esculentum* | EP ; DP | 20/30 ; 20 | 3, 6 | |
| Seigle | *Secale cereale* | DP ; EP ; S | 20 | 4, 7 | Stratifier à 5°C ou 10°C pendant cinq jours |
| Sésame | *Sesamum indicum* | DP | 20/30 | 3, 6 | |
| Soja | *Glycine max* | EP ; S | 20/30 ; 25 | 5, 8 | |
| Soja noir | *Vigna mungo* | EP | 20/30 ; 25 ; 20 | 3, 7 | |
| Soja vert | *Vigna radiata* | EP ; S | 20/30 ; 25 | 3, 7 | |
| Sorgho | *Sorghum bicolor* | DP ; EP | 20/30 ; 25 | 3, 10 | Stratifier à 5°C ou 10°C pendant cinq jours |
| Tabac | *Nicotiana tabacum* | DP | 20/30 | 4, 14 | Lumière |
| Tomate | *Lycopersicon esculentum* | DP ; EP | 20/30 | 5, 14 | Lumière ; $KNO_3$ |
| Tournesol | *Helianthus annuus* | EP ; S | 20/30 ; 25 ; 20 | 3, 7 | |
| Trèfle d'Alexandrie | *Trifolium alexandrinum* | DP ; EP | 20 | 3, 7 | |
| Trèfle blanc | *Trifolium repens* | DP ; S | 20 | 3, 10 | Stratifier à 5°C ou 10°C pendant cinq jours |
| Trèfle violet | *Trifolium pratense* | DP ; EP | 20 | 4, 10 | Stratifier à 5°C ou 10°C pendant cinq jours |
| Triticale | *Triticosecale* | DP ; EP ; S | 20 | 4, 7 | Stratifier à 5°C ou 10°C pendant cinq jours |
| Vesce cultivée | *Vicia sativa* | EP ; S | 20 | 5, 10 | |

*DP = dessus du papier, EP = entre papiers, S = Sable

**20/30 = températures alternées de 20°C appliquée pendant huit heures par jour et 30°C pendant 16 heures.

*Les semences d'espèces sauvages qui ont des enveloppes dures peuvent nécessiter une scarification (percer l'enveloppe de la graine avec une lame de rasoir, du papier de verre ou un scalpel sans abîmer l'embryon) avant l'humidification ou le semis.*

### Etape 2 : Réaliser le test de germination

Bien que plusieurs méthodes soient disponibles pour tester la germination, les quatre méthodes décrites ci-dessous sont suggérées ; elles peuvent être utilisées pour la plupart des espèces et donnent des résultats uniformes :

1. Méthode dessus du papier
2. Méthode entre les papiers
3. Germination dans le sable
4. Méthode avec agar

Du papier absorbant est utilisé comme substrat pour la germination avec les deux premières méthodes.

La qualité de chaque nouveau lot de papier doit être testée à sa réception.

#### Qualité du papier utilisé comme substrat

Il est important d'utiliser du papier de haute qualité comme substrat pour obtenir une germination uniforme et des résultats reproductibles. Si possible, le papier doit remplir les spécifications suivantes (ISTA, 2005) :

- Le papier utilisé comme substrat[10] ne doit pas être toxique pour les plantules en cours de développement.
- Il doit être capable d'absorber et de fournir suffisamment d'humidité pour que les semences germent.
- Il doit être suffisamment solide pour ne pas se désintégrer lors des manipulations, et ne pas être pénétré par les racines des plantules qui se développent.
- Il doit avoir un pH neutre de 6–7.

#### Test simple de qualité du papier

***A. Présence de substances toxiques***

1. Couper le papier à la bonne taille et le placer dans une boîte de papier de 9 cm.
2. Humidifier le papier avec suffisamment d'eau.
3. Faire un test en utilisant des semences d'une espèce sensible comme l'herbe des Bermudes (*Cynodon dactylon*), le pétunia (*Petunia hybrida*) ou le tabac (*Nicotiana tabacum*) pour observer la germination sur le papier humidifié.

[10] Des exemples de substrat standard incluent le papier filtre grain 181 de chez Whatman et les serviettes en papier non toxique 400PT de Seedburo.

4. Evaluer le développement des racines au bout de cinq jours.
   - Les symptômes de toxicité du papier incluent des extrémités de racines raccourcies et décolorées.

***B. Force du papier***

1. Humidifier le papier et le tenir en l'air par un coin.
   - Le papier ne doit pas se déchirer.

***C. Absorption de l'humidité***

1. Couper le papier en bandes de 10 mm de largeur.
2. Le tenir verticalement avec environ 20 mm de papier immergé dans l'eau.
3. Mesurer la hauteur au dessus du niveau que l'humidité a atteinte.
   - Le minimum standard est une montée de 30 mm en deux minutes.

**Contrôle des champignons lors des tests de germination**

Les contaminations fongiques arrivent fréquemment lors des tests de germination, particulièrement avec les semences d'espèces légumineuses ; elles sont généralement associées à des semences immatures, endommagées ou vieilles. Elles peuvent également se produire au cours des prétraitements tels que l'extraction des semences ou résulter de problèmes d'hygiène dans la zone de test des semences. Adopter les pratiques de laboratoire ci-dessous pour minimiser les risques de contamination fongique :

1. Nettoyer et désinfecter (par une stérilisation de surface avec de l'alcool à 70–95% ou de l'eau de javel domestique à 20%) la zone de test et les incubateurs entre lots successifs, pour limiter la dissémination des attaques fongiques ; se laver les mains, ainsi que les paillasses et l'intérieur des incubateurs avec de l'eau savonneuse chaude est une technique simple mais efficace pour réduire les contaminations.
2. Espacer les semences comme il faut et s'assurer que les semences ne se touchent pas entre elles. Utiliser des nombres plus élevés de réplications, si nécessaire.
3. Fournir un environnement de germination optimal, de sorte que les semences germent rapidement ; le régime de températures doit être adapté et l'environnement de la zone de test doit être bien aéré.
4. S'assurer de la propreté des milieux et des conteneurs utilisés pour tester la germination ; s'assurer qu'ils ne sont pas des sources d'inoculum. Stériliser les surfaces des conteneurs en les frottant avec de l'alcool à 70–95% ou en les trempant dans de l'eau de javel à 20% ou de l'eau à 55°C pendant 10–15 minutes.
5. Eviter les dommages causés par l'imbibition (par une humidification préalable des semences) qui pourraient conduire à

une fuite du contenu cellulaire, qui fournit une source d'éléments nutritifs aux champignons.
6. Enlever rapidement les semences qui se détériorent pour éviter la dissémination de champignons vers les semences avoisinantes. Si la contamination augmente, laver les semences dans de l'eau de javel à 1–10% et recommencer le test dans un conteneur propre avec un nouveau substrat.
7. Enlever les structures qui recouvrent les semences (comme les glumes) avant les tests, lorsqu'elles s'avèrent être des sources d'infection.
8. Enlever les semences qui ont germé avant la récolte et qui sont ensuite déshydratées, car elles peuvent être source d'infection.

Alors que ces pratiques minimisent le risque de contaminations fongiques, le traitement des semences avec des fongicides tels que le Thiram ou le Benlate, ou la stérilisation des surfaces à l'hypochlorite de sodium réduisent les attaques fongiques pendant les tests de germination. Cependant, l'utilisation de fongicides peut affecter les résultats des tests de germination et peut constituer un danger pour la santé des personnes qui conduisent les tests. Ils ne doivent être utilisés que lorsqu'ils sont essentiels, mais sont extrêmement utiles lors du semis au champ ou de la régénération.

***Traitement des semences***

1. Ajouter une pincée de fongicides dans le conteneur où se trouvent les semences préparées pour le test de germination.
2. Bien agiter le conteneur de telle sorte que les semences reçoivent un enrobage uniforme de fongicides.

***Stérilisation de surface***

1. Tremper les semences pendant 10 minutes dans une solution à 1% d'hypochlorite de sodium. La concentration de l'hypochlorite domestique est généralement de 5%. Ajouter 80 ml d'eau distillée à 20 ml d'eau de javel pour obtenir une solution à 1%.
2. Soigneusement rincer les semences avant le test de germination.

**Méthode du dessus du papier**

Cette méthode est bien adaptée aux espèces ayant des semences de moins de 2 mm de diamètre, comme les légumineuses à petites graines et les espèces fourragères. Les semences sont mises à germer sur du papier absorbant humide dans des conteneurs ayant un couvercle qui ferme bien, pour éviter la perte d'humidité. Les boîtes de Petri en verre ou en plastique sont des conteneurs couramment utilisés.

1. Stériliser les surfaces du conteneur en les frottant avec le l'alcool à 70–95% ou en les trempant dans de l'eau de javel à 20% ou de l'eau à 55°C pendant 10–15 minutes.
2. Couper le papier absorbant à la taille et à la forme du conteneur. Pour les boîtes de Petri, on peut utiliser des ronds de papier filtre comme le Whatmann Grade 181 du diamètre approprié.
3. Placer le papier dans le fonds du conteneur ou de la boîte de Petri.
4. Marquer les conteneurs avec le numéro d'accession, le numéro de réplication et la date de test ; utiliser un stylo ou un marqueur indélébile pour le marquage.
5. Ajouter le volume requis d'eau distillée. Si l'on ne dispose pas d'eau distillée, de l'eau du robinet bouillie et refroidie peut être utilisée. Le volume d'eau distillée dépend de l'épaisseur du papier et de la taille du conteneur. Le papier filtre ne doit pas être assez mouillé pour qu'un film d'eau se forme lorsque l'on appuie dessus avec le doigt. Pour du papier filtre Whatman Grade dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre, il faut 4 ml d'eau.
6. Appuyer le papier au fond du conteneur en utilisant un entonnoir à l'envers ou des pinces.
7. Etaler les semences de manière uniforme sur la surface du papier, de telle sorte qu'elles ne se touchent pas. Il est recommandé que la distance entre les semences soit de trois à cinq fois le diamètre des semences.
8. Couvrir les conteneurs et s'assurer qu'il n'y a pas de blocage de l'air résultant d'un excès d'humidité sur les couvercles.
9. Placer les conteneurs dans un germinateur ou un incubateur maintenu à la température recommandée pour la germination de l'espèce (voir Tableau 5.1).
10. Vérifier régulièrement le taux d'humidité du substrat, particulièrement lorsque l'humidité à l'intérieur des enceintes n'est pas contrôlée ou que la température est réglée à 25°–30°C. Les papiers doivent généralement être humidifiés plusieurs fois au cours du test. Autrement, on peut conserver les conteneurs dans un sac en plastique fin (fermé de manière lâche et non scellé afin de permettre la diffusion d'oxygène) pour éviter que le substrat ne s'assèche.
11. Conduire le test pendant la durée recommandée (voir Tableau 5.1) et compter le nombre de semences qui ont germé.
12. Si certaines semences n'ont pas germé et ont l'air dormantes, les traiter avec les techniques appropriées pour stimuler la germination (voir Tableau 5.1) et continuer le test jusqu'à ce que toutes les semences aient germé ou que plus aucune germination supplémentaire ne se soit produite après deux comptages consécutifs.
13. Noter les semences qui n'ont pas germé mais qui sont fermes et saines à la fin du premier comptage, ainsi que celles qui n'ont pas germé et sont présumées mortes à la fin du test de germination.

La Figure 5.1 montre les stades d'un test de germination utilisant des papiers buvard dans des boîtes de Petri.

La méthode entre les papiers est bon marché et facile à préparer, mais les semences ne peuvent pas être observées sans dérouler le papier. Ne pas faire sécher et réutiliser le papier pour un autre test, car il peut transmettre une contamination fongique d'un test à l'autre.

**Méthode entre les papiers**

Cette méthode est la plus appropriée pour les espèces à semences moyennes ou grandes, entre 2 mm et 1 cm de diamètre, qui incluent de nombreuses céréales, les légumineuses et les légumes à graines. Les semences sont mises à germer entre des couches de papier humide. Lorsque c'est possible, le papier doit suivre les spécifications décrites précédemment (par exemple serviettes en papier non toxique 400 PT de chez Seedburo Equipment Co., papier de germination normal et lourd de chez Hoffman Manufacturing, Inc. et papier pour test de semences Grade 3663 de chez Whatman Plc.).

1. Couper le papier à la taille adéquate pour contenir une réplication de semences.
2. Marquer le papier à une extrémité avec le numéro de l'accession, le numéro de réplication et la date de test. Utiliser un crayon ou un feutre indélébile pour le marquage.
3. Humidifier le papier avec de l'eau.
4. Disposer les semences en rangées à intervalles réguliers, à environ 4 cm du bord supérieur, en laissant un espace de 3–4 cm sur les côtés. Idéalement, la distance entre les semences doit être au moins trois à cinq fois celle de leur diamètre.
5. Couvrir les semences avec un autre morceau de papier imbibé.
6. Rouler le papier de manière lâche du côté opposé au marquage.
7. Utiliser un trombone ou un élastique pour tenir le papier roulé et l'empêcher de s'ouvrir.
8. Garder les rouleaux verticalement dans une boîte en plastique profonde.
9. Ajouter une quantité suffisante d'eau dans la boîte (qui recouvre environ 3 cm des rouleaux de papier).
10. Placer la boîte dans un incubateur ou un germinateur maintenu à la température recommandée et mener le test pendant la période recommandée (voir Tableau 5.1).
11. Garder les papiers humides en les pulvérisant avec de l'eau (en utilisant des pulvérisateurs) si nécessaire, particulièrement lorsque la température est élevée (25°–30°C).
12. Compter les semences germées en déroulant le papier avec précautions pour éviter de le déchirer ou d'abîmer les racines des jeunes plantules.
13. Si certaines semences n'ont pas germé et semblent dormantes, les traiter avec la technique appropriée (voir Tableau 5.1). Continuer le test jusqu'à ce que toutes les semences aient germé ou que plus aucune germination ne se soit produite après deux comptages consécutifs.

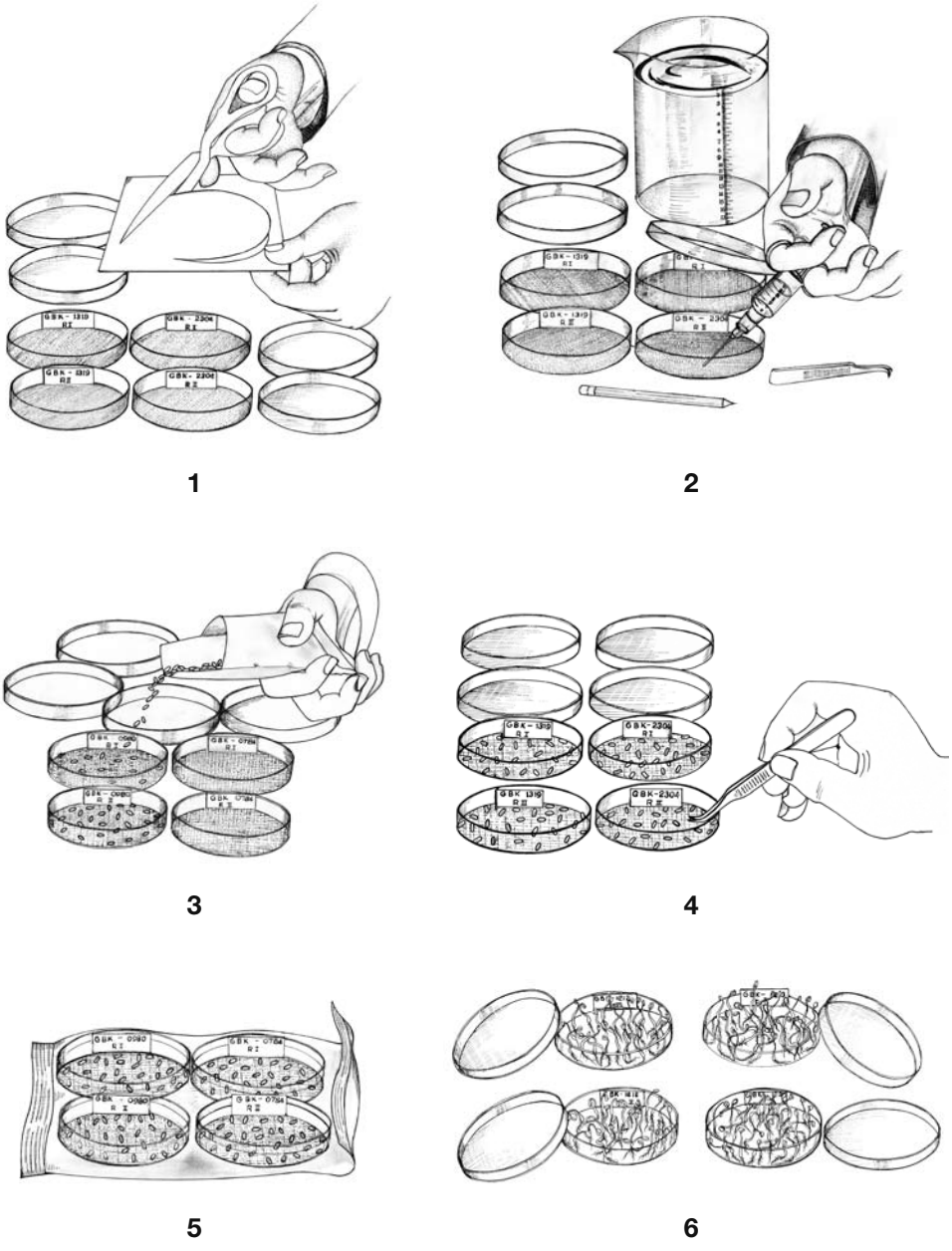



**Figure 5.1.** Test de germination des semences sur le dessus de papiers absorbants dans des boîtes de Petri.

14. Noter les semences qui n'ont pas germé mais qui sont fermes et saines à la fin du premier comptage, ainsi que celles qui n'ont pas germé et sont présumées mortes à la fin du test de germination.

La Figure 5.2 montre les stades de préparation des tests de germination utilisant des serviettes en papier.

Utiliser du sable fin pour les tests de germination. Du sable de carrière ou de rivière est meilleur que du sable de plage ou de rivage. Si du sable de rivage doit être utilisé, le laver soigneusement pour enlever tous les sels. Le nettoyer en le pasteurisant (à 180°F ou 82°C et 5 psi avec trois cycles d'une heure chacun) avant utilisation.

**Germination dans le sable**

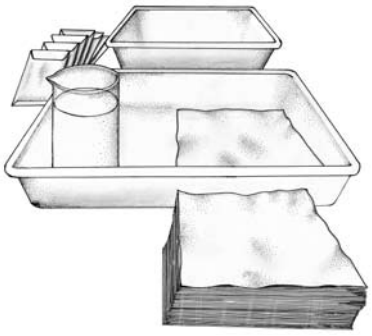
Cette méthode est la plus appropriée pour les grandes semences (ayant un diamètre de plus d'1 cm), qui sont difficiles à faire germer dans des boîtes de Petri ou trop lourdes pour la méthode entre les papiers.

1. Mettre du sable stérile humide dans des pots ou des boîtes en plastique profondes avec drainage. Une seule feuille de papier peut être placée au fonds des boîtes pour empêcher le sable de s'écouler par les trous de drainage.
2. Arroser le sable jusqu'à qu'il soit humide. Ne pas mettre d'eau en excédent.
3. Faire des trous selon un mode équidistant d'environ la même profondeur que la taille des semences. Idéalement, la distance entre les semences doit être d'au moins trois à cinq fois le diamètre des semences.
4. Préparer des étiquettes en plastique ou en bois avec le numéro d'accession, la date de semis et le numéro de réplication et les placer dans chaque boîte.
5. Placer une graine dans chaque trou et recouvrir les trous de sable.
6. Arroser de nouveau le sable par pulvérisation pour s'assurer que la couche de sable n'est pas déplacée lors de l'arrosage. L'arrosage par le fond est meilleur que l'arrosage par le dessus ; il est réalisé en plaçant les conteneurs dans lesquels sont réalisés les tests sur de plus grands plateaux avec de l'eau pendant une heure environ.
7. Placer les boîtes dans des conditions d'éclairement et de température adaptées à l'espèce.
8. Conserver le substrat humide pendant les tests en rajoutant de l'eau, mais ne pas trop arroser.
9. Effectuer le test pendant la période recommandée pour l'espèce et compter le nombre de semences qui ont poussé.

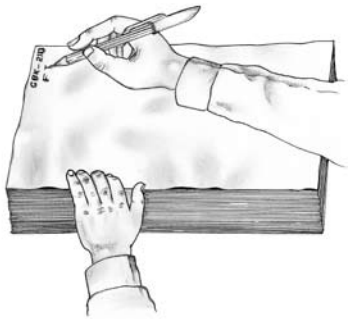
La Figure 5.3 montre les stades d'un test de germination dans le sable.

**Méthode avec de l'agar**

L'agar est un substrat qui peut remplacer le papier, particulièrement pour tester la germination des semences petites et moyennes.



1

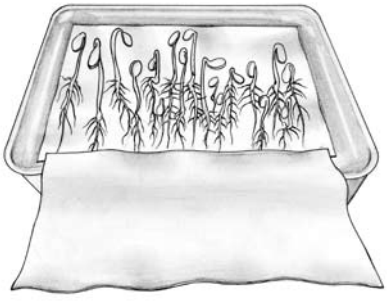


2

3

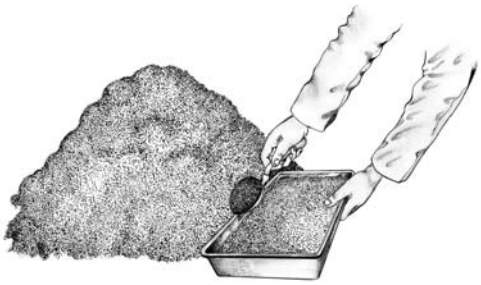
4

5



6

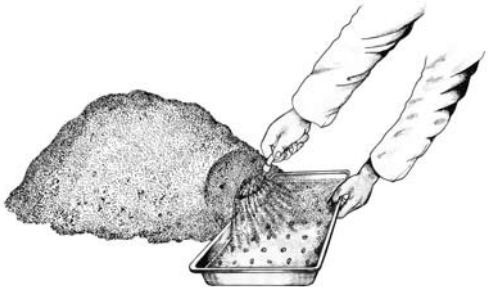
**Figure 5.2.** Test de germination des semences par la méthode entre les papiers.



1

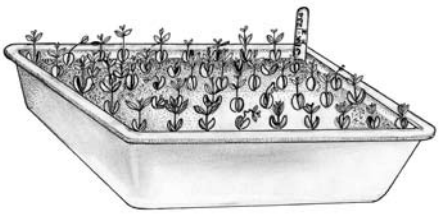
2

3



4

5



6

**Figure 5.3.** Test de germination des semences dans la sable.

L'agar se dissout lentement dans l'eau chaude et forme une solution visqueuse, qui forme un gel ferme lorsqu'elle se refroidit.

1. Stériliser la surface des conteneurs en les frottant avec de l'alcool à 70–95% ou en les trempant dans de l'eau de javel à 20% ou de l'eau à 55°C pendant 10–15 minutes.
2. Marquer des boîtes de Petri de 9 cm ainsi que leurs couvercles (pour de petites semences), ou tout autre conteneur de germination résistant à la chaleur, en indiquant le numéro d'accession, le numéro de réplication et la date de test.
3. Préparer une solution d'agar à 1% en dissolvant 1 g d'agar en poudre dans 100 ml d'eau distillée chaude sur une plaque chauffante.
4. Laisser la solution bouillir jusqu'à ce que l'agar soit complètement dissous, puis laisser refroidir à 50°C et verser dans les boîtes de Petri marquées ou les autres conteneurs. L'épaisseur du substrat doit être deux fois celle des semences.
5. Disposer les semences de manière équidistante sur la surface de l'agar.
6. Couvrir les boîtes avec leurs couvercles et les placer dans un incubateur à la température recommandée pour l'espèce (voir Tableau 5.1).
7. Effectuer le test pour la période recommandée (voir Tableau 5.1) et compter le nombre de semences qui ont germé.

L'agar reste humide jusqu'à un mois et est un substrat particulièrement adapté aux études de dormance. Cependant, il est sensible aux contaminations par les bactéries et champignons aériens et des conditions stériles sont requises au laboratoire lorsque l'on utilise ce substrat.

### Etape 3 : Evaluation des tests de germination

1. Les plantules enlevées au cours d'un test de germination sont classées comme normales ou anormales (voir Encadré 5.2).
   - Les plantules normales possèdent des structures racinaires et aériennes adéquates, qui sont essentielles pour leur développement ultérieur en plantes.

---

**Encadré 5.2.** Les plantules avec les défauts suivants sont classées comme anormales (pour plus de détails, se référer à ISTA, 2003, 2005 ou AOSA, 2005).

***Racines***

- Racine primaire chétive, tronquée, aplatie, manquante, cassée, fendue depuis l'extrémité, enfermée dans l'enveloppe de la graine, avec un géotropisme négatif, vitreuse, pourrie à cause d'une infection primaire ou avec moins de deux racines secondaires chez les monocotylédones

***Tige (hypocotyle, épicotyle et mésocotyle)***

- Court et épais, complètement fendu, manquant, resserré, tordu, vitreux ou pourri à cause d'une infection primaire

***Bourgeon terminal/feuilles***

- Déformé, abîmé, manquant ou pourri à cause d'une infection primaire

***Cotylédons***

- Gonflés, déformés, nécrotiques, vitreux, séparés ou manquants, et pourris à cause d'une infection primaire

Des exemples de plantules normales et anormales chez le pois, l'arachide, le blé et l'oignon sont montrés sur les Figures 5.4 à 5.7.

**Figure 5.4.** Anomalies chez des plantules de pois.

- Les plantules anormales sont incapables d'un développement ultérieur et souffrent de déficiences, de détériorations ou de faiblesses dans leurs systèmes racinaires ou aériens.

2. Il est important que les tests de germination soient observés régulièrement et que les plantules normales et les plantules anormales soient enlevées afin de permettre aux autres plantules de se développer dans un environnement moins confiné ; il est également important d'enlever les semences contaminées par des champignons afin d'empêcher la dissémination de l'infection. Il est désirable d'effectuer un comptage initial de germination au bout de trois ou sept jours, suivi par un comptage final au bout

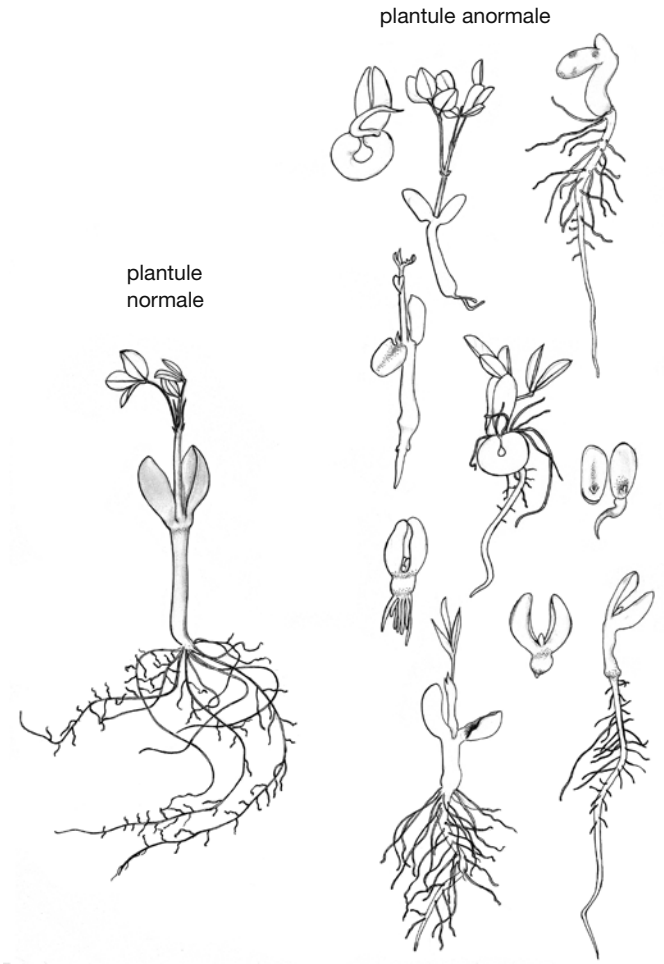



**Figure 5.5.** Anomalies chez des plantules d'arachide.

de sept ou 14 jours, selon l'espèce. Certaines espèces comme les herbacées nécessitent une période de test allant jusqu'à 21 ou 28 jours, et il est désirable d'effectuer un comptage intermédiaire au bout de 14 jours. Les procédures détaillées de germination et les périodes pour le comptage des plantules sont fournies dans les règles de l'ISTA et de l'AOSA pour le test des semences (voir ISTA, 2005 et AOSA, 2005).

3. Enregistrer les informations sur la feuille fournie sur le Tableau 5.2.
4. Enregistrer également toute plantule anormale ou semence morte enlevée lors du premier comptage ou des comptages intermédiaires (voir Tableau 5.2) ; ils fournissent une indication

Seules les plantules normales (celles qui démontrent une capacité au développement continu dans des conditions adaptées) sont considérées comme ayant germé. Les plantules anormales ne doivent pas être considérées comme ayant germé.

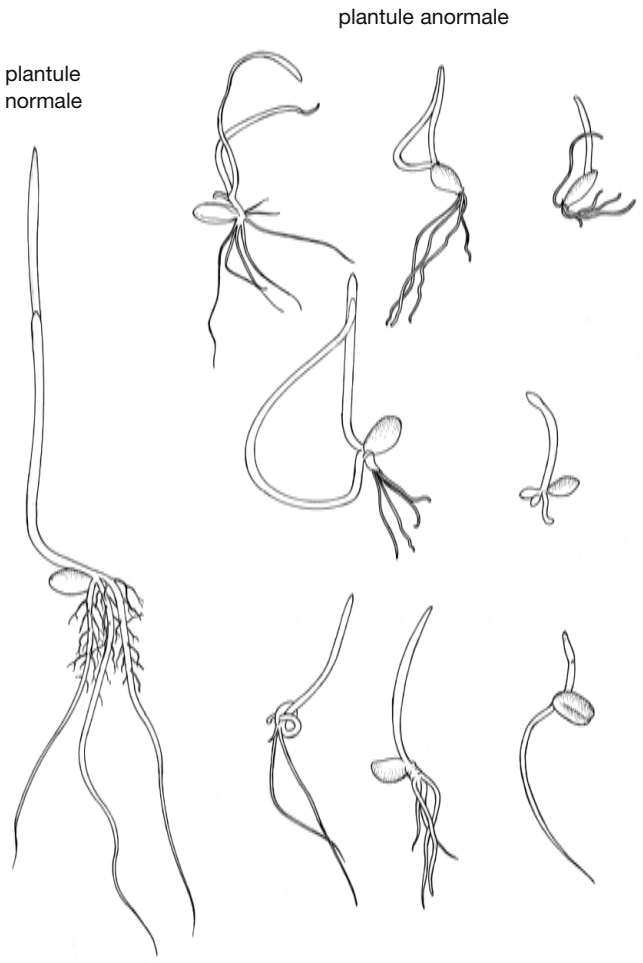



**Figure 5.6.** Anomalies chez des plantules de blé.

du progrès de la détérioration des semences, si un bilan ultérieur est requis.

5. A la fin du test de germination, compter et enregistrer toutes les semences non germées et mortes dans chaque réplication.
6. Calculer le pourcentage moyen de germination de l'accession en utilisant les résultats de toutes les réplications pour déterminer le nombre de *plantules normales* produites.
7. Répéter le test de germination si la différence entre les deux réplications dépasse 10% ou si la tolérance maximale dépasse la probabilité de 2,5% (voir Ellis *et al*., 1985).
8. Lorsqu'une semence a germé, la plantule résultante peut être

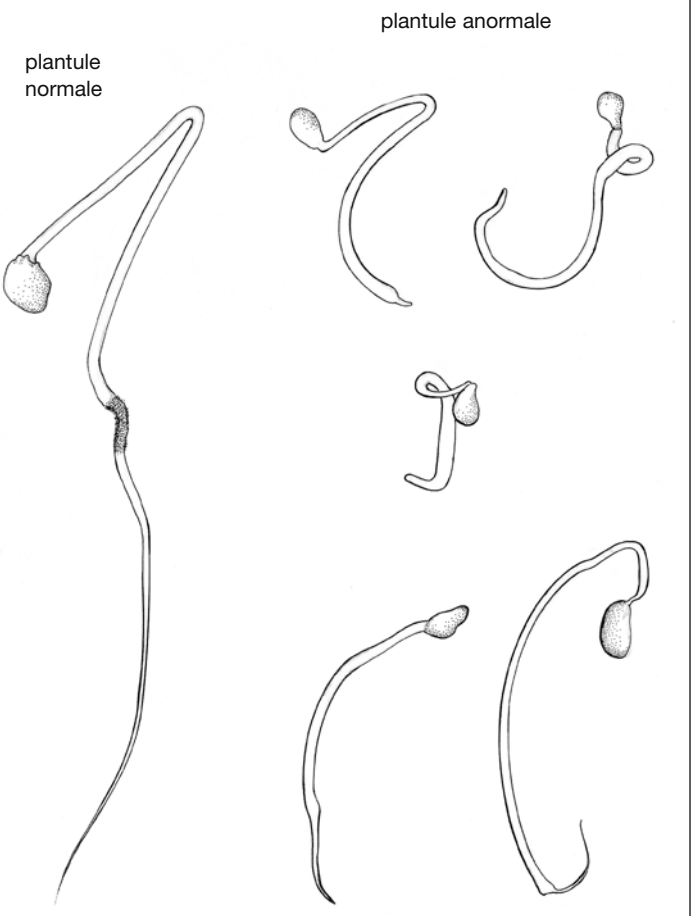



**Figure 5.7.** Anomalies chez des plantules d'oignon.

éliminée ou transplantée pour une régénération quand le nombre de semences stockées est extrêmement bas.

### Pourquoi certaines semences ne germent-elles pas ?

Les semences ne germent pas parce qu'elles sont mortes ou dormantes. Généralement, les semences mortes se ramollissent et pourrissent pendant le test. Afin de déterminer si les semences sont mortes ou dormantes, inspecter les semences non germées avec des pinces pour voir si elles sont molles ou dures. Les semences chez lesquelles l'embryon est ferme sont potentiellement viables. Un pourcentage élevé de ces semences

**Tableau 5.2.** Fiche modèle de données pour enregistrer les résultats de germination.

Plante/espèce : Substrat :
Numéro d'accession : Température :
Numéro de référence du lot : Lumière :
Date de stockage : Traitements spéciaux :
Date de test : Durée d'incubation :

| **Réplication** | | **Plantules normales** | | | | **Total** | **Remarques** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | **I** | **II** | **III** | **IV** | | |
| **Nombre de semences testées** | | | | | | | |
| **Date** | **Jour** | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| **Total germées** | | | | | | | |
| Anormales | | | | | | | |
| Dures/dormantes | | | | | | | |
| Mortes | | | | | | | |
| Germination (%) | | | | | | | |

indique que les conditions de germination n'étaient pas optimales ou que les semences sont dormantes.

## Dormance des semences

La dormance fait référence à l'état dans lequel des semences viables ne germent pas, même dans des conditions normalement favorables à la germination.

### Comment déterminer si les semences sont dormantes

Les semences qui restent dures, ou qui absorbent de l'eau mais restent fermes et en bon état au cours des tests de germination sont probablement dormantes. La dormance des semences est commune chez les semences fraîchement récoltées et chez de nombreuses espèces sauvages apparentées des plantes cultivées.

### Types de dormance

#### Dormance due à l'enveloppe de la semence

Des conditions physiques, chimiques ou mécaniques empêchent l'absorption d'humidité. Des exemples de dormance liée à l'enveloppe de la semence peuvent être trouvés dans les familles des Anacardiacées, des Burséracées, des Cistacées, des Fabacées, des Géraniacées, des Malvacées et des Rhamnacées.

### Dormance embryonnaire

Des substances inhibitrices, généralement dans l'embryon ou dans les tissus qui l'entourent, empêchent la germination. Des exemples de dormance embryonnaire peuvent être trouvés dans les familles des Apiacées, des Iridacées, des Liliacées, des Papavéracées et des Renonculacées.

Chez certaines espèces, les embryons de la graine sont sous-développés ou pas complètement formés lors de la dispersion des semences. Chez ces espèces, l'embryon continue à croître après la dispersion, et la germination est empêchée jusqu'à ce que l'embryon atteigne une longueur critique spécifique de l'espèce. Des exemples peuvent être trouvés dans les familles des Annonacées, des Apiacées, des Orchidacées, des Orobanchacées et des Renonculacées.

La dormance peut également être causée par une combinaison d'imperméabilité de l'enveloppe de la semence et de dormance physiologique de l'embryon. Pour que la germination ait lieu, les deux types de dormance doivent être levés. L'ordre dans lequel chaque type de dormance doit être levé dépend de l'espèce. Des exemples sont *Ceanothus* (Rhamnacées), *Tilia* (Tiliacées) et *Rhus* (Anacardiacées).

### Comment déterminer le type de dormance

Si le fait d'avoir enlevé l'enveloppe de la graine ne conduit pas à la germination, le mécanisme de dormance est localisé dans l'embryon lui-même.

## Traitements pour lever la dormance

Chez certaines semences qui sont dormantes à la récolte, la dormance se lève naturellement avec le temps. Plusieurs méthodes sont utilisées pour des genres spécifiques.

### Lever la dormance liée à l'enveloppe

Trouer ou scarifier l'enveloppe de la graine en la perçant, en la coupant, en l'ébréchant ou en la limant avec un couteau, une aiguille ou du papier de verre sont les procédures préférées pour lever la dormance liée à l'enveloppe.

- La scarification manuelle est efficace à n'importe quel endroit de l'enveloppe, mais la région micropylaire doit être évitée, car c'est la partie la plus sensible de la semence où est située la radicule (voir Figure 5.8).
- Si les structures qui recouvrent la graine empêchent la croissance de l'embryon, les enlever pour permettre la germination.

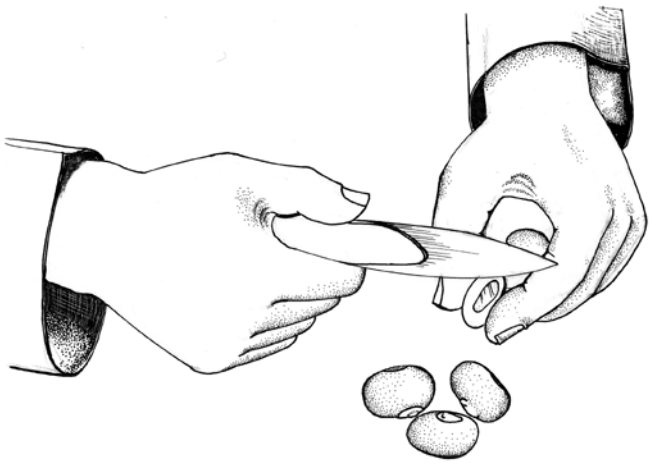


**Figure 5.8.** Scarfication manuelle de l'enveloppe des semences.

- Si l'enveloppe de la graine contient des inhibiteurs qui empêchent ou retardent la germination, ils peuvent être éliminés en plaçant les graines sous de l'eau courante pendant plusieurs heures ou en trempant les semences dans un grand volume d'eau qui est changée toutes les six à 12 heures.
- L'ISTA recommande également d'utiliser de l'acide sulfurique concentré pendant 2–45 minutes pour scarifier l'enveloppe des graines. Cependant, cette méthode est coûteuse et dangereuse et doit être appliquée avec précautions.
- Afin d'enlever la cuticule cireuse et de permettre l'imbibition, placer les semences dans de l'eau à 75°C pendant trois à six minutes. Il faut faire attention à ne pas utiliser des températures élevées pendant de longues périodes ou à ne pas faire bouillir les semences.

### Lever la dormance embryonnaire

Il existe plusieurs traitements recommandés pour lever la dormance embryonnaire (voir Tableau 5.1). Ceux-ci incluent le pré-chilling (également appelé stratification au froid) pour les espèces tempérées et tropicales d'altitude élevée, le préchauffage, l'application d'acide gibbérellique ($GA_3$) à faible concentration, l'ajout de nitrate de potassium ($KNO_3$) au substrat et la lumière.

#### *Pré-chilling (stratification au froid)*

Les semences sont placées dans des conteneurs sur un substrat de germination humide et gardées entre 3 et 5°C dans un réfrigérateur

pendant sept jours. Pour des semences plus dormantes, le traitement peut être allongé jusqu'à 14 jours. Une fois que la stratification est terminée, les conteneurs sont replacés dans des incubateurs et les semences sont mises à germer dans les conditions recommandées.

***Préchauffage***
Les semences sont traitées à une température ne dépassant pas 40°C pendant jusqu'à sept jours, avec une circulation de l'air libre avant germination dans les conditions recommandées.

***Acide gibbérellique***
Du papier pour test de germination est humidifié avec une solution d'acide gibbérellique ($GA_3$) à 0,05%, préparée en dissolvant 500 mg de $GA_3$ dans 1 l d'eau. La germination est ensuite poursuivie dans les conditions recommandées.

***Nitrate de potassium***
Une solution de nitrate de potassium ($KNO_3$) à 0,2%, préparée en dissolvant 2 g de $KNO_3$ dans 1 l d'eau, est utilisée pour humidifier le papier de germination au début du test. La germination est ensuite poursuivie dans les conditions recommandées.

***Lumière***
La lumière peut être ou ne pas être requise pour la germination, en fonction de l'espèce. Lorsque l'on utilise des températures constantes pour la germination d'espèces chez lesquelles la lumière est nécessaire, les tests doivent être réalisés avec de la lumière pendant au moins huit heures par cycle de 24 heures. Lorsque des températures alternées sont utilisées, toute application nécessaire de lumière doit coïncider avec le cycle de température élevée. L'intensité lumineuse doit être de 750–1250 lux, fournie par des lampes blanches froides.

Nombre des méthodes décrites ci-dessus sont spécifiques de genres. Les traitements de levée de dormance recommandés pour les espèces cultivées communes sont donnés dans le Tableau 5.1. Pour des informations sur d'autres espèces, se référer à Ellis et al. (1985).

## Algorithme pour développer des procédures de tests de germination adaptées pour des espèces pour lesquelles aucune information n'est disponible

### Etape 1

- Déterminer si les enveloppes de la graine sont imperméables en vérifiant l'imbibition de semences placées une nuit sur du

papier filtre imbibé. Si les semences n'ont pas absorbé d'eau, scarifier les enveloppes de la graine et observer après 12 heures supplémentaires. Procéder à la germination lorsque les semences se sont imbibées d'eau.

**Etape 2**

- Si la première étape ne produit pas une germination complète et si les accessions sont d'origine tempérée, faire le test à des températures constantes de 15°C et 20°C. Pour des accessions d'origine tropicale, utiliser des températures constantes de 20°C et 25°C.
- Si l'origine des accessions est inconnue ou douteuse, tester à 15°, 20° et 25°C.
- Dans tous les cas, appliquer de la lumière pendant 12 heures sur 24.

**Etape 3**

- Si la deuxième étape n'a pas conduit à une germination complète, tester un échantillon de semences supplémentaire avec des températures alternées, 25°/10°C (12 heures et 12 heures) pour les accessions d'origine tempérée et 35°/20°C (12 heures et 12 heures) pour les accessions d'origine tropicale.
- Si l'on applique de la lumière à raison de 12 heures par jour, cela doit coïncider avec le cycle de température élevée.
- Si l'origine de l'accession est inconnue ou douteuse, tester un échantillon de semences à chaque température.

**Etape 4**

- Si la troisième étape n'a pas conduit à une germination complète, ajouter 0,1 à 0,2% de nitrate de potassium ($KNO_3$) au substrat utilisé pour le test avec le régime de températures qui donne les meilleurs résultats aux étapes 2 et 3.

**Etape 5**

- Si la quatrième étape n'a pas conduit à une germination complète, stratifier les semences à 2°C à 6°C pendant huit semaines et tester la germination dans les meilleures conditions déterminées au cours des étapes deux à quatre.

**Etape 6**

- Si la germination complète n'est pas obtenue, estimer la viabilité en utilisant le test au tétrazolium décrit ci-dessous. Les résultats de ce test indiqueront si l'impossibilité d'obtenir une germination complète est due à la présence de semences mortes.
- Si le test au tétrazolium indique que la dormance n'est pas levée et que les semences sont viables, essayer d'autres traitements

pour lever la dormance, comme l'acide gibbérellique ($GA_3$) ou le préchauffage à 40°C pendant trois à sept jours.

**Test de viabilité des semences au tétrazolium**

Le test au tétrazolium peut être utilisé comme une procédure de secours pour identifier des semences viables mais dormantes, qui n'ont pas germé à la fin d'un test de germination. La procédure pour réaliser ce test est indiquée ci-dessous.

Le test au tétrazolium n'est pas un test absolu de viabilité des semences. Pour gagner en crédibilité, le test doit être comparé avec les résultats des tests de germination pour chaque espèce.

***Préconditionnement***

1. Enlever les structures qui recouvrent les graines (glumes, etc.).
2. Préconditionner les semences en les trempant dans l'eau ou en les plaçant en milieu humide à 30°C. Aucun préconditionnement n'est nécessaire quand des semences non germées sont évaluées à la fin d'un test de germination.

***Préparation de la solution de chlorure de tétrazolium***

La solution de tétrazolium doit avoir un pH compris entre 6 et 8 pour obtenir les meilleurs résultats. Pour préparer 1 litre de solution tamponnée de chlorure de tétrazolium :

1. Dissoudre 3,631 g de phosphate de potassium di-hydrogéné ($KH_2PO_4$) dans 400 ml d'eau distillée.
2. Dissoudre 7,126 g de phosphate d'hydrogène disodé ($Na_2HPO_4.2H_2O$) dans 600 ml d'eau distillée.
3. Mélanger les deux solutions pour préparer le tampon.
4. Dissoudre 10 g de 2,3,5,-chlorure de triphényl tétrazolium dans 1 litre de solution tampon.

Pour obtenir une solution de tétrazolium à 0,5%, mélanger une partie de la solution stock avec une partie d'eau distillée. Le chlorure de tétrazolium doit être stocké à l'obscurité et au froid pour de courtes durées.

***Coloration***

1. Couper en deux les semences longitudinalement en passant par l'embryon avec une lame de rasoir.
2. Jeter une moitié de chaque semence et placer l'autre moitié dans la solution de coloration à la concentration recommandée (voir Tableau 5.3) dans un récipient en verre.
3. Placer les récipients dans un incubateur dans une zone obscure à la température et pour la durée recommandées pour chaque espèce (voir Tableau 5.3).
4. Après la coloration, laver les semences plusieurs fois dans de l'eau distillée pour enlever l'excès de colorant.

**Tableau 5.3.** Concentration, températures et durée de coloration au chlorure de tétrazolium (pour les plantes de l'Annexe I du Traité international sur les PGRFA).

| Plante | Espèce | Préconditionnement | Coloration |
|---|---|---|---|
| Aubergine | *Solanum melongena* | Imbiber ou imprégner, 18h | 0,5–1%, 6–24h, 30°C |
| Betterave | *Beta vulgaris* | Imbiber ou imprégner, 16–18h | 1%, 24–48h, 30°C |
| Blé | *Triticum aestivum* | Imbiber ou imprégner, 6–18h | 0,5%, 2–4h, 30°C |
| Choux | *Brassica* spp. | Imbiber ou imprégner, 16–18h | 0,5–1%, 3–6h, 30°C |
| Eleusine | *Eleusine corocana* | Imprégner, 18h, 5°C | 0,5%, 3h, 30°C |
| Fève | *Vicia faba* | Imprégner, 22h | 0,5–1%, 16–24h, 30°C |
| Haricots | *Phaseolus* spp. | Imbiber 18–24h, puis imprégner, 2–3h | 0,5–1%, 6–24h, 30°C |
| Lentille | *Lens culinaris* | Imbiber, 18h, puis imprégner, 2–3h | 1%, 6–24h, 30°C |
| Maïs | *Zea mays* | Imbiber ou imprégner, 18h | 0,5–1%, 2–6h, 30°C |
| Mil | *Pennisetum glaucum* | Imbiber ou imprégner, 6–18h | 0,5–1%, 6–24h, 30°C |
| Niébé | *Vigna unguiculata* | Imprégner, 22h | 0,5–1%, 16–24h, 30°C |
| Orge | *Hordeum vulgare* | Imbiber ou imprégner, 6–18h | 0,5%, 3h, 30°C |
| Pois-chiche | *Cicer arietinum* | Imbiber ou imprégner, 18h | 1%, 6–24h, 30°C |
| Pois | *Pisum sativum* | Imbiber 18–24h, puis imprégner, 2–3h | 0,5–1%, 6–24h, 30°C |
| Riz | *Oryza sativa* | Imbiber ou imprégner, 18h | 0,5%, 3h, 30°C |
| Seigle | *Secale cereale* | Imbiber ou imprégner, 6–18h | 0,5%, 2–3h, 30°C |
| Sorgho | *Sorghum bicolor* | Imbiber, 16h, 30°C | 0,5–1%, 0.5–1h, 40°C |
| Tournesol | *Helianthus annuus* | Imbiber ou imprégner, 18h | 0,5–1%, 3–6, 30°C |
| Triticale | *Triticosecale* | Imbiber ou imprégner, 6–18h | 0,5%, 2–4h, 30°C |

5. Immerger les semences dans une solution de lactophénol (1 litre de lactophénol préparé à partir de 200 ml de phénol, 200 ml d'acide lactique, 400 ml de glycérine et 200 ml d'eau) pendant une à deux heures avant d'évaluer les semences.
6. Evaluer les semences pour leur mode de coloration sous un microscope binoculaire à faible grossissement ; les tissus viables sont colorés en rouge vif. Des taches roses et rouge très foncé indiquent des tissus morts.
7. Classer les semences en trois catégories selon leur mode de coloration :
   - les semences complètement colorées qui sont viables ;
   - les semences qui ne sont pas du tout colorées qui ne sont pas viables ;
   - les semences partiellement colorées qui produiront soit des plantules normales, soit des plantules anormales, selon l'intensité et le mode de coloration (voir ISTA 2005 pour plus d'informations).

Les Figures 5.9 et 5.10 montrent respectivement des patterns de coloration au tétrazolium chez des semences de dicotylédones et de monocotylédones.

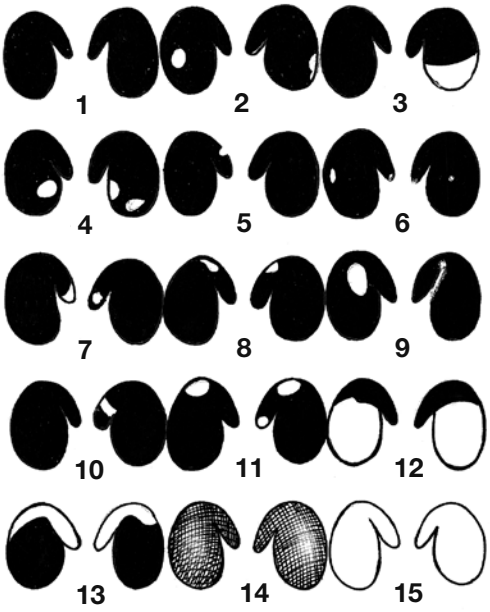



**Figure 5.9.** Pattern de coloration après un test au tétrazolium chez des semences de dicotylédones. Les numéros 1–6 correspondent à des semences qui peuvent germer et les numéros 7–15 à des semences qui ne peuvent pas germer (adapté de AOSA, 2005).

## Documentation

Il est crucial de documenter les données de viabilité pour la gestion efficace des collections de matériel génétique, puisque cela permet au personnel des banques de gènes de prendre des décisions informées sur l'opportunité de régénérer du matériel (voir Chapitre 8). Les descripteurs suggérés pour documenter les informations au niveau d'une accession sur le test de viabilité (germination) incluent les points suivants :

- Nombre de semences testées par réplication
- Nombre de réplications
- Méthode de test de germination employée
- Date du test de germination
- Durée du test (ou jour du premier et du dernier comptage)
- Nombre de graines germées au premier comptage
- Graines dormantes/dures au premier comptage (%)
- Traitements spéciaux de levée de dormance (si employés)
- Germination finale (% de plantules normales)
- Germination anormale (%)
- Semences mortes (%)
- Niveaux de tolérance pour l'exactitude statistique

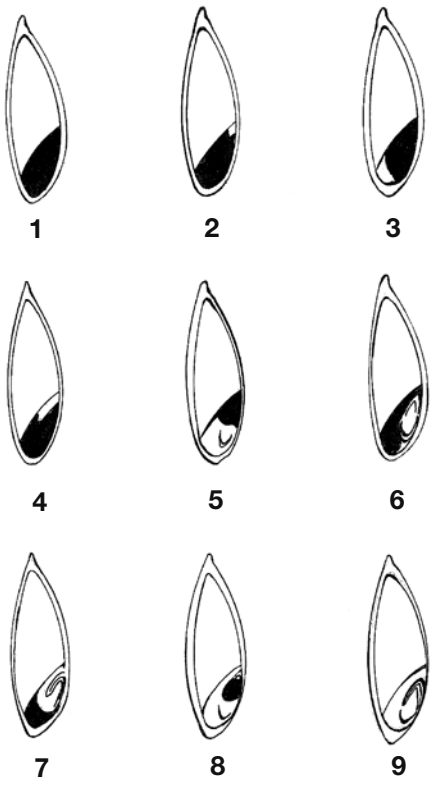



**Figure 5.10.** Pattern de coloration après un test au tétrazolium chez des semences de monocotylédones. Les numéros 1–4 correspondent à des semences qui peuvent germer et les numéros 5–9 à des semences qui ne peuvent pas germer (adapté de AOSA, 2005).

### Lectures complémentaires

Association of Official Seed Analysts. 2005. Rules for testing seeds. Association of Official Seed Analysts, USA.

Baskin, C. C. et Baskin, J. M. (1998) Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego, USA.

Ellis, R.H., Hong, T.D et Roberts, E.H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Volume 1: Principles and methodology. Handbooks for Genebanks. No. 2. IBPGR, Rome, Italie.

FAO/IPGRI, 1994. Genebank standards. FAO and IPGRI, Rome, Italie.

ISTA. 2003. ISTA Handbook for Seedling Evaluation. International Seed Testing Association, Basserdorf, Suisse.

ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edition 2005. International Seed Testing Association, Basserdorf, Suisse.

Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W et Probert, J.R. (eds.). 2003. Seed conservation: Turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew, GB.

## 5.2 Test de l'état sanitaire des semences

### Qu'est-ce que l'état sanitaire des semences ?

L'état sanitaire se réfère à l'état des maladies d'un échantillon de semences et à la présence ou l'absence d'organismes et de ravageurs causant des maladies.

### Qu'est-ce que le test de l'état sanitaire des semences ?

Les tests de l'état sanitaire des semences déterminent le statut d'un échantillon de semences, d'un lot de semences ou d'une accession en ce qui concerne les maladies qui affectent cette plante cultivée ou cette espèce sauvage.

### Pourquoi est-il important de tester l'état sanitaire des semences ?

Les plantes cultivées sont souvent infectées par une gamme de pathogènes communs transmis par les semences qui peuvent ne pas être visibles ou facilement reconnus lors de la collecte des semences. Les inoculums transmis par les semences réduisent la longévité au stockage et causent une faible germination ou un mauvais établissement au champ. Les inoculums transmis par les semences stimulent également les maladies au champ, réduisant ainsi la valeur des plantes cultivées. L'échange de semences infectées peut également permettre la dissémination de maladies et de ravageurs dans de nouvelles régions. Les banques de gènes doivent s'assurer que les semences préparées pour la conservation sont exemptes de maladies et ravageurs transmis par les semences.

### Ravageurs et pathogènes communs transmis par les semences

Il y a quatre groupes principaux d'organismes communs qui sont transportés dans les semences et qui affectent une large gamme de plantes cultivées:

- Champignons
- Bactéries
- Virus
- Insectes

Les méthodes spécifiques pour détecter les pathogènes varient selon l'organisme et l'hôte, et des méthodes spécifiques sont nécessaires pour une identification précise de la plupart des pathogènes.

## Méthodes de détection des ravageurs et pathogènes

### Standard de l'état sanitaire des semences

Examiner un échantillon représentatif de semences pour rechercher la présence de pathogènes en utilisant une ou plus des méthodes ci-dessous. Habituellement, un échantillon de 400 semences en réplications de 100 semences chacune est pris pour l'examen. La taille de l'échantillon peut être diminuée pour les petits lots de semences.

Si le pourcentage de semences infectées est supérieur à 5%, le lot de semences peut être considéré comme impropre à la conservation.

### Examen visuel

La méthode la plus simple pour détecter les maladies et ravageurs est d'examiner des semences sèches à l'œil nu ou sous un microscope à faible grossissement. Cette méthode met en évidence les insectes qui se meuvent librement, les œufs, les acariens, les fructifications fongiques comme les sclérotes, les galles, les boules de charbon, les masses bactériennes et les débris végétaux infectés. L'examen des semences sèches à la lumière ultra-violette ou proche de l'ultra-violet révèle les infections par certains champignons et bactéries par l'émission de fluorescence.

### Evaluation des semences

Les semences doivent être plantées dans du sol stérilisé en serre. Les plantules doivent être observées immédiatement après la germination et toute plante montrant des symptômes ressemblant à ceux d'une contamination virale, tels que la marbrure des feuilles, la défoliation ou le jaunissement, doivent faire l'objet d'un prélèvement et être testées pour les virus (voir ci-dessous). Les plantules infectées par des bactéries ou des champignons peuvent mourir et doivent être examinées par la suite au laboratoire, et les échantillons doivent être étalés sur plaques pour l'identification du pathogène (voir ci-dessous).

Si une infection est suspectée mais qu'aucun symptôme n'a été observé après que la deuxième vraie feuille a émergé, il peut être nécessaire de réaliser des tests sérologiques pour des infections latentes ou asymptomatiques par des virus. La plupart des virus des légumineuses expriment des symptômes manifestes au stade plantule.

### Technique de lavage des semences

Cette technique est utile pour tester des champignons contaminants transmis par les semences comme les charbons, les caries, les oïdiums et les rouilles.

1. Placer 2 g de l'échantillon de semences dans un tube à essai, ajouter 2 ml d'eau stérile et bien mélanger pendant cinq à dix minutes.
2. Centrifuger la solution surnageante à 200 rpm pendant dix minutes et observer les sédiments sous un microscope pour détecter la présence de structures fongiques.

### Méthodes d'incubation

Les méthodes du buvard et de la plaque d'agar sont des moyens simples et peu coûteux de détecter les champignons transmis par les semences qui répondent à la sporulation.

#### Test du buvard

Les tests du buvard sont similaires aux tests de germination, dans la mesure où les semences sont placées sur des couches humidifiées de papier absorbant et incubées dans des conditions qui stimulent la croissance des champignons.

1. Placer au fond de boîtes de Petri stérilisées trois couches de papier absorbant humidifié avec de l'eau stérile.
2. Enlever l'eau en excès et placer à la main ou avec des pinces 20–25 semences.
3. Placer les semences régulièrement pour éviter qu'elles soient en contact.
4. Incuber les semences sous une lumière proche de l'ultra-violet en alternant des cycles de 12 heures d'obscurité/lumière pendant 7 jours à 20±2°C.
5. Examiner les boîtes de Petri avec un stéréomicroscope pour rechercher des champignons se développant sur les semences.

La croissance profuse des plantules peut rendre l'interprétation difficile. Cela peut être évité en ajoutant du sel de sodium de 2,4-D pour fournir une solution de pulvérisation à 2%.

## Méthode de la plaque d'agar

C'est la méthode la plus communément utilisée pour identifier les champignons transmis par les semences. Des champignons différents et même des souches différentes des mêmes champignons requièrent des milieux de croissance et de sporulation différents. La lumière proche de l'ultra-violet, d'une longueur d'onde de 300–380 nm (également appelée lumière noire) peut être nécessaire. Les milieux simples incluent une combinaison de légumes, de sources d'hydrates de carbone ou de sucre et de l'agar et peuvent être confectionnés en mélangeant des légumes bouillis et écrasés avec de l'agar quand des mélanges commerciaux ne sont pas

disponibles. Les milieux les plus couramment utilisés sont l'agar avec pomme de terre et dextrose/saccharose et l'agar farine d'avoine.

1. Préparer le milieu en mélangeant 1 g de poudre de pomme de terre dextrose agar dans 100 ml d'eau distillée.
2. Stériliser le mélange à l'autoclave pendant 15–20 minutes et laisser refroidir jusqu'à 50°C.
3. Verser avec précautions le mélange dans des boîtes de Petri stériles, en soulevant le couvercle seulement pour verser le mélange afin d'éviter les contaminations.
4. Laisser le milieu refroidir et solidifier pendant 20 minutes.
5. Désinfecter les semences en surface en les prétraitant pendant une minute dans une solution à 1% d'hypochlorite de sodium (NaOCl) préparée en diluant 20 parties d'eau de javel domestique avec 80 parties d'eau.
6. Placer environ dix semences (selon leur taille) sur la surface avec des pinces.
7. Incuber les boîtes de Petri à 20–25°C pendant cinq à huit jours.
8. Identifier les pathogènes transmis par les semences sur la base des caractéristiques des colonies et des spores.

Des colonies bactériennes se développent parfois sur l'agar et inhibent la croissance des champignons, rendant l'identification difficile. Ceci peut être surmonté en ajoutant un antibiotique comme la streptomycine (500 ppm) au milieu agar autoclavé, après qu'il ait refroidi jusqu'à 50–55°C.

### Méthode de la réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La PCR est une réaction *in vitro* pour amplifier de manière exponentielle une petite quantité d'une séquence de nucléotides spécifique en présence d'une séquence modèle avec deux amorces d'oligonucléotides qui s'hybrident aux brins opposés et flanquent la région d'intérêt dans l'ADN cible. La réaction est cyclée, incluant la dénaturation du modèle, l'annellation des amorces et l'extension des amorces annelées par l'ADN polymérase, jusqu'à ce qu'un nombre suffisant de copies soient faites pour l'analyse ultérieure. La PCR peut permettre la détection de très petites quantités d'un pathogène dans un échantillon, en amplifiant les séquences du pathogène jusqu'à un niveau détectable. La PCR est particulièrement utile pour détecter les maladies à cause de sa vitesse et de sa précision, mais c'est une technique coûteuse ; elle peut être utilisée pour détecter tout organisme qui a de l'ADN en utilisant des témoins positifs et négatifs pour la comparaison. Une fois que la séquence de l'organisme est connue, des amorces spécifiques peuvent être faites pour détecter des souches de pathogènes.

Les tests d'hybridation des acides nucléiques (appelés southern et northern blot), dans lesquels l'ADN ou l'ARN est transféré d'un gel d'électrophorèse sur une membrane puis les acides nucléiques sont détectés avec une amorce marquée, peuvent également être utilisés. La technique d'hybridation de spots d'acides nucléiques (NASH), dans laquelle un pathogène à l'ADN marqué s'hybride directement avec l'ADN du pathogène immobilisé sur une membrane en nylon, peut également être utilisée sans passer par le stade de la PCR. Ces techniques sont constamment raffinées et de nouvelles procédures deviennent disponibles pour la détection de pathogènes spécifiques. Pour plus d'informations, se référer à Albrechtsen (2005).

## Méthodes sérologiques et autres méthodes

### Essai d'immuno absorption enzymatique (ELISA)

Le test ELISA est une méthode de diagnostic qui utilise des protéines appelées anticorps pour détecter les pathogènes des végétaux. Ce test est basé sur la capacité d'un anticorps à reconnaître et à se lier à un antigène spécifique, une substance associée à un pathogène des végétaux. Les anticorps utilisés dans les diagnostics sont des protéines hautement purifiées, produites en injectant à un animal à sang chaud (comme un lapin) un antigène associé à une maladie des plantes particulière. L'animal réagit à l'antigène et produit des anticorps, qui reconnaissent et réagissent seulement avec les protéines associées à l'agent causal de cette maladie des plantes. Des changements de couleur sur la surface de l'unité indiquent une réaction positive (maladie présente).

Il y a de nombreux types différents d'ELISA qui peuvent détecter la présence d'une protéine. Une description détaillée de ces tests est hors du cadre de cette publication et les personnels des banques de gènes sont invités à se référer à Albrechtsen (2005). Cependant, les procédures générales des deux méthodes les plus communes, plaque recouverte d'antigène (ACP–ELISA) et immuno essai d'empreinte de tissus (TBIA), sont données en Annexe II. Pour plus de détails, se référer à Lin et al. (1990).

### Méthode des plantes indicatrices

Cette méthode est particulièrement utile pour détecter les bactéries et les virus. Des extraits de semences sont préparés et inoculés sur une plante indicatrice comme le tabac. Les pathogènes sont identifiés en se basant sur les symptômes qui se développent. Les plantes indicatrices peuvent également être utilisées pour séparer différents virus au moyen d'une spécificité virus-hôte.

### Documentation

Les descripteurs suggérés pour documenter les informations au niveau d'une accession sur l'état sanitaire des semences incluent les points suivants :

- Source du matériel utilisé pour le test
- Type de matériel (feuille, racine, tige, semence)
- Nombre de plantes échantillonnées et testées par réplication
- Nombre de réplications
- Organismes testés
- Méthode de test
- Date du test
- Durée du test, si approprié
- Maladies identifiées
- Incidence de chaque maladie (%)

#### Lectures complémentaires

Albrechtsen, S.E. 2005. Testing methods for seed-transmitted viruses: Principles and protocols. Oxford University Press, Oxford, GB.

ISTA. 2005. International Rules for Seed Testing. Edition 2005. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.

Lin, N.S., Hsu, Y.H. et Hsu, H.T. 1990. Immunological detection of plant viruses and mycoplasm-like organisms by direct-tissue blotting in nitrocellulose membranes. Phytopathology, 80: 824–828.

## 5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes

### Que sont les transgènes?

Les transgènes sont des gènes qui sont introduits dans un autre organisme ou une autre espèce au moyen de techniques d'ADN recombinant. Les plantes transgéniques portent des transgènes dans leur génome et les transmettent à leur descendance par la reproduction normale.

### Pourquoi déterminer la présence d'un gène/transgène?

L'un des composants les plus importants de la bonne gestion d'une banque de gènes est de réaliser des tests de la présence d'un gène ou d'un phénotype. Ceci est d'une importance critique pour les exigences phytosanitaires, mais cela devient également important pour la détection des transgènes. Il y a tout un nombre de raisons pour lesquelles il est important de détecter la présence d'un gène/transgène dans une accession d'une banque de gènes. Bien que la liste ne soit pas exhaustive, ces raisons incluent :

- des questions règlementaires, particulièrement liées aux aspects phytosanitaires et à la biosécurité, où le pays importateur, et

potentiellement le pays exportateur, a besoin que l'on fasse état de la présence de tels gènes ;
- des situations dans lesquelles la présence d'un tel gène/transgène peut affecter les droits de propriété intellectuelle, soit dans le pays où est située la banque de gènes, soit dans un pays vers lequel l'accession va être envoyée ;
- des questions sociales qui nécessitent que l'identité génétique soit déclarée ou que certains gènes/transgènes soient limités.

**Quand doit-on détecter la présence d'un gène/transgène?**

Il est généralement accepté comme étant mal avisé pour des plantes cultivées contenant des transgènes d'être incorporées dans des collections de matériel génétique. Le risque d'une inclusion par inadvertance peut être classifié comme suit :
- Forte probabilité : plantes typiquement allogames avec des apparentées sexuellement compatibles sur lesquelles des recherches étendues au champ ou une distribution commerciale sont en cours.
- Faible probabilité : typiquement des plantes qui sont fortement auto-pollinisatrices, multipliées végétativement ou des plantes cultivées pour lesquelles l'ingénierie génétique n'a pas encore été réalisée ou en est à ses tout premiers stades.
- Probabilité moyenne : le reste des plantes cultivées.
- Attention immédiate : des plantes cultivées avec des transgènes qui sont déjà distribuées commercialement.
- Attention dans un futur proche : un travail expérimental en champ est en cours ou attendu d'ici un à trois ans.
- Attention pour le long terme : plantes cultivées pour lesquelles aucun travail significatif n'a été réalisé au champ.

Les banques de gènes doivent prendre des mesures proactives pour limiter de risque de gènes exotiques, incluant les transgènes, dans leurs collections *ex situ*. Les accessions qui ne requièrent pas de tests incluent :
- les espèces chez lesquelles aucun événement transgénique (commercial ou de recherche) ne s'est produit ;
- les accessions pour lesquelles aucun transgène commercial n'était présent au moment de l'acquisition (comme le maïs avant 1996) ou pour lesquelles aucun organisme transgénique n'était présent près du site de collecte ;
- les accessions pour lesquelles il y a eu des événements transgéniques, mais pour lesquelles de bonnes pratiques de gestion ont été suivies dans le processus d'accession.

En 2004, le Genetic Resources Policy Committee (GRPC) et le Science Council du GCRAI ont organisé un atelier technique

pour explorer les voies et les moyens de gérer la presence non intentionnelle de transgènes dans des collections de materiel génétique, avec l'objectif de fournir des contributions dans un processus qui permettrait aux banques de gènes des Centres GCRAI d'établir des procédures visant à empêcher l'introgression non intentionnelle de transgènes dans les collections. Suite à cet atelier, un principe conducteur a été préparé et adopté par le GRPC. Pour plus d'informations sur ce sujet, consulter la section politique du site Web de Bioversity, http://www.bioversityinternational.org/About_us/Policies_and_Ethics/index.asp (dernière visite le 20 decembre 2006). Ces principes conducteurs ont également été pris en considération lors de la troisième session du Groupe de travail technique intergouvernemental sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture, qui s'est tenu à la FAO, à Rome, du 26 au 28 octobre 2005. De plus amples informations sur cette réunion sont disponibles sur le site Web de la Commission, http://www.fao.org/waicent/FaoInfo/Agricult/AGP/AGPS/pgr/ITWG3rd/docsp1.htm.

## Procédures pour empêcher le flux de gènes non intentionnel à partir d'organismes génétiquement modifiés (OGM)

Les transgènes et les gènes conventionnels sont sujets aux processus biologiques de mutation, de flux de gènes, d'introgression, de recombinaison et de sélection naturelle. Les meilleurs pratiques pour empêcher l'introgression des gènes conventionnels fournissent donc également une base appropriée pour empêcher l'introgression de transgènes.

Le matériel génétique est soumis au maximum de risques lors de la régénération (voir Chapitre 8) et le contrôle des flux de gènes est essentiel pour assurer l'intégrité génétique. Pour réduire le risque chez les plantes cultivées chez lesquelles des transgènes font communément partie des nouveaux cultivars, il est recommandé d'effectuer la régénération en isolement de toute zone où des plantes transgéniques ont des chances d'être cultivées.

Les informations sur le statut transgénique des plantes cultivées sont essentielles pour déterminer quelles mesures, s'il y en a, sont nécessaires pour confirmer que le matériel génétique est exempt de transgènes. Il est recommandé que :

- tous les résultats soient rendus publiquement disponibles dès qu'ils ont été confirmés ;
- toutes les procédures et les informations associées soient présentées ;

- les autorités appropriées dans le pays d'origine soient informées dans les cas où des transgènes sont détectés ;
- pour les plantes cultivées génétiquement modifiées distribuées commercialement et les plantes en développement expérimental, les banques de gènes maintiennent une base de données des plantes cultivées et de leur statut vis-à-vis de la recherche transgénique.

Une fois qu'il a été déterminé qu'une accession n'a pas besoin d'être testée ou qu'elle a été testée négative, suivre les procédures de régénération et de maintenance appropriées pour conserver l'intégrité génétique, comme pour toutes les accessions.

## Procédures pour tester la présence d'OGM

Les deux méthodes de base pour détecter la présence d'un gène/transgène sont le test ELISA et l'amplification par PCR. Ces deux méthodes ont déjà été décrites et elles sont robustes, bien que chacune présente des avantages et des désavantages. Par exemple, le test ELISA détecte la présence du produit d'un gène (protéine) et nécessite donc un gène exprimé. Des kits de tests sont disponibles dans le commerce pour la plupart des événements commerciaux qui peuvent être utilisés en champ. D'un autre côté, la PCR peut détecter des séquences de gènes qui ne s'expriment pas, dans pratiquement tous les tissus, mais ce test est plus difficile à réaliser et n'est donc pas pratique pour une mise en œuvre au champ. Dans la plupart des cas, la détection d'un résultat positif utilisant une méthode doit être confirmée avec une seconde méthode. Si les matériels sont utilisés au niveau moléculaire pour leur empreinte ou des études de diversité génétique, un test additionnel pour la présence d'un transgène peut être réalisé avec un coût minimal.

Les gènes/transgènes qui doivent être utilisés dans de tels tests incluent les événements majeurs qui sont commercialisés à l'heure actuelle pour l'espèce. Ils peuvent normalement être trouvés sur Internet et sont indiqués dans les tests fournis par les services commerciaux de tests (soit comme kits ELISA ou services PCR). Ils vont changer au fur et à mesure que de nouveaux événements transgéniques sont introduits sur le marché ou que des événements deviennent obsolètes, bien que le besoin de tester puisse continuer pendant un certain temps. Le nombre de semences dans toute accession peut limiter le niveau de détection. De plus amples informations et un guidage technique sur l'échantillonnage et la détection d'OGM peuvent être trouvés sur : www.europa.eu.int/comm/environment/biotechnology/pdf/recom2004_787.pdf.

Une liste mise à jour des méthodes validées est également disponible sur http://biotech.jrc.it.

## Documentation

Les descripteurs suggérés pour documenter les informations au niveau d'une accession sur la présence de transgènes incluent les points suivants :

- Source du matériel pour le test
- Type de matériel (feuille, plantule, semence)
- Nombre de plantes échantillonnées et testées par réplication
- Nombre de réplications
- Transgènes testés
- Méthode de test
- Date du test
- Durée du test, si approprié
- Transgènes identifiés
- Incidence de chaque transgène (%)

1. Introduction
2. Acquisition et enregistrement du matériel génétique
   2.1 Acquisition du matériel génétique
   2.2 Enregistrement du matériel génétique
3. Nettoyage des semences
4. Détermination du taux d'humidité des semences et déshydratation
   4.1 Détermination du taux d'humidité
   4.2 Déshydratation des semences
5. Contrôle de la qualité des semences
   5.1 Test de la viabilité des semences
   5.2 Test de l'état sanitaire des semences
   5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes
6. Empaquetage et stockage des semences
   6.1 Empaquetage des semences
   6.2 Stockage des semences
7. Distribution du matériel génétique
8. Contrôle et régénération du matériel génétique
   8.1 Contrôle du matériel génétique
   8.2 Régénération du matériel génétique

# 6. EMPAQUETAGE ET STOCKAGE DES SEMENCES

## 6.1 Empaquetage des semences

### Qu'entend-t-on par empaquetage des semences ?

L'empaquetage des semences consiste à placer un échantillon de semences compté ou pesé dans un conteneur qui est alors fermé hermétiquement pour stockage ultérieur (voir Diagramme de flux 6.1).

### Pourquoi les semences sont-elles empaquetées ?

Les semences sont empaquetées pour :

- empêcher l'absorption d'eau de l'atmosphère après la déshydratation ;
- garder les accessions séparées et éviter de les mélanger ;
- empêcher les contaminations par les insectes et les maladies.

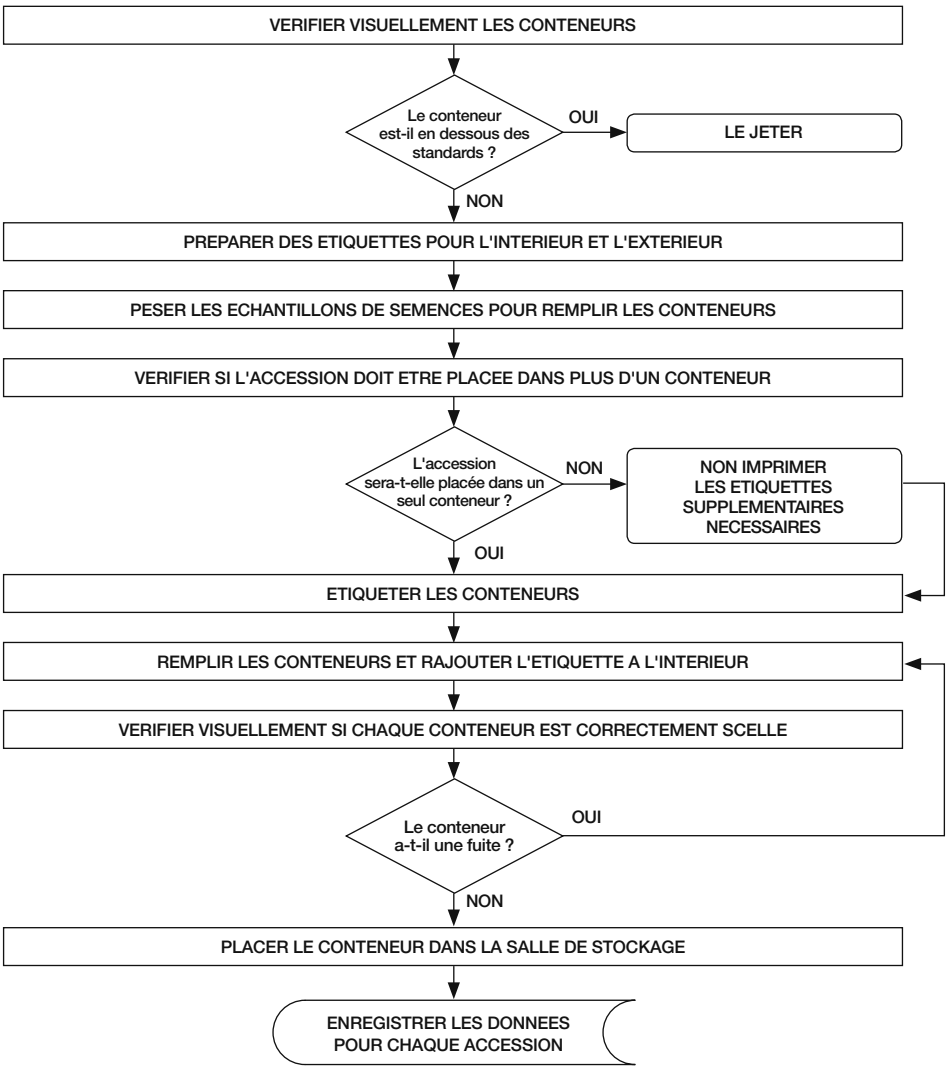
### Quand doit-on empaqueter les semences ?

Le meilleur moment pour empaqueter les semences est immédiatement après qu'on ait déterminé que le taux d'humidité est dans les limites requises pour un stockage en sécurité. Les semences sèches vont réabsorber de l'humidité de l'air ambiant, plus humide. Les semences doivent donc être empaquetées sans retard dans des conteneurs étanches et scellés hermétiquement, après qu'on les ait sorties de la chambre ou de l'enceinte de déshydratation.

### Types de conteneurs

Différents types de conteneurs existent pour l'empaquetage ; le choix dépend des conditions de stockage et de l'espèce. Il est important que le matériel d'emballage soit complètement imperméable à l'eau et qu'il soit adapté à l'utilisation à long terme. Les conteneurs fréquemment utilisés comprennent des bouteilles en verre, des boîtes en aluminium, des sachets en aluminium plastifié et des bouteilles en plastique.

**Diagramme de flux 6.1.** Empaquetage des semences.



Les différents types de conteneurs ont chacun leurs avantages et désavantages. Les bouteilles de verre sont bonnes mais peuvent se casser facilement. Les boîtes en aluminium sont difficiles à resceller une fois qu'elles ont été ouvertes. Les sachets en aluminium peuvent être rescellés et occupent moins de place que les autres conteneurs, mais les semences pointues peuvent les percer et l'humidité peut s'infiltrer à l'intérieur. Les bouteilles en plastique et les boîtes en aluminium sont résistantes à l'humidité mais pas imperméables à l'humidité, à moins qu'elles n'aient un joint serré en plastique. Elles doivent être utilisées avec précautions si l'HR de la pièce de stockage n'est pas contrôlée.

### Test de la qualité des conteneurs

La qualité et la capacité à être scellés des conteneurs peuvent être testées comme suit :

1. Remplir les conteneurs avec du silicagel auto-indicateur régénéré et les sceller comme lorsque l'on stocke des semences.
2. Déterminer avec précision le poids des conteneurs au moyen d'une balance analytique.
3. Maintenir les conteneurs au dessus de l'eau (mais sans qu'ils la touchent) dans un dessiccateur pendant une semaine environ.
4. Sortir les conteneurs du dessiccateur et laisser sécher leur surface.
5. Peser les conteneurs, enregistrer les changements de poids et examiner la couleur du silicagel.
   - Si le poids des conteneurs reste constant, alors ils sont imperméables à l'humidité et ils sont bien scellés.
   - Si le poids des conteneurs augmente et que le silicagel est devenu bleu pâle ou rose, alors ils sont de mauvaise qualité et de l'humidité rentre par l'endroit où ils sont scellés.
6. Ajuster l'étanchéité et répéter le test pour confirmer la qualité des conteneurs.

La qualité d'un conteneur peut aussi être testée en le remplissant d'eau et en le plaçant au dessus de silicagel dans un dessiccateur ou dans une enceinte ventilée à 40°C pendant une à deux semaines. Un changement dans le poids du conteneur indique sa mauvaise qualité ou une fuite à l'endroit où il est scellé.

### Combien doit-on empaqueter de semences ?

Le nombre de semences à empaqueter pour le stockage va dépendre de l'espèce et de la fréquence à laquelle des semences vont être prélevées pour le contrôle, la distribution ou la régénération. Les Standards pour les banques de gènes FAO/IPGRI (1994) indiquent que, pour un matériel qui présente une faible variation morphologique (accessions génétiquement homogènes), le nombre de 3000 graines

Les sachets en aluminium plastifié sont les conteneurs les plus communément utilisés dans banques de gènes parce qu'ils utilisent peu d'espace et qu'il est facile de les resceller. Les sachets en aluminium à utiliser dans les banques de gènes doivent avoir les spécifications suivantes :

- une couche externe de 17 g $m^{-2}$ de Melinex, 4 g $m^{-2}$ de laque ;
- une couche moyenne de 33 g $m^{-2}$ (12 µm) de feuille d'aluminium, 4 g $m^{-2}$ de laque ;
- une couche interne de 63 g $m^{-2}$ de polyéthylène.

est acceptable, mais qu'il est préférable que chaque accession soit représentée par 4000 graines. Pour des matériels montrant une grande variation morphologique (accessions génétiquement hétérogènes), une accession doit comprendre au moins 4000 semences, mais il est préférable de prendre 12 000 semences.

Dans les banques de gènes, il est plus facile de travailler avec des poids, mais le nombre de semences peut facilement être converti à partir des poids, si le poids de 100 ou de 1000 graines est connu. Par exemple, pour déterminer le nombre de semences dans un échantillon pour lequel le poids de 100 graines est connu :

$$\text{Nombre de graines dans l'échantillon} = \frac{\text{Poids de l'échantillon (g)} \times 100}{\text{Poids de 100 graines (g)}}$$

**Exemple :**

Poids de l'échantillon = 275 g
Poids de 100 graines = 12,5 g
Nombre total de graines dans l'échantillon = $\frac{275 \times 100}{12,5} = 2200$

## Comment les semences doivent-elles être empaquetées ?

L'empaquetage est réalisé au mieux dans une pièce climatisée dans laquelle l'HR est contrôlée. Il est important de s'assurer que les semences sorties de la salle de déshydratation soient exposés à l'air ambiant le plus brièvement possible, de telle sorte qu'elles ne réabsorbent pas d'eau.

1. Décider du conteneur le mieux adapté pour stocker les semences. Différents types de conteneurs peuvent être utilisés, selon la taille et la forme des semences et l'objectif de la conservation (soit pour des collections actives ou des collections de base — voir section 6.2).
2. Préparer et étiqueter les conteneurs pour chaque accession ; des étiquettes autocollantes produites à l'ordinateur et des codes barres[11] sont maintenant utilisés dans de nombreuses banques de gènes. L'utilisation de codes barres assure que les informations sont exactes et qu'aucune erreur ne se produit au

[11] Les codes barres sont un système informatisé de codage qui utilise un profil de barres de largeurs différentes pour identifier les accessions de manière unique. Les codes barres sont lus par scannérisation optique du profil imprimé et en utilisant un programme informatique pour décoder le profil. Les données contenues dans un code barre peuvent varier : dans sa forme la plus simple, il peut simplement être un numéro d'accession alors que, dans d'autres cas, le code barre peut contenir des détails plus élaborés de passeport et d'inventaire. L'utilisation de codes barres offre des bénéfices énormes aux banques de gènes, en permettant une capture des données plus rapide et plus précise pour minimiser les erreurs et faciliter la gestion des inventaires.

cours de la transcription. Préparer une étiquette à inclure avec les semences à l'intérieur du conteneur. Les étiquettes doivent contenir les informations suivantes :
   - Numéro d'accession
   - Genre et espèce
   - Numéro de conteneur
   - Poids des semences
   - Date de stockage
3. Peser chaque conteneur vide étiqueté.
4. Remplir le conteneur avec les semences et peser à nouveau. Calculer le poids des semences.
5. Ajouter l'étiquette et sceller immédiatement le conteneur pour protéger les semences de l'HR ambiante élevée.
6. Vérifier la qualité de chaque conteneur après l'avoir scellé par un examen visuel pour s'assurer qu'il n'y a pas de fuites.
7. Tout conteneur qui est en dessous du standard doit être remplacé immédiatement.
8. Placer les conteneurs dans la pièce de stockage.
9. Entrer les données pertinentes sur chaque accession dans le fichier de données. Un modèle de tableau pour enregistrer le poids des semences et du conteneur est proposé ci-dessous.

**Tableau 6.1.** Modèle de tableau pour enregistrer les informations sur l'empaquetage des semences.

| **Date d'empaquetage :** | | | **Nom de l'employé :** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Numéro de l'accession** | **Type de conteneur** | **Numéro du conteneur** | **Poids du conteneur vide** | **Poids du conteneur et des semences** | **Poids des semences** |
| | | 1 | | | |
| | | 2 | | | |
| | | 3 | | | |

## Echantillons de référence (herbariums de semences)

Les herbariums de semences sont utiles pour vérifier les attributs physiques des semences, sans avoir à ouvrir des conteneurs scellés. Empaqueter séparément un petit échantillon (cinq à dix semences ou gousses de légumineuses, ou 5 g de céréales) des semences d'origine dans une enveloppe en plastique transparent que l'on peut resceller ou dans un récipient en verre, pour vérifier l'intégrité génétique après la régénération et pendant le transfert des semences. Les échantillons peuvent être stockés dans une armoire avec des étagères peu espacées. S'assurer que les semences de l'échantillon d'origine ne sont jamais complètement épuisées, afin qu'elles puissent servir de référence pour l'identification.

**Quelques précautions**

- Ne pas mélanger des semences récoltées à des saisons différentes, car la qualité et la longévité des échantillons peuvent être différentes. Assigner des numéros de lots (indiquant la saison de récolte, le site ou le numéro du champ et le numéro de régénération) pour différencier les lots de semences.
- Garder les semences obtenues aux différentes saisons dans des conteneurs séparés ou dans le même conteneur, en utilisant des sacs en tissu ou des sacs en plastique individuels que l'on peut resceller si le conteneur peut les contenir.
- Se souvenir que les conteneurs sortis du stockage au froid ou du réfrigérateur doivent être laissés à se réchauffer jusqu'à température ambiante pour éviter la condensation d'eau sur la surface des semences. Cela peut prendre plusieurs heures, particulièrement pour les semences de grandes dimensions et pour celles venant de températures inférieures à 0°C.
- Les étiquettes auto-adhésives et l'encre utilisée pour le marquage doivent être résistantes à l'eau et très solides.

*Afin d'assurer la conservation à long terme et la disponibilité continue de semences de haute qualité pour leur utilisation, les semences empaquetées dans des conteneurs imperméables à l'humidité doivent être stockées dans des conditions d'environnement contrôlées, comme cela est décrit dans la section suivante.*

**Lectures complémentaires**

FAO/IPGRI, 1994. Genebank standards. FAO and IPGRI, Rome, Italie.

## 6.2 Stockage des semences

### Qu'est-ce que le stockage des semences ?

Le stockage des semences est la conservation des semences dans des conditions d'environnement contrôlées qui maintiennent la viabilité des semences pendant de longues périodes.

La longévité des semences dépend de la qualité initiale des semences, du taux d'humidité et de la température au cours du stockage. En général, un taux d'humidité bas et une température basse réduisent la perte de viabilité des semences. Diverses combinaisons de taux d'humidité et de températures peuvent être utilisées pour prolonger la viabilité des semences pendant le stockage.

## Types de stockage

Deux types d'entrepôts pour les semences sont utilisés pour la conservation des ressources génétiques: ceux qui maintiennent les échantillons de semences pour la sécurité à long terme — auxquels on fait référence sous le terme de *collections de base* — et ceux qui maintiennent les échantillons de semences pour un usage immédiat — auxquels on fait référence sous le terme de *collections actives*. La température, l'HR, le taux d'humidité des semences, les conteneurs et les modalités de distribution varient pour ces deux types d'entrepôts.

### Collections de base

Une collection de base est un groupe d'accessions dans lequel chacune est distincte et aussi proche que possible de l'échantillon d'origine en termes d'intégrité génétique. Normalement, les semences ne sont pas distribuées directement aux utilisateurs à partir des collections de base, mais elles sont seulement utilisées pour régénérer les collections actives (FAO/IPGRI, 1994). Les collections de base sont stockées pour de longues périodes en dessous de 0°C — généralement de -18° à -20°C — pour maintenir la viabilité des semences.

Engels et Visser (2002) ont introduit le terme d'"échantillon le plus original" (MOS) pour qualifier les échantillons dans les collections de base. Un MOS comprend des semences qui ont subi le plus petit nombre de régénérations depuis que le matériel a été acquis par la banque de gènes ; il peut être un sous-échantillon du lot de semences d'origine ou un échantillon de semences du premier cycle de régénération, si le lot de semences d'origine nécessitait une régénération avant le stockage.

### Collections actives

Les collections actives sont constituées d'accessions qui sont immédiatement disponibles pour la distribution. On accède fréquemment à ces accessions qui sont conservées dans des conditions qui assurent une viabilité de plus de 65% pendant 10–20 ans (FAO/IPGRI, 1994). Les combinaisons de température et de taux d'humidité pour le stockage des collections actives qui peuvent assurer une viabilité au dessus de 65% pendant 10–20 ans sont indiquées dans le Tableau 6.2. Il est plus pratique d'utiliser un taux d'humidité plus bas et de stocker à une température plus élevée, pour économiser sur les coûts de réfrigération. Cependant, lorsqu'il n'est pas possible de déshydrater à un taux d'humidité bas, le stockage à un taux d'humidité plus élevé mais à une température plus basse peut être considéré.

**Tableau 6.2.** Température de stockage et taux d'humidité suggérés pour les collections actives (source : Bioversity, non publié).

| Température (°C) | Caractéristiques de stockage | |
|---|---|---|
| | Mauvaises (ex. oignon) | Bonnes (ex. orge) |
| | Taux d'humidité (% poids humide) | |
| 25 | 3 | 7 |
| 20 | 3.5 | 7.5 |
| 15 | 5.0 | 8.0 |
| 10 | 6.0 | 9.0 |
| 5 | 7.0 | 10.0 |
| 0 | 8.0 | 11.0 |

## Organisation des collections

Le principe sous-jacent pour le maintien d'une collection de base ou de MOS est qu'au moins quelques semences de l'échantillon d'origine doivent être mises de côté et conservées dans les meilleures conditions possibles, pour assurer la survie à long terme en sécurité. Cela peut être obtenu en gardant les semences pour la distribution physiquement séparées (comme une collection active) de l'échantillon d'origine, mais il n'y a pas de nécessité absolue de procéder ainsi. Une banque de gènes peut choisir de maintenir un échantillon de chaque accession, à la fois pour la conservation (collection de base) et pour l'utilisation (collection active), tant que le coût de maintenance n'est pas trop élevé. Si la banque de gènes conserve à la fois des collections de base et des collections actives, il est plus rentable de stocker dans la collection active seulement les accessions qui sont utilisés par les sélectionneurs et les autres utilisateurs (Pour de plus amples informations, voir Engels et Visser, 2003.)

### Type d'infrastructure de stockage

Les deux options communément disponibles pour le stockage des semences sont les *chambres froides* et les *réfrigérateurs*. Le choix dépend du nombre d'accessions à stocker, de la taille des semences et des températures de stockage sélectionnées. Lorsque les collections sont petites et que des températures juste en dessous de zéro sont requises, des congélateurs verticaux ou horizontaux représentent une option peu onéreuse pour le stockage des semences.

### Comment l'espace de stockage est-il organisé ?

L'organisation de l'espace de stockage dépend du type d'infrastructure de stockage et du type de conteneurs utilisés dans la banque de gènes. Au vu du coût du maintien du stockage au froid, l'espace doit être optimisé de sorte qu'un nombre maximal d'accessions de semences puissent être stockées.

**Stockage en chambre froide**
Si la banque de gènes a une chambre froide, la meilleure option est d'utiliser des racks mobiles pour maximiser l'espace de stockage. Chaque rack est divisé en un certain nombre d'étagères. La distance entre les étagères dépend de la taille des conteneurs. Les petits récipients ou les sachets en aluminium peuvent être rangés dans des boîtes ou sur des plateaux et placés sur les étagères.

Un système de codage peut aider le personnel de la banque de gènes à localiser facilement les accessions pour retrouver les échantillons ; le codage peut être informatisé dans une base de données ou un système d'inventaire de stocks. Par exemple, "A010201" peut être utilisé pour indiquer la localisation suivante :
- Numéro de salle (si l'on utilise plus d'une salle de stockage) : A
- Numéro de rack : 01
- Numéro d'étagère : 02
- Numéro de plateau/boîte : 01

**Congélateurs horizontaux ou verticaux**
Pour les banques de gènes qui utilisent des congélateurs horizontaux ou verticaux, des conteneurs qui rentrent dans sur des étagères ou dans des boîtes contenant des petits récipients individuels peuvent être utilisés pour stocker les accessions. Comme pour le stockage en chambre froide, un système de codage pour aider à localiser une accession peut être mis en place, incluant le numéro du congélateur, le numéro de rangée et le numéro de boîte.

## Stockage des échantillons de semences

### Etape 1 : Vérifier le nombre de semences dans l'accession
1. Peser les semences de chaque accession. Convertir le poids des semences en nombres en utilisant le poids de 100 graines ou de 1000 graines comme décrit dans la section précédente.
2. Vérifier que l'échantillon contient plus que le nombre requis de semences pour un échantillon génétiquement homogène (3000–4000 semences) ou un échantillon génétiquement hétérogène (4000–12 000 semences).
3. Si l'échantillon contient moins que la quantité requise, soit procéder directement à la régénération, soit le stocker temporairement dans la banque de gènes et le régénérer à la première opportunité (voir Chapitre 8).

### Etape 2 : Identification d'un emplacement pour le stockage
L'étape suivante est de déterminer l'endroit à l'intérieur de la salle de stockage ou du congélateur auquel l'accession va être stockée.

1. Vérifier le fichier d'inventaire pour trouver l'espace disponible suivant pour l'accession.
2. Assigner l'espace auquel l'accession va être placée. Si l'accession est stockée dans plus d'un conteneur, les garder tous ensemble.

### Etape 3 : Placer les semences dans l'espace de stockage

1. Etablir une liste des espaces assignés où chaque accession va être placée.
2. Placer les conteneurs dans la salle de stockage ou le congélateur à leurs places assignées.

### Etape 4 : Entrer les données dans la base de données

1. Entrer les données concernant la place de stockage, la date et le nombre de conteneurs dans le fichier d'inventaire.

### Duplication de sécurité (collection de sauvegarde par sécurité)

La duplication de sécurité signifie qu'un sous-échantillon génétiquement identique de l'accession est stocké à un autre endroit (de préférence en dehors du pays), pour fournir une assurance contre la perte du matériel. La duplication de sécurité inclut à la fois la duplication du matériel et de l'information qui lui est rattachée. Les échantillons pour la duplication de sécurité sont préparés de la même manière que la collection de base :

- Les semences doivent être déshydratées jusqu'à un taux d'humidité de 5±2%, selon l'espèce.
- Les semences doivent être propres et en bon état sanitaire.
- Le pourcentage de germination doit être supérieur à 85%.
- Les semences doivent scellées hermétiquement dans des conteneurs appropriés.

La taille de l'échantillon peut être plus petite, mais elle doit être suffisante pour réaliser au moins trois régénérations (en prenant en compte le facteur de sécurité). Pour gagner du temps, les échantillons prévus pour la duplication de sécurité peuvent être préparés en même temps que l'on prépare les semences pour la collection de base.

Des accords spécifiques doivent être passés avec l'institut destinataire pour conserver un double de la collection. Idéalement, les duplications de collections doivent être maintenues dans les mêmes conditions que les collections de base, pour assurer la survie à long terme, bien que plusieurs types de duplication soient reconnus :

- *Boîte noire* : quand la seule responsabilité de la banque de gènes receveuse est de conserver les doubles sans les manipuler. En plus de fournir les conditions de stockage les meilleures possible, l'institut receveur n'a pas de responsabilité supplémentaire vis-à-vis des échantillons. C'est la responsabilité de l'institut d'origine d'établir un schéma de contrôle de la viabilité et de régénérer la collection lorsque c'est nécessaire. Si les conditions de stockage pour la collection de sauvegarde sont les mêmes que celles de la collection de base, la perte de viabilité peut être prédite à partir des résultats du contrôle de la collection de base. Après la régénération de la collection de base, l'institut d'origine remplace également le double de sécurité. Pour une duplication en boîte noire hors du pays d'origine, une permission spéciale est nécessaire pour exporter les semences, sans *certificats phytosanitaires* du pays d'origine. De manière similaire, les autorités phytosanitaires du pays de destination doivent permettre au destinataire d'importer les semences sans examen de quarantaine de routine.
- *Base* : maintenues dans des conditions adaptées à la conservation à long terme et incorporées dans la collection du receveur.
- *Active* : lorsque le double de la collection est incorporé dans la collection du receveur, et est donc sujet à la régénération, la multiplication et la distribution par le receveur.

**Collection archive**

Les banques de gènes peuvent choisir de stocker les échantillons de matériel génétique qui n'ont pas besoin d'être représentés dans une collection de base ou distribués dans une "collection archive". Ces échantillons sont conservés dans les conditions optimales pour leur survie à long terme, mais sans investissement supplémentaire dans le contrôle et la régénération. Le matériel génétique inclus dans une collection archive peut être :

- des lignées expérimentales protégées par des droits de propriété intellectuelle — les échantillons peuvent être conservés dans des collections boîte noire et restitués à la demande du détenteur des droits de propriété ;
- du matériel génétique qui est en dehors du mandat de la banque de gènes — les échantillons peuvent être stockés temporairement, jusqu'à ce qu'une autre banque de gènes ayant un mandat approprié soit identifiée ;
- des accessions identifiées comme des doublons à la suite d'une rationalisation d'une collection de base existante ;
- des accessions dont on n'a plus besoin dans la collection, suite à une réévaluation du mandat de la banque de gènes ou de matériel abandonné à cause du manque de fonds.

## Documentation

Une bonne documentation de l'empaquetage des semences permet l'accession rapide aux nouveaux échantillons, la réponse à des demandes concernant le matériel génétique conservé et le suivi de la qualité et de la quantité du matériel stocké pour réaliser la régénération et la distribution. Les descripteurs suggérés sont les suivants :

- Conditions de stockage/type de collection
- Type de conteneur, si cela varie dans la banque de gènes
- Nombre de conteneurs
- Quantité totale de semences stockées (en poids ou nombre)
- Date de stockage
- Localisation dans la banque de gènes
- Quantité minimale de semences autorisée (unité de base) pour la dissémination/régénération
- Localisation du double de sécurité, si disponible

### Lectures complémentaires

Cromarty A.S, Ellis, R.H. et Roberts, E.H. 1982. The design of seed storage facilities for genetic conservation. IBPGR, Rome, Italie.

Engels, J.M. et Visser, L. (eds.). 2003. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbook for Genebanks No. 6. IPGRI, Rome, Italie.

FAO/IPGRI, 1994. Genebank standards. FAO and IPGRI, Rome, Italie.

Linington, S. H. 2003. The design of seed banks. Pp. 591–636 in Seed conservation: Turning science into practice. (R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard and R.J. Probert, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, GB.

1. Introduction
2. Acquisition et enregistrement du matériel génétique
   2.1 Acquisition du matériel génétique
   2.2 Enregistrement du matériel génétique
3. Nettoyage des semences
4. Détermination du taux d'humidité des semences et déshydratation
   4.1 Détermination du taux d'humidité
   4.2 Déshydratation des semences
5. Contrôle de la qualité des semences
   5.1 Test de la viabilité des semences
   5.2 Test de l'état sanitaire des semences
   5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes
6. Empaquetage et stockage des semences
   6.1 Empaquetage des semences
   6.2 Stockage des semences
7. Distribution du matériel génétique
8. Contrôle et régénération du matériel génétique
   8.1 Contrôle du matériel génétique
   8.2 Régénération du matériel génétique

# 7. DISTRIBUTION DU MATERIEL GENETIQUE

## Qu'est-ce que la distribution de matériel génétique ?

La distribution de matériel génétique est la fourniture d'échantillons représentatifs d'accessions de semences d'une banque de gènes, en réponse aux demandes des utilisateurs de matériel génétique. En général, les semences sont distribuées à partir des collections actives (voir Diagramme de flux 7.1).

## Pourquoi le matériel génétique est-il distribué ?

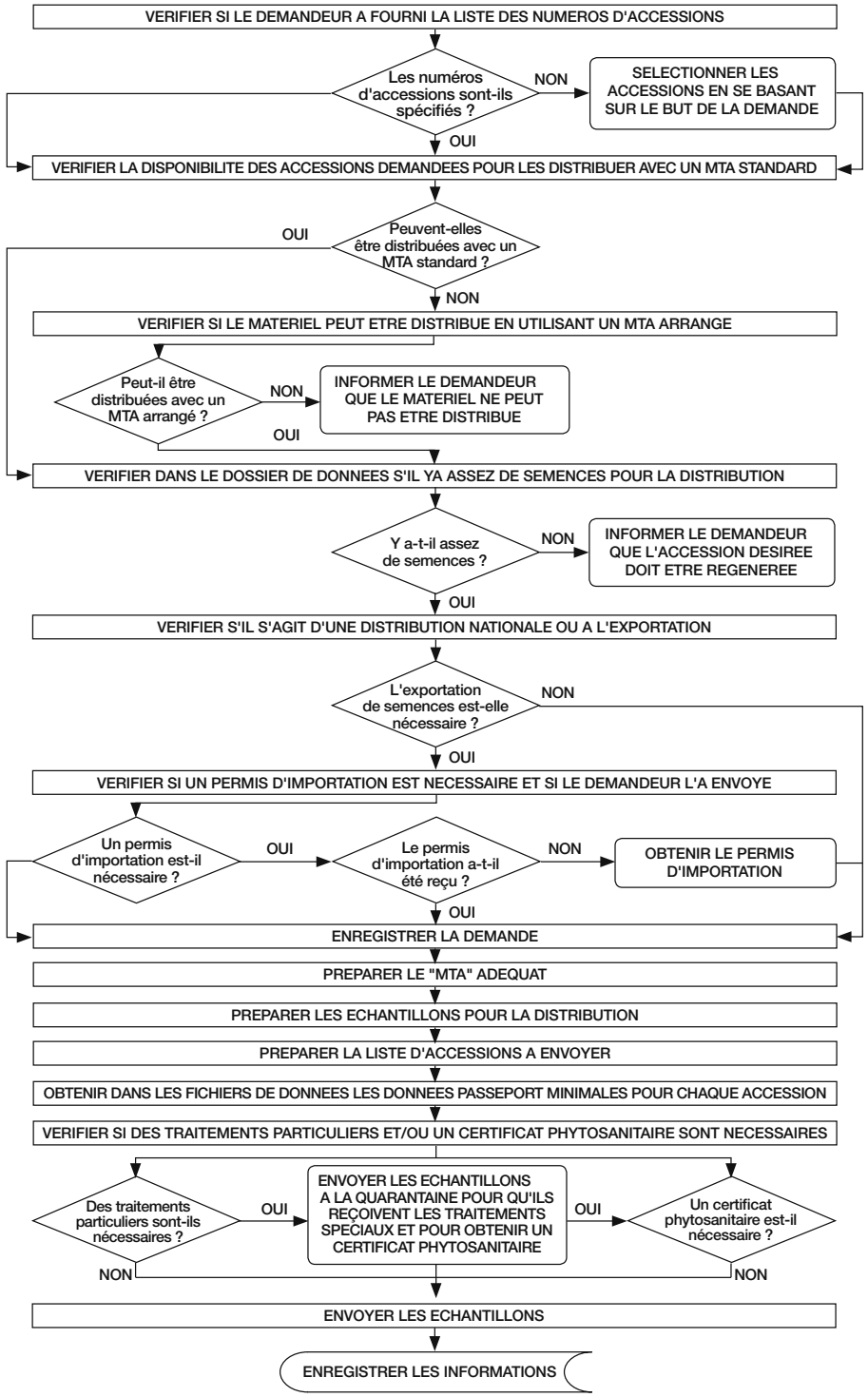
Le but de la conservation de matériel génétique dans une banque de gènes est soit d'améliorer des variétés de plantes cultivées au moyen de la sélection végétale et des activités de recherche liées, soit de restaurer la diversité perdue dans les fermes et dans les habitats naturels, afin de répondre aux besoins des agriculteurs et des communautés. Cela contribue directement à améliorer les moyens de subsistance des pauvres et à protéger l'environnement.

Dans le passé, on n'a pas assez mis l'emphase sur la distribution de matériel génétique. Il est maintenant largement reconnu que l'utilisation du matériel génétique doit conduire sa conservation. Les banques de gènes doivent être plus proactives dans l'établissement de liens avec les utilisateurs de matériel génétique, les sélectionneurs, les chercheurs, les agriculteurs et d'autres groupes.

## Comment le matériel génétique doit-il être distribué ?

Le matériel génétique doit être distribué d'une manière qui assure qu'il atteint sa destination en bon état. Les conditions d'environnement pendant le transport peuvent être néfastes à la qualité des semences ; les semences doivent donc être empaquetées avec soin et distribuées dans des enveloppes scellées résistantes à l'humidité pour être protégées pendant le transit (voir ci-dessous).

**Diagramme de flux 7.1.** Distribution du matériel génétique.



Le cadre et l'étendue de la distribution varient avec chaque banque de gènes. Le matériel génétique peut être distribué à l'intérieur d'un pays ou à l'extérieur, selon le mandat de la banque de gènes et selon que la banque de gènes est nationale, régionale ou globale.

## Procédures pour la distribution à l'intérieur d'un pays

### Etape 1 : Décider si l'accession peut être distribuée

- Vérifier la base de données d'inventaire, pour voir si la quantité de semences dans la banque de gènes est suffisante pour la distribution.
- Distribuer seulement si un minimum de quatre à six fois le nombre de semences nécessaires pour un cycle de régénération reste en stock après avoir répondu à la demande. Une certaine flexibilité peut être permise dans les cas où l'accession est rarement demandée.
- Lorsque la quantité de semences n'est pas suffisante pour la distribution, informer le demandeur que les accessions ne peuvent être fournies qu'après une régénération, et préparer les accessions pour la régénération.
- Vérifier les données passeport pour déterminer le statut du matériel en relation avec l'accès et le partage des avantages selon le Traité international sur les PRGFA et les autres accords internationaux. S'il y a des restrictions concernant la distribution selon l'accord d'acquisition de matériel génétique avec le donateur (voir Annexe I), informer le demandeur en conséquence.

### Etape 2 : Préparer l'échantillon pour la distribution

Si les semences sont disponibles pour la distribution :

1. Enregistrer la demande en lui assignant un numéro de demande.
2. Préparer la liste des accessions disponibles pour la distribution.
3. Vérifier la nécessité d'un accord de transfert de matériel (MTA) ; si le matériel ne peut pas être envoyé avec un accord standard de transfert de matériel, utiliser un MTA adapté aux accessions sélectionnées (voir Annexe I pour de plus amples informations).
4. Préparer deux jeux d'étiquettes pour les accessions sélectionnées et en coller un sur les enveloppes (de préférence en aluminium plastifié) qui vont être utilisées pour envoyer les semences au demandeur.
5. Vérifier le fichier d'inventaire et noter la localisation des conteneurs dans la banque de gènes.
6. Transférer les conteneurs de la banque de gènes dans une pièce déshumidifiée le soir précédent la distribution, pour leur permettre de remonter jusqu'à température ambiante avant ouverture.

S'assurer de l'exactitude absolue de l'identification des accessions lorsque l'on sort les semences de la banque de gènes.

7. Ouvrir le conteneur et transférer rapidement la quantité de semences requise dans les enveloppes étiquetées. Utiliser un échantillonnage au hasard, de telle sorte qu'une bonne représentation de l'accession soit fournie. Il est suggéré que 50–100 semences viables doivent être distribuées pour satisfaire chaque demande, en fonction du système de reproduction de l'espèce (plus pour les espèces à pollinisation croisée et moins pour les espèces autogames).
8. Refermer le conteneur immédiatement après en avoir retiré les semences pour la distribution, pour empêcher l'absorption d'humidité de l'air ambiant.
9. Pour assurer une sécurité supplémentaire, une seconde étiquette doit être placée à l'intérieur des enveloppes avant de sceller les paquets.
10. Comparer la liste des accessions sorties de la banque de gènes avec les étiquettes sur les enveloppes.

### Etape 3 : Préparer la liste d'informations pour accompagner les semences

1. Imprimer la liste finale, incluant les détails du passeport tels que le numéro de l'accession, l'identité alternative, le pays d'origine, la localisation et le statut biologique, de même que les données de caractérisation utilisées pour vérifier les accessions, ainsi que toute information requise par le demandeur.
2. Préparer une lettre de couverture.

Les semences de matériel génétique sont précieuses et elles doivent être empaquetées avec soin pour l'envoi. L'empaquetage doit assurer la sécurité des semences et éviter la contamination par des pathogènes ou des insectes au cours du transit.

### Etape 4 : Envoyer les semences

1. Empaqueter les enveloppes de semences, la lettre de couverture, le MTA et la liste des semences dans un sac en plastique, puis dans une enveloppe renforcée (s'il n'y a que quelques échantillons) ou dans une boîte en carton (utiliser des matériaux de remplissage pour éviter que des dommages soient causés aux semences pendant le transit). Etiqueter les enveloppes ou la boîte avec l'adresse complète du demandeur. Le MTA doit être collé à l'extérieur de l'enveloppe, dans les cas où ouvrir le conteneur et utiliser les semences signifie l'accord avec les termes et les conditions d'accès.
2. Inclure un bulletin réponse à compléter et à retourner à la banque de gènes par le demandeur, pour confirmer que les semences ont été reçues en bon état.
3. Envoyer les colis de semences par les moyens les plus rapides, tels que les sociétés de messagerie, pour éviter les retards et la

détérioration de la qualité des semences au cours du transit. S'il y a la moindre crainte que le matériel puisse être perdu au cours du transport, utiliser le courrier en recommandé ou le transporter à la main si c'est possible.

4. Enregistrer les détails de l'envoi dans le dossier de données de distribution.
5. Mettre à jour l'inventaire des semences en déduisant le poids ou le nombre de semences envoyées.

## Distribution de matériel génétique à l'extérieur du pays

Suivre la même procédure pour sélectionner les accessions et remplir les conditions du MTA comme décrit dans les étapes 1 et 2 ci-dessus. Des exigences supplémentaires peuvent être nécessaires pour la distribution de matériel génétique au-delà des frontières avant de passer aux étapes 3 et 4. Elles concernent le respect des règles phytosanitaires (voir ci-dessous) pour éviter le danger d'introduire des ravageurs et des maladies dans des zones nouvelles.

### Comment les mesures phytosanitaires affectent-elles le mouvement des semences ?

Le mouvement de toute semence peut potentiellement disséminer des parasites.[12] Il existe de nombreux endroits dans le monde où cela s'est déjà produit, avec des effets dévastateurs. Reconnaissant ce danger, tous les pays ont des mesures phytosanitaires pour réglementer l'entrée de plantes, de fragments de plantes et de leurs produits. Il est donc essentiel de se conformer aux exigences nationales du pays importateur, lorsque l'on fait passer à des semences des barrières internationales.

Les envois de matériel génétique infesté par des parasites ou sans la documentation adéquate verront leur entrée refusée ou seront détruits. Le personnel des banques de gènes doit être au courant des règlements phytosanitaires qui gouvernent le mouvement du matériel génétique au delà des frontières.

#### Que sont les mesures phytosanitaires ?

Une mesure phytosanitaire est toute législation, réglementation ou procédure visant à empêcher l'introduction ou la dissémination de parasites pour lesquels il existe une quarantaine, ou limitant l'impact économique de parasites contrôlés sans passage par une quarantaine. Ces mesures sont établies par le pays importateur, après une analyse des risques posés par les parasites selon des standards internationaux.

La documentation officielle requise pour l'exportation de semences inclut un *certificat phytosanitaire* délivré par l'organisme national de protection des plantes ou l'institut officiellement autorisé du pays exportateur, qui certifie que l'envoi est conforme aux règlements

[12] La Convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV) définit les parasites comme tout agent biotique nuisible et potentiellement nuisible, allant des viroïdes aux mauvaises herbes.

phytosanitaires du pays importateur. Les certificats phytosanitaires aident à s'assurer que les denrées sont exemptes de parasites des plantes nocifs après une inspection dans le pays d'origine par un membre de l'organisme chargé de la protection des plantes de ce pays. Le pays qui certifie fait généralement payer chaque certificat.

Lorsque l'on prépare des semences pour la distribution, observer les directives suivantes :

- Vérifier la destination finale et les dernières conditions phytosanitaires d'importation pour le pays importateur (dans de nombreux pays, les règlements sont fréquemment modifiés, cela doit donc être effectué avant chaque expédition — voir "quarantaine post-entrée" au Chapitre 2).
- S'assurer que l'organisme national de protection des plantes dans le pays exportateur fournit les documents appropriés, comme un certificat phytosanitaire officiel, qui se conforme aux exigences du pays importateur.
- Déterminer les procédures à suivre pour obtenir un certificat phytosanitaire dans le pays d'exportation.
- La connaissance des autorités appropriées qui délivrent les certificats assurera le succès à tous les stades.

Des informations phytosanitaires pour de nombreux pays peuvent être trouvées sur le site Web officiel de la Convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV) sur www.ippc.int. Les contacts nationaux de la CIPV doivent être contactés pour :

- déterminer les exigences phytosanitaires pour l'importation de semences ;
- demander une certification phytosanitaire pour l'exportation de semences.

### Procédure pour l'exportation des semences

1. Préparer une liste des accessions dont on a besoin pour satisfaire la demande.
2. Prélever les semences dans la banque de gènes, comme décrit pour la distribution à l'intérieur d'un pays.
3. Demander un certificat phytosanitaire, disponible chez l'organisme national de protection des plantes ou l'institut désigné.
4. Envoyer la demande à l'autorité phytosanitaire appropriée et organiser les traitements et inspections nécessaires pour la délivrance d'un certificat phytosanitaire.
5. Obtenir des déclarations supplémentaires pour des traitements spéciaux, comme demandé par le pays importateur.
6. Lorsque les échantillons sont prêts à être envoyés, préparer une lettre de couverture et une liste finale des accessions, ainsi que les données passeport, les données de caractérisation et toute autre information, comme décrit dans l'étape 3 ci-dessus. Toute accession retenue en quarantaine doit être enlevée de la liste finale.
7. Envoyer les semences à leur destinataire[13] avec le certificat phytosanitaire, toute autre déclaration nécessaire, le MTA et la lettre de couverture.

[13] Dans certains pays, les règlements phytosanitaires stipulent que les envois doivent être adressés directement aux autorités phytosanitaires et non au destinataire, et qu'ils doivent passer par des points d'entrée spécifiques.

8. Se conformer à toute exigence supplémentaire, comme l'obtention d'un *permis d'importation* d'une plante ou un permis CITES pour une espèce menacée (voir Annexe I) avant d'expédier les semences.
9. Enregistrer les détails de l'envoi dans le fichier de données de distribution et mettre à jour l'inventaire des semences en soustrayant le poids ou le nombre de semences envoyées.

Si des traitements obligatoires sont prescrits comme une mesure phytosanitaire, ou que des endos sont requis, ils doivent être fournis par une autorité gouvernementale exactement comme ils ont été requis. Par exemple, une fumigation peut être demandée, les échantillons peuvent devoir être trempés dans un insecticide ou un fongicide, ou un traitement peut être requis par le pays importateur. Les traitements doivent être détaillés sur le certificat phytosanitaire en même temps que tout autre endos demandé par le pays importateur. Si aucun traitement n'est exigé, aucun traitement ne doit être administré car ces traitements peuvent masquer les symptômes causés par des pathogènes transmis par les semences et interférer avec des tests de laboratoire. Un prétraitement effectué avant l'entrée qui va à l'encontre des spécifications du pays importateur peut sérieusement mettre en péril le matériel expédié. Lorsque des échantillons de semences doivent être envoyés à plus d'un pays, il est nécessaire d'obtenir un certificat phytosanitaire pour chaque destination. Deux exemplaires du certificat phytosanitaire doivent être obtenus et l'original doit accompagner l'envoi. Toute modification non certifiée ou rature rendra le certificat phytosanitaire non valide.

Avec l'expansion de la culture de plantes cultivées transgéniques ou modifiées génétiquement, de nombreux pays exigent maintenant un certificat d'une entité indépendante accréditée que le matériel expédié ne contient pas d'OGM (voir aussi l'Annexe I).

### Avis sur l'utilisation du matériel génétique

Obtenir un avis sur l'utilité du matériel envoyé aux utilisateurs à intervalles de six mois. Ceci aidera à identifier les déficiences dans le service et à rester informé sur toute nouvelle caractéristique ou sources de résistance identifiée.

### Documentation

Il est important que les banques de gènes gardent des enregistrements des receveurs de matériel génétique, du nombre d'échantillons envoyés, des détails des accessions et de l'objectif dans lequel la demande a été faite, afin de suivre l'utilisation et d'évaluer l'impact

du matériel génétique distribué. Il est recommandé de conserver ces informations dans deux fichiers avec un champ “lien commun”. Assigner un numéro de référence lorsque l’on enregistre une demande de semences peut servir de champ liant les deux fichiers. Les descripteurs de la distribution peuvent également être organisés en deux fichiers, à savoir :

- un fichier principal avec les détails du demandeur, le numéro des accessions envoyées, etc. ;
- un fichier avec le détail des accessions contenant les informations sur le matériel.

Les descripteurs suivants sont suggérés pour la distribution.

### Fichier principal

- Numéro de référence de distribution
- Adresse du demandeur
- Date de la demande
- Date de la fourniture
- Nombre total d’accessions distribuées
- But de la demande
- Certificat phytosanitaire (si applicable)
- Numéro de permis d’exportation (si applicable)
- Numéro du *permis d’importation* du demandeur (si applicable)

### Fichier avec les détails des accessions

- Numéro de référence de distribution
- Numéro d’accession
- Quantité de semences distribuée
- Statut légal du matériel, en fidéicommis ou sous le Traité international

1. Introduction
2. Acquisition et enregistrement du matériel génétique
   2.1 Acquisition du matériel génétique
   2.2 Enregistrement du matériel génétique
3. Nettoyage des semences
4. Détermination du taux d'humidité des semences et déshydratation
   4.1 Détermination du taux d'humidité
   4.2 Déshydratation des semences
5. Contrôle de la qualité des semences
   5.1 Test de la viabilité des semences
   5.2 Test de l'état sanitaire des semences
   5.3 Test des semences pour l'introduction par inadvertance de transgènes
6. Empaquetage et stockage des semences
   6.1 Empaquetage des semences
   6.2 Stockage des semences
7. Distribution du matériel génétique
8. Contrôle et régénération du matériel génétique
   8.1 Contrôle du matériel génétique
   8.2 Régénération du matériel génétique

# 8. CONTROLE ET REGENERATION DU MATERIEL GENETIQUE

## 8.1 Contrôle du matériel génétique

### Qu'est-ce que le contrôle ?

Le contrôle est la vérification régulière de la qualité (viabilité) et de la quantité (nombre ou poids) des accessions de matériel génétique stockées dans une banque de gènes. L'objectif est de déterminer si la régénération ou la multiplication d'une accession est nécessaire.

### Pourquoi les accessions doivent-elles être contrôlées ?

Les accessions sont contrôlées pour deux raisons principales :

- La viabilité des semences stockées dans la banque de gènes diminue au cours du stockage ; il est important de contrôler la viabilité des accessions pour s'assurer qu'elles ne perdent pas leur capacité de produire des plantes viables lorsque l'on en a besoin.
- Le prélèvement de semences pour la distribution et les tests de germination conduisent à une diminution de la quantité des semences au cours du temps.

Afin d'éviter une détérioration excessive de la qualité ou de la quantité des semences, les accessions d'une banque de gènes doivent être contrôlées, à la fois pour la viabilité et la quantité des semences pendant le stockage.

### A quelle fréquence les accessions doivent-elles être contrôlées ?

La quantité des semences, en nombre ou en poids, doit être contrôlée chaque fois que des semences sont distribuées depuis la banque de gènes. Cela facilite l'identification immédiate des accessions qui ont une quantité insuffisante de semences pour une conservation ultérieure. Les tests de contrôle de la viabilité doivent être conduits régulièrement.

L'intervalle des contrôles dépend de l'espèce, de l'environnement de stockage (taux d'humidité des semences et température) et de la viabilité au début du stockage.

- Les Standards pour les banques de gènes FAO/IPGRI (1994) recommandent que le premier test de contrôle doit être conduit au bout de dix ans, pour des semences stockées dans des collections de base dans les meilleures conditions (-18°C) et ayant une viabilité initiale élevée (>90% de germination).
- Les semences d'espèces qui sont connues comme ayant une faible longévité, qui incluent la plupart des espèces oléagineuses et les accessions avec une viabilité initiale relativement basse (85–90% de germination) dans les collections de base, ainsi que les semences stockées dans les collections actives dans les meilleures conditions (voir Tableau 6.2), doivent être contrôlées pour leur viabilité au bout de cinq ans.
- L'intervalle entre des tests successifs doit être basé sur l'expérience et peut être ajusté positivement ou négativement, selon l'étendue de la perte de viabilité observée lors du premier test de contrôle (voir Tableau 8.1).

**Tableau 8.1.** Intervalle suggéré pour contrôler la germination de collections actives ou de base chez les semences oléagineuses et non oléagineuses.

| Niveau actuel de germination (%) | Intervalle de contrôle (années) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Collection active (4–5°C) | | Collection de base (-20°C) | |
| | Semences non oléagineuses | Semences oléagineuses | Semences non oléagineuses | Semences oléagineuses |
| <80 | 3 | 1 | 5 | 2 |
| 80–85 | 5 | 3 | 10 | 5 |
| 85–95 | 8 | 5 | 15 | 8 |
| >95 | 12 | 8 | 20 | 12 |

## Contrôle de la viabilité

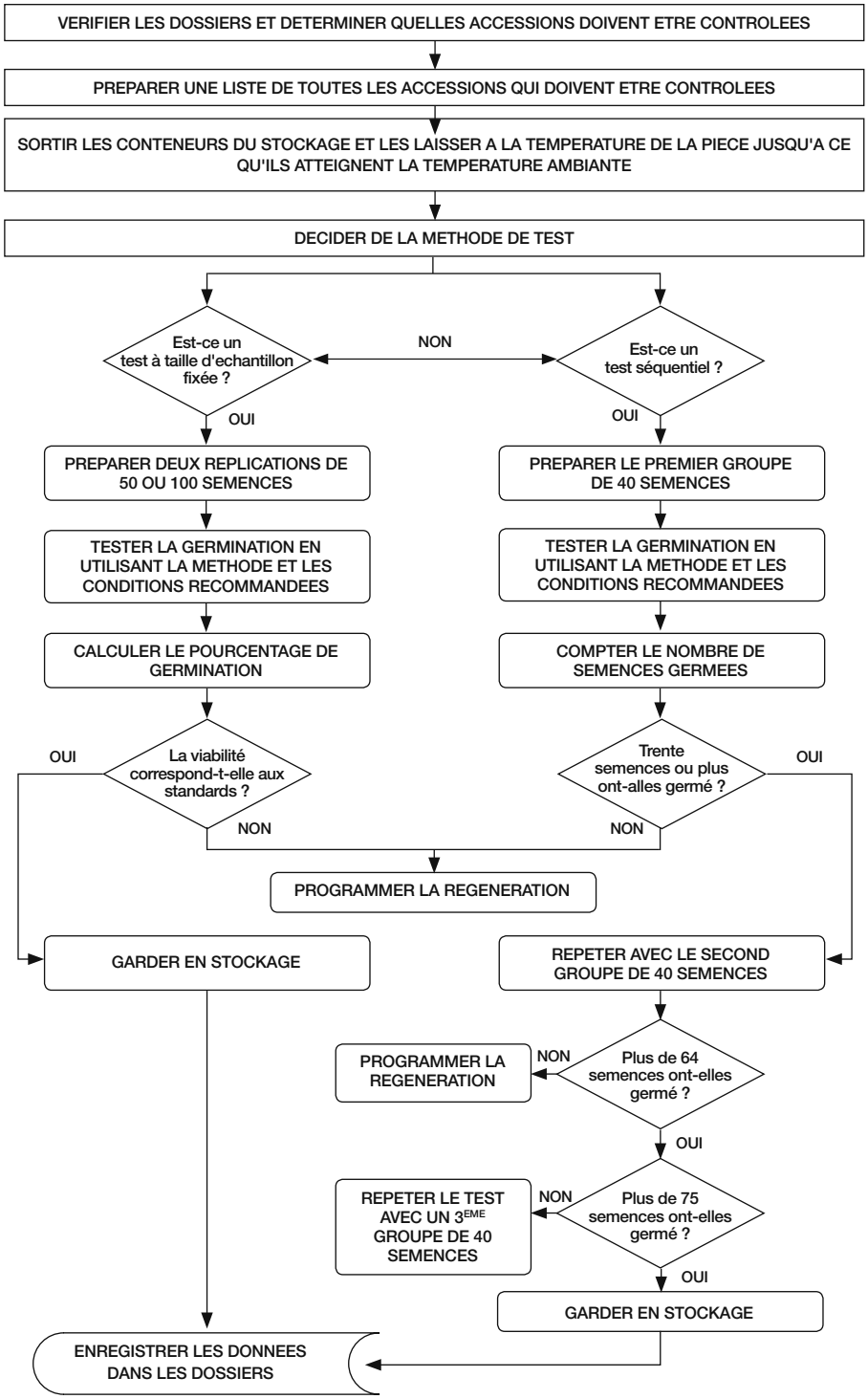
La viabilité est contrôlée en réalisant un test de germination sur un échantillon fixé ou par germination séquentielle (voir Diagramme de flux 8.1).

### Test de germination avec un échantillon de taille fixée

Pour le test de germination avec une taille d'échantillon fixée, il est recommandé d'utiliser un minimum de 200 semences (en deux réplications de 100 semences). Si la quantité est limitée, 50–100 semences peuvent être testées en deux réplications.

1. Identifier et lister toutes les accessions qui ont besoin d'être testées, et planifier les tests sur une base hebdomadaire ou mensuelle (selon la disponibilité en espace dans les germinateurs et les ressources humaines).

**Diagramme de flux 8.1.** Contrôle de la viabilité.



2. Localiser les conteneurs stockés à partir de l'inventaire.
3. Sortir les conteneurs du stockage et les laisser une nuit à température ambiante pour qu'ils remontent en température.
4. Ouvrir chaque conteneur, prélever un échantillon de semences pour le test et immédiatement refermer les conteneurs.
5. Mener les tests de germination en utilisant les méthodes et les conditions décrites dans le Chapitre 5.
6. Calculer le pourcentage moyen de germination à partir des résultats des deux réplications. Répéter le test de germination si la différence entre les deux réplications dépasse 10% ou les limites maximales de tolérance à la probabilité de 2,5% (voir Ellis et al., 1985).
   - Si le pourcentage de germination est au dessus de 85% du pourcentage de germination initial, continuer à stocker l'accession. Fixer la date du test suivant en fonction du pourcentage actuel de germination (voir Tableau 8.1).
   - Si le pourcentage moyen de germination est en dessous de 85% du pourcentage de germination initial, programmer l'accession pour la régénération (voir Tableau 8.2).

**Tableau 8.2**. Pourcentages seuils de germination pour la régénération des accessions.

| Germination initiale | Régénérer si le pourcentage de germination après contrôle est en dessous de |
|---|---|
| 100 | 85 |
| 99 | 84 |
| 98 | 83 |
| 97 | 82 |
| 96 | 82 |
| 95 | 81 |
| 94 | 80 |
| 93 | 79 |
| 92 | 78 |
| 91 | 77 |
| 90 | 77 |
| 89 | 76 |
| 88 | 75 |
| 87 | 74 |
| 86 | 73 |
| 85 | 72 |

## Test séquentiel de germination

Le test séquentiel de germination utilise moins de semences par réplication que le test de germination standard. Autrement, les

méthodes et les conditions de germination sont les mêmes que celles décrites pour le test de germination à taille d'échantillon fixée.

Le nombre de semences nécessaire par réplication peut varier, mais il est recommandé d'utiliser au moins 40 semences par réplication.

1. Conduire le test de germination selon les méthodes décrites dans le Chapitre 5 en utilisant (par exemple) 40 semences.
2. Compter le nombre de semences germées après la période de test prescrite.
3. Comparer les résultats avec le nombre de semences germées dans le Tableau 8.3, en faisant attention à la ligne avec la valeur de 40 dans la première colonne (nombre de semences testées).
   - Si le nombre de semences germées est 29 ou moins, l'accession a besoin d'être régénérée.
   - Si le nombre de semences germées est supérieur à 29, le test doit alors être répété avec un autre échantillon exactement comme décrit ci-dessus.

Se souvenir de mettre à jour la quantité de semences dans la base de données d'inventaire, en déduisant le nombre de semences prélevées pour le test de germination. Mettre aussi à jour les données de germination dans la base de données d'inventaire après que le résultat final a été obtenu.

**Tableau 8.3.** Plan de test séquentiel de germination pour un standard de régénération de 85% lorsque l'on teste la germination de semences par groupes de 40.†

| Nombre de semences testées | Régénérer si le nombre de semences germées est inférieur ou égal à | Répéter le test si le nombre de semences germées est dans l'intervalle de | Stocker si le nombre de semences germées est supérieur ou égal à |
|---|---|---|---|
| 40 | 29 | 30–40 | - |
| 80 | 64 | 65–75 | 76 |
| 120 | 100 | 101–110 | 111 |
| 160 | 135 | 136–145 | 146 |
| 200 | 170 | 171–180 | 181 |
| 240 | 205 | 206–215 | 216 |
| 280 | 240 | 241–250 | 251 |
| 320 | 275 | 276–285 | 286 |
| 360 | 310 | 311–320 | 321 |
| 400 | 340 | - | 341 |

† Lorsque 400 semences ont été testées, le test peut être terminé parce qu'un nombre suffisant de tests a été réalisé pour prendre une décision basée sur des informations.

*Il est important d'utiliser le même nombre de semences lorsque l'on répète le test, pour que les échantillons différents puissent être traités comme des réplications.*

4. Compter le nombre de semences germées lors du second test et additionner ce nombre au résultat du premier test.
5. Comparer les résultats du test avec le nombre de semences germées dans le Tableau 8.3, en suivant la ligne avec la valeur

égale au nombre total de tests utilisés pour tous les tests (80 semences) dans la première colonne (nombre de semences testées).
   - Si le nombre de semences germées est 64 ou moins, l'accession doit être régénérée.
   - Si le nombre de semences germées est supérieur à 75, l'accession peut être gardée en stockage.
   - Si le nombre de semences germées se situe entre 65 et 75, l'accession doit être retestée avec un autre échantillon de 40 semences et les résultats comparés avec la valeur égale au nombre total de semences utilisées dans tous les tests (120 semences) dans le Tableau 8.3.
6. Continuer le test de cette manière, jusqu'à ce qu'une décision concernant la régénération ou la continuation du stockage puisse être prise, ou jusqu'à ce que le test soit répété dix fois.

Pour plus d'informations sur les plans des tests pour d'autres tailles de groupes (20, 25, 50 ou 100 semences) et sur les standards de régénération entre 65% et 85%, se référer à Ellis et al. (1985). Le test séquentiel n'est nécessaire que quand les nombres de semences sont limités. Les plantes à petites graines comme le mil ont normalement des nombres de semences adéquats pour utiliser le test à taille d'échantillon fixée.

## Contrôle de la quantité de semences

La quantité de semences peut être contrôlée en consultant le fichier de données d'inventaire. Cela est plus facile à faire avec un système informatisé de documentation de la banque de gènes.

1. Enregistrer le poids de semences transféré initialement dans la banque de gènes.
2. Enregistrer tous les prélèvements suivants pour la distribution, la régénération et les tests de germination.
3. *Immédiatement* mettre à jour la documentation des stocks de semences, en ajustant le total après tous les prélèvements de semences.
4. Préparer une liste des accessions chez lesquelles le nombre de semences en stockage est tombé sous le niveau critique (généralement le nombre requis pour au moins trois régénérations).

Les accessions de matériel génétique identifiées comme ayant une viabilité faible ou une quantité inadéquate au cours des contrôles doivent être régénérées le plus tôt possible en utilisant la méthode décrite dans la section suivante.

### Documentation

Le contrôle est une activité cruciale dans la gestion d'une banque de gènes car il aide à fournir des informations sur les stocks de semences qui diminuent, les accessions qui ont besoin d'être testées pour leur viabilité et celles qui nécessitent une régénération. Sans véritable documentation des données des activités précédentes de la banque de gènes, un contrôle efficace est difficile à réaliser.

## 8.2 Régénération du matériel génétique

### Qu'est-ce que la régénération du matériel génétique ?

La régénération est le renouvellement des accessions, réalisé en semant et en récoltant des semences qui possèdent les mêmes caractéristiques que l'échantillon d'origine. La régénération du matériel génétique est l'opération la plus critique dans la gestion d'une banque de gènes.

### Pourquoi la régénération est-elle critique pour la gestion d'une banque de gènes ?

La régénération du matériel génétique entraîne des risques pour l'intégrité génétique des accessions de matériel génétique dues aux pressions de sélection, aux croisements extérieurs, aux mélanges mécaniques et à d'autres facteurs. Le risque de perte de l'intégrité génétique est élevé lorsque l'on régénère des accessions de matériel génétique génétiquement hétérogènes. La régénération du matériel génétique est également très coûteuse.

### Pourquoi faut-il régénérer le matériel génétique ?

Le matériel génétique est régénéré pour les objectifs suivants :

#### Augmenter la quantité initiale de semences

Dans les nouvelles collections ou avec le matériel reçus en donation, la quantité de semences reçue par la banque de gènes est souvent insuffisante pour une conservation directe. Les semences peuvent également être de mauvaise qualité à cause d'une faible viabilité ou d'infections. Tous ces matériels requièrent une régénération. Le matériel génétique nouvellement acquis d'origine étrangère peut devoir être régénéré initialement en conditions de confinement ou dans une zone d'isolation, sous la supervision des autorités phytosanitaires nationales, comme décrit dans le Chapitre 2.

#### Restaurer les stocks de semences dans les collections actives et de base

Augmenter les stocks de semences des accessions qui ont :

- une faible viabilité identifiée lors des contrôles périodiques ;
- des stocks insuffisants pour la distribution et la conservation.

Les banques de gènes doivent adopter des standards de régénération élevés (tels que le pourcentage de germination qu'une accession conservée dans une banque peut atteindre avant régénération) afin d'éviter les dérives génétiques résultant de la sélection naturelle des semences ayant une longévité plus grande au sein d'accessions génétiquement hétérogènes. Les Standards FAO/IPGRI pour les banques de gènes (1994) recommandent que la valeur initiale de germination doit dépasser 85% pour la plupart des semences et que la régénération doit également être réalisée quand la viabilité passe en dessous de 85% de sa valeur initiale. La régénération doit être réalisée quand le nombre de semences dans une collection de base tombe en dessous du nombre requis pour effectuer au moins trois cycles de régénération.

- Les collections actives doivent être régénérées à partir des semences d'origine dans une collection de base ; ceci est particulièrement important pour les espèces exogames. Il est également acceptable d'utiliser les semences d'une collection active pour *jusqu'à trois cycles de régénération*, avant de retourner aux semences d'origine (collection de base) (FAO/IPGRI 1994).
- Les collections de base doivent normalement être régénérées en utilisant les semences résiduelles du même échantillon.

**Répondre à des exigences particulières**

Il peut exister des exigences spéciales pour la régénération d'accessions ayant des caractéristiques spéciales que les sélectionneurs et les chercheurs utilisent fréquemment — comme les accessions à haut rendement, résistantes aux maladies et aux ravageurs et les stocks génétiques — ou s'il y a un nombre insuffisant de semences pour un double de sécurité et un rapatriement.

Considérer les facteurs suivants lorsque l'on régénère des accessions de matériel génétique :

- un environnement approprié pour minimiser la sélection naturelle ;
- des exigences particulières, si c'est le cas, pour lever la dormance et stimuler la germination (comme la scarification) ;
- un espacement correct pour une levée optimale des semences ;
- le système reproductif de la plante et le besoin d'une pollinisation contrôlée ou d'un isolement.

## Procédures de régénération

- Si possible, régénérer le matériel génétique dans sa région écologique d'origine. Alternativement, chercher un environnement qui ne sélectionne pas des génotypes au détriment d'autres dans une population.
- Si on ne trouve pas de site approprié, rechercher une collaboration avec un institut qui peut fournir un site approprié, ou régénérer dans un environnement contrôlé tel qu'une chambre de culture.
- Examiner l'environnement biotique dans le contexte d'informations préalables sur les plantes et de l'expérience passée — un environnement biotique inapproprié peut être nuisible pour les plantes, la qualité des semences et l'intégrité génétique d'une accession.

### Sélection des accessions

- La régénération des accessions qui ont une qualité inadéquate (faible viabilité) doit être prioritaire par rapport à celles qui ont un nombre de semences insuffisant.
- La régénération des accessions des collections de base doit être prioritaire par rapport à celle des accessions des collections actives.

## Préparation des parcelles de régénération

### Sol

- La parcelle de régénération doit être aussi uniforme que possible.
- Le champ doit être bien drainé.
- Considérer la nécessité d'une analyse de sol et appliquer les traitements appropriés à la plante et au site (engrais, chaux, irrigation ou lime, irrigation ou solarisation).

### Solarisation

La solarisation consiste à chauffer le sol en le couvrant avec des feuilles de polyéthylène pendant l'été sous les tropiques, pour contrôler les maladies transmises par le sol ; elle est réalisée pendant au moins six semaines au cours de la période la plus chaude de l'année.

1. Cultiver soigneusement le terrain et l'égaliser pour minimiser les protrusions.
2. Donner 50 mm d'irrigation avant d'étaler les feuilles de polyéthylène.
3. Utiliser des feuilles en polyéthylène clair transparent, d'1–2 mm d'épaisseur.
4. Insérer deux côtés de chaque feuille de polyéthylène dans les sillons et enterrer profondément les côtés dans le sol.
5. Placer des poids pour éviter que les feuilles de polyéthylène battent et se déchirent à cause du vent.
6. Lors de la plantation, laisser une zone tampon d'au moins 0,5 m autour des côtés de la zone solarisée pour la dilution de la chaleur près des côtés.
7. Empêcher que de l'eau d'irrigation ne vienne d'autres endroits après la solarisation et lors de la croissance des plantes.

### Mauvaises herbes et ravageurs et maladies contenus dans le sol

- Identifier les mauvaises herbes, les ravageurs et pathogènes par inspection et grâce à l'expérience passée.
- Penser à réduire de tels problèmes pendant la préparation des parcelles de régénération en appliquant les traitements suivants :
    - pulvérisation d'herbicides ;
    - stérilisation du sol ;
    - bêchage pour encourager la germination des mauvaises herbes, suivi par une pulvérisation d'herbicide ;
    - bêchage profond pour tuer les mauvaises herbes émergentes.

### Propreté

- Garder les parcelles absolument exemptes de semences et de plantes étrangères.

- Penser au risque de contamination par du pollen étranger et prendre les mesures appropriées au cours de la préparation de la parcelle, et par des cultures intercalaires et le désherbage à la main.
- S'assurer que la méthode de préparation de la parcelle est appropriée pour la méthode choisie d'établissement des plantes (par exemple des billons et des planches plates).
- Préparer la parcelle de régénération en prenant en compte :
  - le nombre d'accessions à régénérer ;
  - le nombre de plantes par accession ;
  - l'espacement entre les rangées et entre les plantes ;
  - l'accès mécanique pour le désherbage.
- La méthode de préparation dépend de :
  - la structure du sol ;
  - les espèces à semer ou transplanter ;
  - le besoin en tuteurs, pour les plantes grimpantes.

### Préparation des semences

1. Sécher, battre et nettoyer les semences si les échantillons ont été nouvellement acquis.
2. Pour celles en stockage :
   a) Identifier les accessions candidates qui requièrent une régénération ;
   b) Retirer les accessions de la banque de gènes et les laisser remonter en température ;
   c) Prélever les échantillons de semences, en ayant à l'esprit la taille minimale de l'échantillon requis et le niveau actuel de germination.
3. S'assurer de l'exactitude absolue de l'identification des échantillons lorsque l'on sort les semences de la banque de gènes, qu'on les emballe et qu'on étiquète les échantillons de semences. Afin de minimiser les erreurs, il est suggéré d'utiliser des systèmes de gestion des informations informatisés pour produire les étiquettes.

Le nombre minimum de semences pour la régénération peut être estimé à partir de la taille de l'échantillon standard et de la viabilité de l'échantillon, en utilisant l'équation suivante :

Nombre de semences requises pour la régénération = Population de plantes désirée pour la régénération/ (% de germination[14] x % d'établissement attendu au champ[15]).

[14] Les pourcentages de germination et d'établissement au champ sont exprimés en décimales : 95% est exprimé comme 0,95.

[15] L'établissement des plantes au champ est généralement inférieur de 5% au pourcentage de germination dans de mauvaises conditions et inférieur de 1% dans de bonnes conditions.

**Exemple :**

Population de plantes désirée = 150
Pourcentage de germination = 85
Etablissement au champ attendu = 80

$$\text{Nombre de semences à étaler} = \frac{150}{0.85 \times 0.80} = 220 \text{ semences}$$

**Prétraitements des semences**

Un prétraitement spécifique peut être nécessaire pour améliorer la germination des semences et leur établissement. Si les semences sont très déshydratées (taux d'humidité <8%), élever le taux d'humidité par humidification comme décrit dans le Chapitre 5.

- Lever la dormance pour l'espèce ou les accessions (en utilisant la scarification, la stratification, etc.).
- Appliquer un traitement des semences approprié pour réduire les dommages dus aux maladies et aux insectes.
- Inoculer les symbiotes appropriés (traitements avec *Rhizobium* pour les légumineuses).
- Pour les accessions avec un nombre limité de semences, prégermer en conditions contrôlées et transplanter les plantules en pots avec du sol stérilisé et les cultivars en serre en les surveillant avec attention.

## Semis et gestion des cultures

La gestion des cultures pour la régénération diffère des pratiques commerciales normales, chez lesquelles la variation inter-plantes n'est pas une considération primaire.

Pour éviter des pertes importantes d'allèles et maximiser le rendement en semences :

- utiliser 100 plantes ou plus chez les accessions génétiquement hétérogènes ;
- bien prendre en compte les besoins en longueur de jour de l'espèce, ou les plantes risquent de ne pas fleurir ;
- fournir des conditions appropriées pour la croissance pour déclencher une floraison abondante ;
- éliminer la compétition en arrachant les plantes étrangères ;
- s'assurer d'une source en eau stable, en irriguant si nécessaire.

**Date du semis**

- Semer à un moment optimal, de telle sorte que la maturité et la récolte coïncident avec les conditions atmosphériques les plus favorables.

La méiose et l'anthèse sont des stades sensibles du développement des plantes. Il faut prendre soin d'éviter tout stress tel que les températures élevées et la sécheresse.

- S'il y a beaucoup de variations entre les accessions en ce qui concerne le moment de la floraison, classer les accessions par maturité précoce et tardive et adapter les dates de plantation en se basant sur la documentation existante, de telle sorte que toutes les accessions arrivent à maturité dans un environnement uniforme.
- La plantation en se basant sur la maturité rend la gestion des cultures et la récolte commodes.
- Semer en rangs uniformément espacés et avec des espacements uniformes entre les plantes d'un même rang.
- Eviter la compétition pour la lumière et les éléments nutritifs en utilisant de larges espacements.
- Assurer un contrôle total des pathogènes et des ravageurs en utilisant les mesures standards de protection des plantes.
- L'éclaircissement ne doit pas être normalement pratiqué — s'il est nécessaire, éclaircir les plantes au hasard.
- Assurer une absence continue de plantes étrangères aux alentours pendant tout le cycle de régénération, par désherbage à la main ou en utilisant une culture intermédiaire.

**Irrigation**

- Irriguer le champ lorsque cela est nécessaire.
- Ne jamais soumettre les plantes à un stress hydrique.
- Assurer un drainage de l'eau et éviter tout excès d'eau.

Une inspection régulière des plantes est obligatoire pour atteindre ces objectifs.

**Vérifier l'identité d'une accession**

- L'identité d'une accession doit être vérifiée lorsque les plantes sont en train de pousser en comparant :
  - Les données morphologiques dans le système de documentation ;
  - Le matériel de référence tel que des spécimens d'herbier originaux ou des semences.
- L'élimination des types aberrants doit être réalisée avec précautions et seulement lorsqu'il est absolument clair que les plantes aberrantes sont de vrais mélanges d'autres accessions ou variétés.
- Lorsque les matériels sont cultivés en rangs, les plantes qui poussent en dehors des rangs doivent être éliminées.

**Biologie de la pollinisation**

A moins qu'une espèce ne soit autogame obligatoire, un contrôle approprié de la pollinisation doit être appliqué. Un compendium des mécanismes de croisements peut être trouvé sur le site www.bioversityinternational.org/Themes/Genebanks/Species_Compendium/default.asp.

Pour les plantes allogames, l'élimination du pollen étranger peut être obtenu par :

- isolement spatial (ce n'est pas pratique lorsque l'on a affaire à un grand nombre d'accessions de la même espèce, mais c'est très utile lorsque l'on a affaire à un nombre limité d'accessions de nombreuses espèces) ;
- isolement temporel ;
- barrières naturelles ou artificielles — en cultivant les accessions au milieu d'espèces à croissance importante comme le tournesol et le chanvre ;
- ensachement des inflorescences sélectionnées avec des sachets en lin ou en papier à l'épreuve du pollen ou des pollinisateurs et en érigeant des filets temporaires à l'épreuve du pollen et des pollinisateurs autour des parcelles. Une pollinisation manuelle de remplacement est parfois nécessaire pour augmenter la mise à graines.

Les plantes pollinisées par les insectes doivent être cultivées dans des cages en filet ou en nylon avec des ruches spécialement conçues pour les insectes pollinisateurs tels que les abeilles ; une accession de chaque espèce cultivée doit être plantée dans chaque cage. Les insectes pollinisateurs sont lâchés à l'intérieur de la cage au moment de la floraison. Une pollinisation manuelle supplémentaire peut être nécessaire pour améliorer la mise à graines (comme chez les espèces sauvages de tomate et de courgette). Les cages d'isolement peuvent être coûteuses et l'ombrage peut affecter la croissance des plantes. Une solution efficace peut être l'ensachage et la pollinisation manuelle contrôlée. Cependant, si les plantes fleurissent pendant ou à la fin de la saison humide, les sacs de pollinisation peuvent être abîmés par la pluie. L'humidité excessive et l'humidité dans les sacs autour des fleurs peut également conduire à une augmentation des infections bactériennes et fongiques. Dans des conditions d'humidité importante, il vaut mieux étiqueter les fleurs et enlever les sacs dès que la pollinisation est terminée, de telle sorte que les fruits puissent se développer dans les conditions de champ normales.

### Récolte et gestion après récolte

- Récolter à la maturité maximale (après que les semences aient atteint le point de maturité physiologique) :
  - lorsque le maximum de semences sont mûres ;
  - lorsque les semences deviennent tolérantes à la dessiccation et peuvent être battues sans dommages mécaniques ;
  - avant que la détérioration commence ;
  - avant que la dispersion naturelle se produise.

- Echelonner la récolte s'il y a des différences dans la maturité des accessions.
- Récolter des plantes individuelles au sein d'une accession quand il y a des différences dans la floraison et la maturité entre les plantes.
- Mélanger *une proportion égale de semences* des différentes plantes mères pour éviter les effets maternels.
- Les sacs contenant les semences ou les épis récoltés doivent être faits de matériau perméable permettant une bonne circulation de l'air pour la déshydratation.
- Les options pour la récolte dépendent de la plante :
  - Récolter les plantes individuellement, préférablement manuellement. Si l'on récolte à la machine, utiliser une machine spécialement conçue parce que les machines commerciales ne peuvent pas être nettoyées correctement entre deux parcelles de régénération.
  - Récolter les infructescences individuellement à la main.
- Commencer la déshydratation des semences immédiatement après la récolte pour empêcher la déshydratation des semences.
- Si les semences ne peuvent pas être traitées rapidement, elles doivent être placées dans une zone de stockage temporaire, dans un environnement contrôlé tel qu'une pièce climatisée.

## Documentation

La régénération est réalisée comme une résultante des informations générées par le contrôle des semences. Comme les méthodes de régénération varient selon l'espèce, les types de descripteurs utilisés pour enregistrer les informations varient également. Les descripteurs suivants aideront à documenter les données :

- Site de régénération
- Collaborateur (quand applicable)
- Référence de la parcelle
- Date de semis
- Germination au champ
- Nombre de plantes établies
- Jours entre le semis et la floraison
- Système reproductif
- Méthode de contrôle de la pollinisation utilisée
- Date de récolte
- Nombre de plantes récoltées
- Quantité de semences récoltées

### Lectures complémentaires

Ellis, R.H., Hong, T.D. et Roberts, E.H. 1985. Handbook of seed technology for genebanks. Volume 1. Principles and Methodology. Handbooks for Genebanks. No. 2, IBPGR, Rome, Italie.

FAO/IPGRI. 1994. Genebank Standards. FAO and IPGRI, Rome, Italie.

Sackville Hamilton, N.R. et Chorlton, K.H. 1997. Regeneration of accessions in seed collections: A decision guide. (J. Engels, ed.). Handbook for Genebanks No. 5. IPGRI, Rome, Italy.

Thormann, I., Metz, T. et Engels, J.M. 2004. IPGRI species compendium, Version 1.0, December 2004. IPGRI, Rome, Italie. www.bioversityinternational.org/Themes/Genebanks/Species_Compendium/default.asp

**Tableau 8.4.** Comportement reproductif et mécanismes de contrôle de la pollinisation pour la régénération de plantes cultivées importantes.

| Plante | Espèce | Comportement vis-à-vis de la pollinisation (taux de croisement) | Mécanisme de pollinisation | Méthode de régénération |
|---|---|---|---|---|
| Amaranthe | *Amaranthus* spp. | AL | Vent | Isolement ; ensachage |
| Arachide | *Arachis hypogaea* | AU | | |
| Aubergine | *Solanum melongena* | Partiellement AU ; jusqu'à 48% de fécondations croisées naturelles | Insectes | Isolement ; ensachage |
| Avoine | *Avena sativa* | AU | | |
| Betterave | *Beta vulgaris* | AL ; auto-incompatible | Vent, insectes | Isolement spatial, cages grillagées avec pollinisateurs |
| Blé | *Triticum aestivum* | AU | | |
| Buffel grass | *Cenchrus ciliaris* | AL | Vent | Isolement ; ensachage |
| Calebasse | *Lagenaria siceraria* | AL ; monoïque | Insectes | Ensachage et pollinisation manuelle |
| Carotte | *Daucus carota* | AL; protandre | Insectes | Cages grillagées avec pollinisateurs |
| Chicorée | *Cichorium intybus* | AL ; fortement auto-incompatible | Insectes | Isolement spatial ; ensachage; cages insect-proof |
| Choux | *Brassica oleracea* var. *capitata* | AL | Insectes | Cages grillagées avec pollinisateurs |
| Choux fleur | *Brassica oleracea* var. *botrytis* | Principalement AL | Insectes | Ensachage |
| Concombre | *Cucumis sativus* | AL; monoïque | Insectes | Ensachage et pollinisation manuelle |
| Coton | *Gossypium* spp. | Principalement AL ; 10–50% de fécondations croisées naturelles | Insectes | Ensachage ; cages insect-proof |
| Courge | *Cucurbita moschata* | AL ; monoïque | Insectes | Ensachage et pollinisation manuelle |
| Crotalaire | *Crotalaria juncea* | Principalement AU | | |
| Dolique pourpre | *Lablab purpureus* | | | |
| Eleusine | *Eleusine corocana* | AU | | |
| Epinard | *Spinacea oleracea* | AL ; dioïque | Vent | Isolement spatial |
| Fève | *Vicia faba* | Principalement AU ; 4–8% de fécondations croisées | Insectes | Isolement ; ensachage |
| Fraisier | *Fragaria ananassa* | Principalement AL | Insectes | Cages insect-proof |
| Gombo | *Abelmoschus esculentus* | Partiellement AU ; 4–19% de fécondations croisées | Insectes | Isolement ; cages insect-proof ou ensachage |
| Haricot commun | *Phaseolus vulgaris* | Principalement AL ; pollinisation croisée 8-20% | Insectes | Isolement ; cages insect-proof ; ensachage |
| Haricot de Lima | *Phaseolus lunatus* | Principalement AU ; jusqu'à 18% de fécondations croisées naturelle | Insectes | Isolement |
| Haricot mungo | *Vigna mungo* | AU | | |
| Ivraie vivace | *Lolium perenne* | AL | Vent | Ensachage |
| Jarosse gesse | *Lathyrus sativus* | AU ; des niveaux significatifs d'AL peuvent être observés | | Ensachage |
| Laitue | *Lactuca sativa* | Principalement AU ; 1–6% de fécondations croisées naturelles | Insectes | Ensachage ; cages insect-proof |
| Lentille | *Lens culinaris* | AU | | |
| Lin | *Linum usitatissimum* | Normalement AU ; jusqu'à 12% de croisements naturels | Insectes | Isolement ; ensachage |
| Lupin | *Lupinus* spp. | Principalement AU ; une certaine AL peut être observée | Insectes | Isolement ; cages insect-proof ou ensachage |

| Plante | Espèce | Comportement vis-à-vis de la pollinisation (taux de croisement) | Mécanisme de pollinisation | Méthode de régénération |
|---|---|---|---|---|
| Luzerne | *Medicago sativa* | Principalement AL (84–94%) | Insectes (déplacements) | Isolement ; cages grillagées avec pollinisateurs |
| Maïs | *Zea mays* | AU ; Monoïque | Vent | Ensachage de l'épis et pollinisation manuelle avec un mélange de pollen |
| Mélilot blanc | *Melilotus albus* | AU | | |
| Mil | *Pennisetum glaucum* | Principalement AL ; protogyne | Vent | Ensachage ; croisements manuels avec un mélange de pollen |
| Millet des oiseaux | *Setaria italica* | AU | | |
| Moutarde brune | *Brassica juncea* | Principalement AU ; 4–14% de pollinisations croisées | Insectes | Ensachage |
| Niébé | *Vigna unguiculata* | Principalement AU | | |
| Oignon | *Allium cepa* | Principalement AU ; protandre | Insectes | Cages grillagées avec pollinisateurs |
| Orge | *Hordeum vulgare* | AU | | |
| Pastèque | *Citrullus lanatus* | AL ; monoïque | Insectes | Ensachage et pollinisation manuelle |
| Pois | *Pisum sativum* | Principalement AU | | |
| Pois d'Angole | *Cajanus cajan* | Normalement AU ; 5–40% de pollinisations croisées naturelles | Insectes | Isolement ; cages insect-proof ou ensachage |
| Pois-chiche | *Cicer arietinum* | AU | | |
| Poivron, piment | *Capsicum annuum* | Souvent AL ; hétérostylie | Insectes | Ensachage |
| Pomme de terre | *Solanum tuberosum* | Principalement AL | Insectes | Isolement ; ensachage |
| Radis | *Raphanus sativus* | AL ; fortement auto-incompatible | Insectes | Cages grillagées avec pollinisateurs |
| Ricin | *Ricinus communis* | AL; monoïque | Vent | Ensachage et pollinisation manuelle |
| Riz | *Oryza sativa* | AU | | |
| Sainfoin | *Carthamus tinctorius* | AU | | |
| Sarrasin | *Fagopyrum esculentum* | AL ; auto-incompatible | Vent | Ensachage et pollinisation manuelle |
| Seigle | *Secale cereale* | AL ; fortement auto-incompatible | Wind | Bagging and Pollinisation manuelle avec un mélange de pollen |
| Sésame | *Sesamum indicum* | Principalement AU ; jusqu'à 5% de pollinisation croisée | Insectes | |
| Soja | *Glycine max* | AU | | |
| Soja vert | *Vigna radiata* | AU | | |
| Sorgho | *Sorghum bicolor* | Principalement AU ; jusqu'à 1–50% de pollinisations croisées | Vent | Isolement ; ensachage |
| Tabac | *Nicotiana tabacum* | AU | | |
| Tomate | *Lycopersicon esculentum* | Normalement AU ; certaines espèces auto-incompatibles avec AL modérée à élevée | | |
| Tournesol | *Helianthus annuus* | Partiellement AL ; protandre | Insectes | Ensachage et pollinisation manuelle |
| Trèfle violet | *Trifolium pratense* | AL ; fortement auto-incompatible | Insectes | Cages grillagées avec pollinisateurs |
| Triticale | *Triticosecale* | AL | Vent | Isolement ; ensachage |
| Vesce | *Vicia sativa* | AU | | |

AU= Autogame ; AL= Allogame.

# ANNEXE I

## Politiques et cadres internationaux qui influencent l'accès au matériel génétique et son échange

L'assemblage de matériel génétique et sa distribution impliquent essentiellement le mouvement de semences entre des endroits ou des régions différentes. En assemblant du matériel génétique, les banques de gènes acquièrent ou importent du matériel provenant des collecteurs de matériel génétique ou d'autres fournisseurs à l'intérieur ou à l'extérieur du pays. La distribution implique l'exportation d'échantillons de semences à des utilisateurs dans le monde entier. En plus des règlements phytosanitaires décrits dans les Chapitres 2 et 7, les politiques, cadres et accords internationaux suivants influencent l'accès au matériel génétique et son échange.

### Convention sur la diversité biologique (CDB)

La Convention sur la diversité biologique (CDB), qui est entrée en action en décembre 1993, a fourni un cadre légal pour la conservation et l'utilisation durables des ressources phytogénétiques. Avant la CDB, les ressources génétiques étaient considérées comme l'héritage commun de l'humanité et étaient disponibles gratuitement pour leur utilisation sans restrictions. La CDB a affirmé la souveraineté nationale sur les ressources génétiques ; dans l'Article 15, elle a fourni des directives pour l'accès et l'utilisation, incluant un partage juste et équitable des bénéfices découlant de l'utilisation des ressources (www.biodiv.org/convention/articles.asp).

### Code de conduite international pour la collecte et le transfert du matériel phytogénétique

Le Code international, adopté par la conférence de la FAO en 1993, fournit un cadre général pour la collecte et le transfert du matériel génétique. Il établit les responsabilités minimales des collecteurs et des curateurs en ce qui concerne la collecte et le transfert de matériel génétique. Bien qu'il soit un instrument volontaire, le code est compatible avec la CDB et sert de référence aux pays pour établir leurs propres règlements pour la collecte et l'échange de matériel génétique (www.fao.org/ag/agp/agps/pgr/icc/icce.htm).

### Accords d'acquisition de matériel génétique

L'Article 15 de la CDB stipule que l'accès aux ressources génétiques se fera selon des *termes agréés mutuellement* et sous *condition de consentement préalable en connaissance de cause*. Le consentement préalable en connaissance de cause signifie que le pays fournisseur peut permettre ou refuser l'accès au matériel génétique après une requête du demandeur. L'accès se fait selon des termes agréés mutuellement quand le fournisseur et le receveur sont d'accord.

Ceci sous-entend normalement un arrangement contractuel exécuté sur une base bilatérale, qui prend souvent la forme d'un accord d'acquisition de matériel génétique qui précise les termes selon lesquels le matériel génétique est acquis et transféré.

### Traité international et système multilatéral d'accès et de partage des avantages

En 2001, la Conférence de la FAO a adopté le Traité international sur les PGRFA, reconnaissant que : (i) dans tous les pays, l'agriculture dépend largement des PGRFA qui sont originaires d'ailleurs ; (ii) les avancées futures dans l'amélioration des plantes nécessitent l'accès continu à une large base génétique sans restrictions majeures ; (iii) une approche purement bilatérale à l'accès et au partage des avantages n'est pas bien adaptée aux ressources génétiques des plantes alimentaires majeures. Le Traité crée un Système multilatéral d'accès et de partage des avantages qui couvre 64 plantes cultivées et fourragères, et fournit un accès facilité aux ressources génétiques dans le Système multilatéral. Les parties contractantes sont obligées de fournir l'accès dans un but de recherche pour l'agriculture et l'alimentation, d'amélioration et de formation quand :

- elles sont requises de le faire par une autre partie, une entité légale sous la juridiction d'une partie ou par un institut international qui a signé un accord avec l'organe directeur, et
- les PGRFA ont été acquises sous ces termes.

Selon les termes du traité, les pays acceptent que le consentement préalable en connaissance de cause n'est pas requis pour l'accès à une catégorie définie de PGRFA, mais qu'une série de termes acceptés mutuellement vont s'appliquer. L'accord standard de transfert de matériel (SMTA) permet l'accès aux ressources génétiques et établit la partage des avantages base sur des royalties perçues sur les produits commerciaux qui utilisent le matériel obtenu par le système multilatéral. Pour plus de détails, voir www.fao.org/ag/cgrfa/itpgr.htm

### Permis CITES

La Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (CITES) est un accord international entre les gouvernements nationaux qui aide les pays membres à contrôler et surveiller les populations animales et végétales menacées. La CITES régule le commerce et l'échange au travers de permis et de certificats. Lorsque l'on importe des échantillons d'une espèce qui est listée dans les appendices de la CITES, un permis d'importation CITES du pays importateur et un permis d'exportation CITES du pays d'origine doivent être obtenus.

Les espèces couvertes par la CITES sont listées dans trois appendices selon le degré de protection dont elles ont besoin.

1. L'Appendice I liste les espèces qui sont le plus en danger.
2. L'Appendice II liste les espèces qui ne sont pas aujourd'hui menacées mais qui risquent l'extinction sauf si leur commerce est étroitement contrôlé.
3. L'Appendice III est une liste d'espèces pour lesquelles la coopération d'autres pays est nécessaire pour empêcher leur exploitation non durable ou illégale.

Les semences des plantes de l'Appendice II et les semences des hybrides propagés artificiellement des plantes de l'Appendice I sont exemptes de contrôles CITES. Cependant, les plantes issues de semences exemptées sont protégées et nécessitent un permis pour leur importation et leur exportation. La base de données des espèces listées dans la CITES, incluant les trois appendices et les points focaux pour les permis et les certificats est disponible sur www.cites.org.

### Organismes génétiquement modifiés (OGM)

Plusieurs pays ont établi des cadres législatifs pour l'importation et la manipulation des OGM. Ils sont basés en grande partie sur le Protocole de Carthagène sur la biosécurité qui est entré en application en septembre 2003 (voir www.biodiv.org/biosafety/default.aspx). Les autorités nationales de biosécurité, en collaboration avec les autorités phytosanitaires, sont responsables de la délivrance de permis d'importation, de la conduite d'évaluation des risques et de l'application des directives de biosécurité. Les chercheurs qui souhaitent importer des OGM doivent soumettre une demande fournissant : les détails concernant le matériel génétique à introduire, les informations sur les recherches et les tests des OGM en question, et un plan de mesures de sécurité à suivre lors de l'introduction. L'accord est donné si l'autorité nationale détermine que l'OGM ou les produits de l'OGM ne posent pas de risques à l'environnement, à la diversité biologique ou à la santé humaine. Avant l'exportation d'OGM, l'autorisation de l'autorité de biosécurité du pays exportateur est aussi requise. Aucune autorisation d'exportation ne sera donnée si le pays exportateur interdit l'OGM ou le produit de l'OGM.

# ANNEXE II

## Méthodes sérologiques de détection des pathogènes des végétaux

### Procédure générale utilisant l'ACP–ELISA

1. Récolter des échantillons frais de feuilles des plantes à tester et des témoins et peser 0,2 g de chaque. Broyer chaque échantillon de feuilles dans 2 ml de tampon de revêtement (tampon carbonate 0,05 M) +2% p/v polyvinyle pyridine et 0,2% p/v $Na_2SO_3$. Transférer la sève dans un tube Eppendorf étiqueté. Centrifuger pendant cinq minutes à 10 000 rpm.
2. Etiqueter la plaque de microtitration et déposer les échantillons à raison de 100 µl par puits. Couvrir la plaque avec du parafilm et incuber une nuit à 4ºC. Peser 4 g de l'échantillon sain et broyer dans 10 ml de solution saline tamponnée au phosphate avec du Tween (PBST), qui agit comme une solution bloquante. Elle est préparée en dissolvant 80,0 g de NaCl, 2,0 g de $KH_2PO_4$, 11,0 g de $Na_2HPO_4$ and 2,0 g de KCl dans 2000 ml d'eau distillée, en ajustant le pH à 7,4 et en ajoutant 5,0 ml de Tween pour arriver à 10 l. Peser les échantillons et dissoudre. Filtrer au travers de laine de coton et ajuster le filtrat à 80 ml. Utiliser cela pour faire des dissolutions de l'antisérum. Laisser absorber une nuit à 4°C.
3. Préparer une solution de sérum albumine bovine à 0,1% dans du PBST.
4. Rincer la plaque sous un léger courant d'eau du robinet et laver trois fois avec du PBST.
5. Ajouter du PBST à tous les puits de la plaque, à raison de 150 µl par puits. Couvrir la plaque avec du parafilm et incuber pendant 30 minutes à température ambiante.
6. Vider complètement la solution bloquante de la plaque. Sans laver, ajouter l'antisérum dilué ; utiliser 100 µl par puits. Couvrir la plaque avec du parafilm et incuber trois ou quatre heures à température ambiante.
7. Faire la dilution du conjugué de l'enzyme alcaline phosphatase dans du PBST (1/1000 fraîchement préparé).
8. Laver la plaque trois fois avec du PBST, puis ajouter le conjugué dilué en suivant le pattern du diagramme de charge, en commençant avec le plus dilué. Utiliser 100 µl par puits. Couvrir la plaque et incuber une nuit à 4°C.
9. Laver la plaque trois fois avec du PBST.
10. Dissoudre la tablette de substrat (p-NPP, Sigma) dans du tampon substrat (1mg/ml) (diéthanolamine à 10%, pH 9,8, stockée au réfrigérateur).
11. Ajouter le substrat dissous à tous les puits, à raison de 150 µl par puits. Incuber à température ambiante pendant 30 minutes.

Evaluer et noter l'intensité de la couleur de chaque puits avec le lecteur ELISA.

### Procédure générale d'utilisation du test d'immuno-empreinte (TBIA) sur membranes de cellulose

1. Récolter des tissus (feuilles, pétioles, tiges, etc.).
2. Pour les tissus fins comme les feuilles, les rouler en un noyau serré. Pour les échantillons en vrac, les attacher ensemble avec du parafilm.
3. Couper un morceau de membrane de nitrocellulose (NCM), couper le coin supérieur gauche et dessiner une grille avec un marqueur.
4. Tenir les tissus d'une main et, avec l'autre main, couper d'un seul mouvement avec une lame de rasoir neuve pour obtenir une surface plane.
5. Presser doucement mais fermement la surface nouvellement coupée sur un carré de la NCM. Marquer quel matériel a été pressé sur quel carré sur un dessin préparé. Continuer à faire des taches avec les feuilles jusque la grille soit remplie.
6. Laver trois fois la NCM avec du PBST à intervalles de cinq minutes.
7. Diluer l'antisérum dans de la sève saine dans du PBST (dilution 1/500–1/2000) et laisser absorber deux heures à température ambiante ou une nuit à 4°C.
8. Bloquer le NCM dans 2 µg/ml d'alcool polyvinyle dans du PBST et incuber une minute à température ambiante.
9. Laver comme à l'étape 6.
10. Ajouter l'antisérum et incuber une heure à température ambiante.
11. Laver comme à l'étape 6.
12. Ajouter le conjugué anti-lapin (dilution 1/1000–1/5000 dans du tampon conjugué) et incuber une heure à température ambiante.
13. Laver comme à l'étape 6.
14. Ajouter la solution de substrat (NBT/BCIP).
15. Pour arrêter la réaction, laver avec de l'eau dé-ionisée.

# ANNEXE III

## Glossaire

**Accession :** Un échantillon de semences distinct, identifiable de manière unique représentant un cultivar, une lignée de sélection ou une population, qui est maintenu en stockage pour la conservation et l'utilisation.

**Akène :** Fruit sec, non déhiscent à graine unique avec la graine attachée au péricarpe par un seul point unique.

**Banque de gènes :** Un centre dans lequel sont conservées des ressources génétiques dans des conditions adaptées pour prolonger leur vie.

**Base de données :** Un ensemble organisé de données connectées entre elles assemblées pour un but spécifique et conservées dans un ou plusieurs systèmes de stockage.

**Battage :** Le processus de battre les plantes avec une machine ou à la main pour séparer les semences.

**Capsule :** Un fruit sec déhiscent dérive d'un ovaire avec un ou deux carpelles qui s'ouvrent partiellement à maturité.

**Caractérisation :** L'enregistrement de caractères hautement héritables qui peuvent être aisément vus et qui sont exprimés dans tous les environnements.

**Certificat phytosanitaire :** Un certificat fourni par le personnel du service de protection des plantes d'un gouvernement pour vérifier que le matériel est substantiellement exempt de ravageurs et de maladies.

**Code barre :** Un système de codage informatisé qui utilise un motif imprimé ou des barres sur des étiquettes pour identifier des accessions de matériel génétique. Les codes barres sont lus en scannérisant optiquement le motif imprimé et en utilisant un programme informatique pour décoder le motif.

**Collection :** Un groupe d'accessions de matériel génétique maintenu dans un but spécifique dans conditions définies.

**Collection active :** Une collection d'accessions de matériel génétique qui est utilisée pour la régénération, la multiplication, la distribution, la caractérisation et l'évaluation. Les collections actives sont conservées en stockage à court à moyen terme et généralement dupliquées dans une collection de base maintenue en stockage à moyen à long terme.

**Collection de base :** Une collection de matériel génétique qui est conservée en stockage à long terme, en sécurité et qui n'est pas utilisée comme source de distribution en routine. Les semences sont généralement stockées à des températures inférieures à zéro et avec un faible taux d'humidité.

**Collection en champ :** Une collection de matériel génétique maintenue sous la forme de plantes vivantes — du matériel génétique qui serait autrement difficile à maintenir sous forme de semences est communément maintenu dans des collections en champ.

**Collection *in vitro* :** Une collection de matériel génétique maintenue sous la forme de tissus végétaux, allant de protoplastes et de suspensions cellulaires jusqu'à des cultures de cals, des méristèmes ou des embryons.

**Conservation à long terme:** Le stockage de matériel génétique pendant une longue période, comme dans des collections de base ou des duplications de collections. La période de stockage avant que les semences doivent être régénérées varie, mais elle est au moins de plusieurs décades, si ce n'est d'un siècle ou plus. La conservation à long terme se déroule à des températures inférieures à zéro.

**Conservation à moyen terme :** Le stockage de matériel génétique à moyen terme comme dans des collections actives ou de travail ; on assume généralement qu'il y aura peu de perte de viabilité pendant environ dix ans. La conservation à moyen terme se déroule à des températures comprises entre 0 et 10°C.

**Conservation *ex situ* :** La conservation de la diversité biologique en dehors de son habitat naturel — dans le cas des ressources phytogénétiques, cela peut être dans des banques de semences, des banques *in vitro* ou des collections vivantes en champ.

**Contrôle :** La vérification périodique des accessions pour leur viabilité et leur quantité.

**Cultivar :** Une variété de plante cultivée produite par des méthodes d'amélioration scientifique ou de sélection par les agriculteurs.

**Dérive génétique :** Les changements dans la composition d'une population lorsque le nombre d'individus est réduit au dessous de la fréquence de certaines allèles qu'elle contient.

**Descripteur :** Un trait, une caractéristique ou un attribut mesurable et identifiable observé dans une accession qui est utilisé pour faciliter la classification, le stockage, la recherche et l'utilisation des données.

**Dessiccateur :** Un petit récipient en verre avec un couvercle étanche à l'air et contenant un agent dessiccant tel que du silicagel ou du chlorure de calcium, au dessus duquel le matériel à déshydrater est placé sur une plateforme perforée.

**Distribution :** Le processus de fournir des échantillons d'accessions de matériel génétique à des sélectionneurs et d'autres utilisateurs.

**Diversité génétique :** La variété de traits génétiques qui résultent en des caractéristiques différentes.

**Documentation :** La collecte organisée d'enregistrements qui décrivent la structure, le but, le fonctionnement, l'entretien et les demandes de données.

**Dommage du à l'imbibition :** Dommage causé par une absorption rapide de l'eau chez une semence très déshydratée (*voir aussi humidification*).

**Donateur :** Une institution ou un individu responsable de la donation de matériel génétique.

**Données passeport :** Informations de base sur l'origine d'une accession, telles que les détails enregistrés sur le site de collecte, le pedigree et toute autre information pertinente qui aide à l'identification d'une accession.

**Dormance :** L'état dans lequel certaines semences vivantes ne germent pas, même dans des conditions normalement adéquates.

**Duplication de sécurité :** Une duplication d'une collection de base stockée dans les mêmes conditions pour la conservation

à long terme, mais à un endroit différent pour empêcher la perte accidentelle de matériel de la collection de base.

**Echantillon :** Une partie d'une population utilisée pour estimer les caractéristiques de l'ensemble.

**Echantillon au hasard :** Un échantillon tiré au hasard dans un groupe plus important.

**Echantillon le plus original (MOS) :** Un échantillon de semences qui ont subi le nombre de régénération le plus bas depuis que le matériel a été acquis par la banque de gènes, recommandé pour le stockage comme collection de base. Cela peut être un sous-échantillon du lot de semences d'origine ou un échantillon de semences du premier cycle de régénération si le lot de semences d'origine a nécessité une régénération avant le stockage.

**Evaluation :** L'enregistrement des caractéristiques dont l'expression est souvent influencé par des facteurs environnementaux.

**Exploration :** L'action de chercher de la diversité génétique au champ.

**Exogame :** Accouplements contrôlés ou naturels entre des individus sans relations entre eux. Exogame peut également faire référence à une espèce qui possède des barrières spécifiques à l'autofécondation ou qui montre une telle dépression consanguine que les individus consanguins n'atteignent jamais la maturité.

**Follicule :** Un fruit sec, unicellulaire contenant de nombreuses graines consistant en un seul carpelle, déhiscent par une suture ventrale.

**Fruits déhiscents :** Des fruits qui s'ouvrent à maturité pour disséminer leurs semences (*voir follicule, capsule*).

**Fruit indéhiscent :** Fruit qui ne s'ouvre pas à maturité (*voir aussi akène*).

**Funicule :** Une tige par laquelle un ovule ou une graine se rattache à la paroi du fruit.

**Génotype :** La constitution génétique d'une plante ou d'un organisme individuel.

**Germination:** Le processus biologique qui conduit au développement d'une plantule à partir d'une graine. L'émergence de la radicule est le premier signe visible de la germination, mais peut n'être suivi par aucune croissance ultérieure ou par un développement anormal. Selon les règles de l'ISTA, seules les plantules montrant une morphologie normale sont considérées comme ayant germé.

**Germination normale :** Germination au cours de laquelle les plantules montrent toutes les structures racinaires et caulinaires essentielles et sont capables de se développer en plantes matures avec des conditions favorables.

**Humidification :** Le processus par lequel le taux d'humidité de semences très déshydratées est augmenté en les plaçant dans un environnement humide ; l'humidification aide à empêcher les dommages causés aux semences par une absorption rapide de l'eau.

**Humidité absolue :** Quantité de vapeur d'eau présente dans une unité de volume d'air, généralement exprimée en kilogrammes par mètre cube.

**Humidité relative (HR) :** Une mesure de la quantité d'eau présente dans l'air comparée à la quantité la plus grande que peut contenir l'air à une température donnée, exprimée en pourcentage. Elle diffère de *l'humidité absolue*, qui est la quantité de vapeur d'eau présente dans une unité de volume d'air, généralement exprimée en kilogrammes par mètre cube.

**Intervalle de contrôle :** La période de stockage entre deux tests de vérification.

**Inventaire :** Une liste d'échantillons (et leurs caractéristiques) qui sont stockés dans une banque de gènes.

**Isotherme :** Un graphe montrant la relation entre le taux d'humidité des semences et le pourcentage d'humidité relative (*voir aussi isothermes de sorption*).

**Isotherme de sorption :** *Voir isotherme*.

**Lignée de sélection :** Un groupe d'organismes identiques diploïdes ou polyploïdes de pur croisement qui se distinguent d'autres individus de la même espèce par un phénotype et un génotype uniques.

**Liste de descripteurs :** Une collection de tous les descripteurs individuels d'une plante cultivée ou d'une espèce donnée.

**Matériel génétique :** Le matériel génétique qui forme la base physique de l'hérédité et qui est transmis d'une génération à la suivante par les cellules germinales.

**Maturité de masse :** Le stade de développement auquel les semences atteignent leur poids sec maximal.

**Multiplication :** L'échantillon représentatif d'une accession que l'on fait pousser pour multiplier la quantité de matériel conservé pour la distribution.

**Numéro d'accession :** Un identifiant unique qui est assigné par le curateur lorsqu'une accession est entrée dans une collection. Ce numéro ne doit jamais être assigné à une autre accession.

**Organisme génétiquement modifié (OGM) :** Un organisme dont le matériel génétique a été délibérément altéré (*voir aussi plante transgénique*).

**Pathogène :** Un microorganisme vivant tel qu'un virus, une bactérie ou un champignon qui cause une maladie chez un autre organisme.

**Pedigree :** L'enregistrement du lignage d'une lignée génétique ou d'une variété.

**Phénotype :** L'apparence externe d'une plante qui résulte de l'interaction entre sa composition génétique (génotype) et l'environnement.

**Plantes transgéniques :** Des plantes qui ont été modifiées génétiquement en utilisant des techniques d'ADN recombinant pour leur donner de nouvelles caractéristiques. Les plantes transgéniques sont produites en ajoutant un ou plusieurs gènes au génome d'une plante en utilisant un processus appelé transformation.

**Pollinisation :** Le processus dans lequel le pollen est transféré d'une anthère à un stigma réceptif par des agents pollinisateurs tels que le vent, les insectes, les oiseaux, les chauves-souris ou l'ouverture de la fleur elle-même.

**Population :** Un groupe de plantes ou d'animaux individuels qui partagent une zone ou région géographique et qui ont des caractères communs.

**Potentiel hydrique :** Le potentiel chimique de l'eau pour une réaction ou un mouvement. Le potentiel hydrique est important pour la déshydratation des semences parce qu'il mesure la capacité de l'eau à bouger. L'eau bouge toujours de zones à potentiel hydrique élevé vers des zones à potentiel hydrique bas.

**Propagule :** Toute structure ayant la capacité de donner naissance à une nouvelle plante, que ce soit par reproduction sexuée ou asexuée (végétative). Cela inclut les semences, les spores et toute partie du corps végétatif capable d'une croissance indépendante si on la détache du parent.

**Quarantaine :** Le confinement de matériel génétique introduit soumis à des règlements phytosanitaires pour s'assurer qu'il ne transporte pas de maladies ou de ravageurs nocifs pour le pays importateur.

**Race locale :** Un cultivar de plante cultivée qui a évolué au cours de la sélection dirigée par les agriculteurs et qui est spécifiquement adapté aux conditions locales ; les races locales sont généralement génétiquement hétérogènes.

**Ravageur :** Un organisme considéré comme nuisible ou nocif.

**Régénération :** Culture d'une accession de semences pour obtenir un échantillon frais ayant une viabilité élevée et comprenant de nombreuses semences.

**Région micropylaire :** Le point sur une semence qui était l'orifice (pore) de l'ovule.

**Sachets en feuilles d'aluminium plastifiées :** des sachets constitués d'un laminat composé d'un feuillet interne de polyéthylène, d'un feuillet intermédiaire de feuille d'aluminium et d'un feuillet extérieur de polyester.

**Semences dures :** Semences qui ne s'imbibent pas et ne germent pas lorsqu'elles sont placées dans un milieu humide parce qu'elles sont imperméables à l'eau.

**Semences orthodoxes :** Semences qui peuvent être déshydratées jusqu'à une teneur en humidité faible et stockées à basse température sans dommages pour augmenter la longévité des semences.

**Semences récalcitrantes :** Semences qui perdent leur viabilité lorsqu'elles sont déshydratées ou stockées à basse température.

**Silicagel :** Un agent chimique inerte qui absorbe l'eau de son environnement et va relarguer cette eau par évaporation lorsqu'on le chauffe.

**Silique :** Fruit déshydraté, déhiscent et allongé compose de deux carpelles séparés par une partition portent les graines.

**Solarisation :** Une méthode non toxique pour tuer les mauvaises herbes et les insectes ravageurs qui consiste à couvrir le sol avec des couches de plastique clair et à laisser le soleil créer assez de chaleur.

**Standard de régénération :** Le pourcentage de viabilité des semences auquel ou en dessous duquel l'accession doit être régénérée pour produire des semences fraîches.

**Système de gestion de base de données :** une partie de logiciel qui contrôle l'organisation, le stockage, la recherche, la sécurité et l'intégrité des données dans une base de données — elle accepte des demandes de l'application et commande au système opérationnel de transférer les données appropriées. Les principaux vendeurs sont Oracle, IBM, Microsoft et Sybase. MySQL est un produit en source ouverte très populaire.

**Taux d'humidité (par rapport au poids frais) :** Le poids d'humidité libre divisé par le poids de l'eau plus la matière sèche, exprimé en pourcentage.

**Teneur en humidité à l'équilibre :** La teneur en humidité à laquelle une semence est en équilibre avec l'humidité de l'air environnant.

**Test au tétrazolium :** Un test de viabilité dans lequel les semences humides sont imbibées dans une solution de chlorure de triphényl tétrazolium.

**Test de germination :** Une procédure pour déterminer le pourcentage de semences qui sont capables de germer dans un ensemble donné de conditions.

**Test de germination séquentiel :** Une série de tests discontinus dans laquelle la décision de continuer à tester les semences ou à arrêter les tests dépend du résultat cumulatif.

**Test de viabilité :** Un test réalisé sur un échantillon de semences d'une accession qui est conçu pour estimer la viabilité de l'accession entière.

**Trait :** Une qualité ou un attribut reconnaissable qui résulte de l'interaction d'un gène ou d'un groupe de gènes avec l'environnement.

**Transformation :** Altération génétique d'une cellule résultant de l'introduction, de l'absorption et de l'expression d'ADN étranger.

**Transgène :** Un gène utilisé en transformation (*voir plantes transgéniques*).

**Unité de base :** Le nombre de semences nécessaire pour assurer la réussite d'une procédure comme l'enregistrement ou la régénération.

**Variété obsolète :** Une variété de plante que l'on ne cultive plus commercialement.

**Variété :** Une division reconnue d'une espèce, en dessous de la sous-espèce ; elle est différenciable par des caractéristiques telles que la couleur des fleurs, la couleur des feuilles et la taille de la plante. Ce terme est considéré comme un synonyme de *cultivar*.

**Viabilité des semences :** La capacité des semences à germer dans des conditions favorables.

**Vie au stockage :** Le nombre d'années pendant lequel une semence peut être stockée avant que la mort de la semence ne survienne.

# Annexe IV

## Equipement spécialisé pour les banques de semences

*(La liste n'est pas exhaustive et la mention des fournisseurs ne constitue pas nécessairement leur approbation)*

| No | Item | Spécification | Fournisseur |
|---|---|---|---|
| 1 | Balance, analytique | Doit peser jusqu'à quatre décimales, nécessaire pour la détermination du taux d'humidité des semences en utilisant des échantillons de petite taille | **Mettler-Toledo (Schweiz) AG**<br>Im Langacher<br>CH-8606 Greifensee<br>Suisse<br>Tél : (41) 1 944 45 45<br>Fax : (41) 1 944 45 10<br>Email : info.ch@mt.com<br>Web : www.mt.com<br><br>**Ohaus Corporation**<br>P.O. Box 2033<br>19A Chapin Road<br>Pine Brook, NJ 07058<br>USA<br>Tél : (1) 973 377 9000<br>Fax : (1) 973 593 0359<br>Email : Sales@Ohaus.com<br>Web : www.ohaus.com<br><br>**Sartorius AG**<br>Weender Landstrasse 94-108<br>D-37075 Goettingen<br>Allemagne<br>Tél : (49) 551 308 0<br>Fax : (49) 551 308 3289<br>Email : wt.sales@sartoriuscorp.com<br>Web : www.sartorius.com<br><br>**Cole-Parmer Instruments Co.**<br>625 East Bunker Court<br>Vernon Hills, IL 60061-1844<br>USA<br>Tél : (1) 847 549 7600<br>Fax : (1) 847 549 1700<br>Email : sales@coleparmer.com<br>Web : www.coleparmer.com<br><br>**Fisher Scientific**<br>2000 Park Land Dr.<br>Pittsburg, PA 15275-9943<br>USA<br>Tél : (1) 973 467-6511<br>Fax : (1) 800 926 1166<br>Web : www.fishersci.com<br><br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road<br>P.O. Box No. 42,<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91) 171-2699347/2699267<br>Fax : (91) 171-2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com<br><br>**Thomas Scientific**<br>P.O. Box 99<br>Swedesboro, NJ 08085<br>USA<br>Tél : (1) 800-524-0018<br>Fax : (1) 856-467-3087<br>Email : global@thomassci.com<br>Web : www.thomassci.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2 | Balance, détermination de l'humidité | Combine un chauffage avec une technologie de pesée très précise pour fournir une méthode rapide et précise d'analyse de l'humidité | **Mettler-Toledo (Schweiz) AG**<br>Im Langacher<br>CH-8606 Greifensee<br>Suisse<br>Tél : (41) 1 944 45 45<br>Fax : (41) 1 944 45 10<br>Email : info.ch@mt.com<br>Web : www.mt.com<br>**Ohaus Corporation**<br>P.O. Box 2033<br>19A Chapin Road<br>Pine Brook, NJ 07058<br>USA<br>Tél : (1) 973 377 9000<br>Fax : (1) 973 593 0359<br>Email : Sales@Ohaus.com<br>Web : www.ohaus.com<br>**Sartorius AG**<br>Weender Landstrasse 94-108<br>D-37075 Goettingen<br>Allemagne<br>Tél : (49) 551 308 0<br>Fax : (49) 551 308 3289<br>Email : wt.sales@sartoriuscorp.com<br>Web : www.sartorius.com<br>**Hoffman Manufacturing Co.**<br>353 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312-738-3700<br>Fax : (1) 312-738-5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 3 | Chambres froides – moyen/long terme | Chambres froides modulaires faites de panneaux préfabriqués isolants en polyuréthane; les panneaux doivent être épais d'au moins 150 mm et construits pour le stockage à long terme (-20°C) ou de 75 mm d'épaisseur pour le stockage à moyen terme (+5°C) ; plancher isolé et porte résistante articulée ; joint étanche chauffé pour le stockage à long terme, équipée avec un rideau en panneaux de PVC ; environnement contrôlé de -20°C à +10°C ; système de déshumidification pour fournir une HR de 30–40% selon les besoins ; tableau de contrôle indiquant la température et l'HR placé à l'extérieur | **BMIL International, Inc.**<br>61 Broadway<br>Suite 1900<br>New York NY 10006-2701<br>USA<br>Tél : (1) 212 898 9699<br>Fax : (1) 212 514 9234<br>Email : bmil@bmil.com<br>Web : www.bmil.com<br>**Huurre Group Oy.**<br>PO Box 127<br>FIN-33101<br>Tampere<br>Finlande<br>Tél : (358) 20 5555 11<br>Fax : (358) 20 5555 360<br>Email : info@huurre.com<br>Web : www.huurre.com<br>**Foster Refrigerator**<br>Oldmedow Road<br>King's Lynn<br>Norfolk, PE30 4JU<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1553 691122<br>Fax : (44) 1553 691447<br>E-mail : sales@foster-uk.com<br>Web : www.Fosterrefrigerator.co.uk<br>**Watford Refrigeration & Air Conditioning Ltd.**<br>Wiggenhall Industrial Estate<br>Watford, WD1 8AW, UK<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1923 227726<br>Fax : (44) 1923 233525<br>Email : sales@watref.co.uk<br>Web : www.watref.co.uk |
| 4 | Conteneurs<br>a. Sachets en feuilles d'aluminium<br><br>b. Boîtes en aluminium, bouteilles en verre | Sachets en feuilles d'aluminium – laminés, faits de trois couches : polyester à l'extérieur, aluminium au milieu et polyéthylène à l'intérieur, et résistants à la perforation.<br><br>Boîtes, scellées ou avec des couvercles vissants avec un joint en caoutchouc ; Bouteilles en verre avec des couvercles en polypropylène | **Barrier Foil Products Co.**<br>Hollands Mill<br>61 Shaw Heath<br>Stockport, SK3 8BH<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 161 4804007<br>Fax : (44) 161 4747412<br>Email : BARRIERFOIL@aol.com<br>**Embarcadero Home Cannery**<br>2026 Livingston Street<br>Oakland, CA 94606<br>USA<br>Tél : (1) 510 535 2311<br>Fax : (1) 510 535 2235<br>Email : contact_ehcan@hotmail.com<br>Web : www.ehcan.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 5 | Enregistreurs de données | Enregistrement continu de la température et de l'HR dans les chambres froides et les congélateurs et permettant d'enregistrer des données au champ | **OAKTON Instruments**<br>P.O. Box 5136,<br>Vernon Hills, IL 60061,<br>USA<br>Tél : (1) 888 462 5866<br>Fax : (1) 847 247 2984<br>Email : info@4oakton.com<br>Web : www.4oakton.com |
| 6 | Déshumidificateur | Type rotatif avec un rotor de dessiccation hautes performances avec du silicagel activé ou un autre agent dessiccant | **Bry-Air Inc.**<br>10793 St. Rt. 37W<br>Sunbury, Ohio 43074<br>USA<br>Tél : (1) 740 965 2974<br>Fax : 740 965 5470<br>Email : bryair1@aol.com<br>Web : www.bry-air.com<br>**Munters Limited,**<br>Blackstone Road<br>Huntingdon<br>Cambridgeshire PE29 6EE<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1480 432243<br>Fax : (44) 1480 413147<br>Email : info@munters.co.uk<br>Web : www.munters.com |
| 7 | Appareil à distiller | Eau distillée pour tests de germination, etc. | **Cole-Parmer Instruments Co.**<br>625 East Bunker Court<br>Vernon Hills, IL 60061-1844<br>USA<br>Tél : (1) 847 549 7600<br>Fax : (1) 847)549 1700<br>Email : sales@coleparmer.com<br>Web : www.coleparmer.com<br>**Fisher Scientific**<br>2000 Park Land Dr.<br>Pittsburg, PA 15275-9943<br>USA<br>Tél : (1) 973 467 6511<br>Fax : (1) 800 926 1166<br>Web : www.fishersci.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road<br>P.O. Box No. 42,<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91) 171 2699347/2699267<br>Fax : (91) 171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com<br>**Thomas Scientific**<br>P.O. Box 99<br>Swedesboro, NJ 08085<br>USA<br>Tél : (1) 800 524 0018<br>Fax :(1) 856 467 3087<br>Email : global@thomassci.com<br>Web : www.thomassci.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 8 | Enceinte/chambre de déshydratation | Déshumidificateurs rotatifs à absorption avec un équipement de réfrigération secondaire qui peut fournir un environnement de 15°C et 15–20% HR pour la déshydratation des semences | **Bry-Air Inc.**<br>10793 St. Rt. 37W<br>Sunbury, Ohio 43074<br>USA<br>Tél : (1) 740 965 2974<br>Fax : (1) 740 965 5470<br>Email : bryair1@aol.com<br>Web : www.bry-air.com<br>**Hoffman Manufacturing Co.**<br>353 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Huurre Group Oy. PO Box 127**<br>FIN-33101<br>Tampere<br>Finlande<br>Tél : (358) 20 5555 11<br>Fax : (358) 20 5555 360<br>Email : info@huurre.com<br>Web : www.huurre.com<br>**Munters Limited,**<br>Blackstone Road<br>Huntingdon<br>Cambridgeshire PE29 6EE<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1480 432243<br>Fax : (44) 1480 413147<br>Email : info@munters.co.uk<br>Web : www.munters.com<br>**Watford Refrigeration & Air Conditioning Ltd.**<br>Wiggenhall Industrial Estate<br>Watford WD1 8AW<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1923 227726<br>Fax : (44) 1923 233525<br>Email : sales@watref.co.uk<br>Web : www.watref.co.uk |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 9 | Balance électronique | Pesant jusqu'à deux décimales – nécessaire à divers stades du processus de manipulation des semences | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com<br>**Cole-Parmer Instruments Co.**<br>625 East Bunker Court<br>Vernon Hills, IL 60061-1844<br>USA<br>Tél : (1) 847 549 7600<br>Fax : (1) 847 5491700<br>Email : sales@coleparmer.com<br>Web : www.coleparmer.com<br>**Fisher Scientific**<br>2000 Park Land Dr.<br>Pittsburg, PA 15275-9943<br>USA<br>Tél : (1) 973 467 6511<br>Fax : (1) 800 926 1166<br>Web : www.fishersci.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road<br>P.O. Box No. 42,<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91)171 2699347/2699267<br>Fax : (91)171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com<br>**Thomas Scientific**<br>P.O. Box 99<br>Swedesboro, NJ 08085<br>USA<br>Tél : (1) 800 524 0018<br>Fax : (1) 856 467 3087<br>Email : global@thomassci.com<br>Web : www.thomassci.com |
| 10 | Congélateurs (verticaux/ horizontaux) | Congélateurs domestiques standards, fournissant -20°C pour la conservation à long terme des semences | Disponibles localement (ex. Revco, Kelvinator, Westinghouse et autres) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 11 | Enceinte de germination (germinateur) | Germinateurs fournissant des niveaux d'HR très élevés, éclairés, avec contrôle du cycle diurne permettant une sélection indépendante de la température et l'humidité relative jour/nuit. | **Controlled Environments Limited**<br>590 Berry Street<br>Winnipeg, Manitoba<br>Canada R3H 0R9<br>Tél : (1) 204 786 6451<br>Fax : (1) 204 783 7736<br>Email : sales@conviron.com<br>Web : www.conviron.com<br>**Hoffman Manufacturing Co.**<br>353, 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany, OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022, W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com<br>**Weiss Gallenkemp Ltd.**<br>Willowbank House,<br>84 Station Road<br>Marlow,<br>Buckinghamshire SL7 1NX<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1494 43 43 24<br>Fax : (44) 1494 43 43<br>Web : www.weisstechnik.co.uk |
| 12 | Système de positionnement global (GPS) | Portable et se tenant à la main pour emporter lors des missions de collecte | **Garmin International Inc.**<br>1200 East 151st Street<br>Olathe, KS 66062-3426<br>(Kansas City metro area)<br>USA<br>Tél : (1) 913 397 8200<br>Fax : (1) 913 397 8282<br>Web : www.garmin.com |
| 13 | Broyeur (moulin à café) | Doit pouvoir broyer de petites quantités de semences pour la détermination du taux d'humidité | Disponibles localement (Braun, Moulinex, etc) |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 14 | Incubateur | Avec contrôle des cycles diurnes permettant une sélection indépendante des températures jour/nuit | **Percival Scientific, Inc**<br>505 research Drive<br>Perry, Iowa 50220<br>USA<br>Tél : (1) 515 465 9363<br>Fax : (1) 515 465 9464<br>Email : info@percival-scientific.com<br>Web : www.percival-scientific.com<br>**Weiss Gallenkemp Ltd**<br>Willowbank House,<br>84 Station Road<br>Marlow,<br>Buckinghamshire SL7 1NX<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1494 43 43 24<br>Fax : (44) 1494 43 43<br>Web : www.weisstechnik.co.uk<br>**Cole-Parmer Instruments Co.**<br>625 East Bunker Court<br>Vernon Hills, IL 60061-1844<br>USA<br>Tél : (1) 847 549 7600<br>Fax : (1) 847 549 1700<br>Email : sales@coleparmer.com<br>Web : www.coleparmer.com<br>**Fisher Scientific**<br>2000 Park Land Dr.<br>Pittsburg, PA 15275-9943<br>USA<br>Tél : (1) 973 467 6511<br>Fax : (1) 800 926 1166<br>Web : www.fishersci.com<br>**Thomas Scientific**<br>P.O. Box 99<br>Swedesboro, NJ 08085<br>USA<br>Tél : (1) 800 524 0018<br>Fax : (1) 856 467 3087<br>Email : global@thomassci.com<br>Web : www.thomassci.com |
| 15 | Lampe grossissante | Nettoyage des semences | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353, 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany, OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022, W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 16 | Humidimètres<br>a. Mesure rapide | Mesure rapide du taux d'humidité | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com |
| | b. Hygropalm | Mesure de l'humidité non destructrice | **Rotronic Instruments (UK) Ltd**<br>Unit 1a, Crompton Fields, Crompton Way, Crawley, West Sussex, RH10 9EE<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1293 571000<br>Fax : (44) 1293 571008<br>Web : www.rotronic.co.uk |
| 17 | Etuve (mécanique/ convection par gravité) | Gamme de températures de 30°C à 200°C, avec convection par ventilateur et contrôle de la température avec thermostat réglable et minuteur | **Cole-Parmer Instruments Co.**<br>625 East Bunker Court<br>Vernon Hills, IL 60061-1844<br>USA<br>Tél : (1) 847 549 7600<br>Fax : (1) 847 549 1700<br>Email : sales@coleparmer.com<br>Web : www.coleparmer.com<br>**Fisher Scientific**<br>2000 Park Land Drive<br>Pittsburg, PA 15275-9943<br>USA<br>Tél : (1) 973 467 6511<br>Fax : (1) 800 926 1166<br>Email : sales@fishersci.com<br>Web : www.fishersci.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road<br>P.O. Box No. 42,<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91) 171 2699347/2699267<br>Fax : (91) 171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com<br>**Thomas Scientific**<br>P.O. Box 99<br>Swedesboro, NJ 08085<br>USA<br>Tél : (1) 800 524 0018<br>Fax : (1) 856 467 3087<br>Email : global@thomassci.com<br>Web : www.thomassci.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 18 | Table de pureté | Nettoyage des semences | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353, 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany, OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél :: (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road<br>P.O. Box No. 42<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91) 171 2699347/2699267<br>Fax : (91) 171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com |
| 19 | Machine à sceller (boîtes, sachets d'aluminium) | Machines à chaleur constante qui utilisent des contrôleurs thermostatiques pour maintenir la barre à une température sélectionnée pour sceller les matériels laminés faits de couches de film plastique ayant des propriétés et des points de fusion différents | ***Sachets en feuilles d'aluminium***<br>**Audion Elektro BV**<br>P.O. Box 389<br>1380 AJ WEESP<br>Pays Bas<br>Tél : (31) 294 491717<br>Fax : (31) 294 491761<br>Email : holland@audion.nl<br>Web : www.aud.com<br>**Hulme-Martin Tavak**<br>317 Guildford Road<br>Bisley<br>Woking<br>Surrey GU24 9BB<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1483 476767<br>Fax : (44) 1483 486343<br>Web : www.hulmemartin.co.uk<br>***Machine à sceller les boîtes:***<br>**Embarcadero Home Cannery**<br>2026 Livingston Street<br>Oakland, CA 94606<br>USA<br>Tél : (1) 510 535 2311<br>Fax : (1) 510 535 2235<br>Email : contact_ehcan@hotmail.com<br>Web : www.ehcan.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 20 | Souffleur de semences | Nettoyage des semences – séparation des matériaux légers d'avec les semences | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353, 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany, OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road<br>P.O. Box No. 42<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91) 171 2699347/2699267<br>Fax : (91) 171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com |
| 21 | Compteur de semences | Compte un nombre prédéterminé de semences ou enregistre le comptage d'une portion préalablement pesée ou dont le volume a été mesuré | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353, 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road,<br>P.O. Box No. 42<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91)171 2699347/2699267<br>Fax : (91)171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 22 | Planches à compter les semences | Pour compter et espacer les semences de grande taille dans le milieu de plantation | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353 29th Ave. S.W.,<br>P.O. Box 547<br>Albany, OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com |
| 23 | Diviseur de semences | Pour préparer des échantillons représentatifs à partir d'échantillons composites | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353, 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>E-mail : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road,<br>P.O. Box No. 42<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91)171 2699347/2699267<br>Fax : (91)171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com |
| 24 | Etagères (mobiles/ statiques) | Cadres mobiles en acier galvanisé avec un revêtement en PVC, semblables à des rayons de bibliothèque préférables | **Crown Industrial**<br>213 Michelle Court<br>San Francisco, CA 94080<br>USA<br>Tél : (1) 650 952 5150<br>Fax : (1) 650 873 1495<br>Email : autodor@crown-industrial.com<br>Web : www.mobileshelving.net<br>**Montel**<br>225, 4th Avenue, C.P 130<br>Montmagny, Québec<br>G5V 3S5<br>Canada<br>Fax : (1) 418 248 7266<br>Tél : (1) 877 935 0236<br>Email : system@montel.com<br>Web : www.montel.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 25 | Tamis, gradués | Nettoyage et séparation des semences | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353, 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road,<br>P.O. Box No. 42<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91)171 2699347/2699267<br>Fax : (91)171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com |
| 26 | Stéréomicroscope | Evaluation de la qualité et de l'état sanitaire des semences | **Cole-Parmer Instruments Co.**<br>625 East Bunker Court<br>Vernon Hills, IL 60061-1844<br>USA<br>Tél : (1) 847 549 7600<br>Fax : (1) 847 549 1700<br>Email : sales@coleparmer.com<br>Web : www.coleparmer.com<br>**Fisher Scientific**<br>2000 Park Land Dr.<br>Pittsburg, PA 15275-9943<br>USA<br>Tél : (1) 973 467 6511<br>Fax : (1) 800 926 1166<br>Web : www.fishersci.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road,<br>P.O. Box No. 42<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91) 171 2699347/2699267<br>Fax : (91) 171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com<br>**Thomas Scientific**<br>P.O. Box 99<br>Swedesboro, NJ 08085<br>USA<br>Tél : (1) 800 524 0018<br>Fax : (1) 856 467 3087<br>Email : global@thomassci.com<br>Web : www.thomassci.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 27 | Plateaux de stockage (métal/plastiques) | Doivent supporter des températures inférieures à zéro | Fournisseurs locaux |
| 28 | Fournitures générales<br>a. Papier à germination<br><br>b. Matériel de laboratoire (boîtes de Petri, pinces, dessiccateur, autre verrerie, etc.) | | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353, 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com<br>**Whatman plc.**<br>27 Great West Road<br>Brentford<br>Middlesex<br>TW8 9BW<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 208 326 1740<br>Fax : (44) 208 326 1741<br>Email : information@whatman.com<br>**Cole-Parmer Instruments Co.**<br>625 East Bunker Court<br>Vernon Hills, IL 60061-1844<br>USA<br>Tél : (1) 847 549 7600<br>Fax : (1) 847 549 1700<br>Email : sales@coleparmer.com<br>Web : www.coleparmer.com<br>**Fisher Scientific**<br>2000 Park Land Drive<br>Pittsburg, PA 15275-9943<br>USA<br>Tél : (1) 973 467 6511<br>Fax : (1) 800 926 1166<br>Web : www.fishersci.com<br>**Osaw Industrial Products Pvt. Ltd.**<br>Osaw Complex, Jagadhri Road,<br>P.O. Box No. 42,<br>Ambala Cantt. - 133 001<br>Haryana<br>Inde<br>Tél : (91) 171 2699347/2699267<br>Fax : (91) 171 2699222/2699102<br>Email : eenquiry@indosaw.com<br>**Thomas Scientific**<br>P.O. Box 99<br>Swedesboro, NJ 08085<br>USA<br>Tél : (1) 800 524 0018<br>Fax : (1) 856 467 3087<br>Email : global@thomassci.com<br>Web : www.thomassci.com |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | b. Champ (enveloppes pour semences, sacs pour pollinisation, étiquettes, etc.)<br><br>c. Produits chimiques (Chlorure de tétrazolium, agar, dessiccants, etc.) | | **A.P. Burt & Sons**<br>Severn Paper Mill<br>Portishead<br>Bristol BS20 7DJ<br>Royaume Uni<br>Tél : (44 ) 1275 842454<br>Fax : (44) 1275 84 96 13<br>**PBS International**<br>Salter Road<br>Scarborough YO11 3UZ<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 1723 584091<br>Fax : (44) 1723 581664<br>Emal : pbs@duraweld.co.uk<br>Web : www.pbs.co.uk<br>**M/S Ajay Kumar & Co.**<br>C-149 Moti nagar<br>New Delhi 100 015<br>Inde<br>Tél : (91) 11 5100776<br>Fax : (91) 11 5441950<br>**Sigma-Aldrich**<br>Customer Service<br>PO Box 14508<br>St. Louis, MO 63178<br>USA<br>(Voir site Web pour les autres pays)<br>Tél : (1) 800 325 3010<br>Fax : (1) 800 325 5052<br>Web : www.sigmaaldrich.com<br>**Merck Chemicals Ltd.**<br>Boulevard Industrial Park<br>Padge Road, Beeston<br>Nottingham NG9 2JR<br>Royaume Uni<br>Tél : (44) 115 9430840<br>Fax : (44) 115 9574237<br>Email : information@merckchem.co.uk |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 29 | Thermohygromètre et hygrothermographes | Pour mesurer la température et l'HR dans les chambres froides | **Cole-Parmer Instruments Co.**<br>625 East Bunker Court<br>Vernon Hills, IL 60061-1844<br>USA<br>Tél : (1) 847 549 7600<br>Fax : (1) 847 5491700<br>Email : sales@coleparmer.com<br>Web : www.coleparmer.com<br>**Fisher Scientific**<br>2000 Park Land Dr.<br>Pittsburg, PA 15275-9943<br>USA<br>Tél : (1) 973 467 6511<br>Fax : (1) 800 926 1166<br>Web : www.fishersci.com<br>**Thomas Scientific**<br>P.O. Box 99<br>Swedesboro, NJ 08085<br>USA<br>Tél : (1) 800 524 0018<br>Fax : (1) 856 467 3087<br>Email : global@thomassci.com<br>Web : www.thomassci.com |
| 30 | Batteur, mécanique | Conçu pour battre des plantes individuelles et les épis des céréales à petites graines | **Hoffman Manufacturing Co.**<br>353, 29th Ave. S.W.<br>P.O. Box 547<br>Albany OR 97321<br>USA<br>Tél : (1) 541 926 2920<br>Fax : (1) 541 926 3949<br>Email : info@hoffmanmfg.com<br>Web : www.hoffmanmfg.com<br>**Seedburo Equipment Co.**<br>1022 W. Jackson Blvd.<br>Chicago, IL 60607<br>USA<br>Tél : (1) 312 738 3700<br>Fax : (1) 312 738 5329<br>Email : sales@seedburo.com<br>Web : www.seedburo.com |

# ANNEXE V

## Liste des acronymes

| | |
|---|---|
| **ACIAR** | Australian Centre for International Agricultural Research |
| **ACP** | Plaque recouverte d'antigènes |
| **ADN** | Acide désoxyribonucléique |
| **AOSA** | Association of Seed Analysts |
| **ARN** | Acide ribonucléique |
| **CDB** | Convention pour la diversité biologique |
| **GCRAI** | Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale |
| **CGN** | Centre for Genetic Resources, Pays Bas |
| **CIPV** | Convention internationale pour la protection des végétaux |
| **CITES** | Convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction |
| **CPB** | Protocole de Carthagène sur la sécurité biologique |
| **CTA** | Centre technique de coopération agricole et rurale ACP-EU |
| **ELISA** | enzyme-linked immunosorbent assay |
| **FAO** | Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture |
| **GAA** | Accord d'acquisition de matériel génétique |
| **HRe** | Humidité relative à l'équilibre |
| **GPS** | Système de positionnement global |
| **GRPC** | Genetic Resources Policy Committee |
| **HR** | Humidité relative |
| **IBPGR** | Conseil international des ressources phytogénétiques (maintenant Bioversity International) |
| **ILRI** | Institut international de recherche sur le bétail |
| **IPGRI** | Institut international des ressources phytogénétiques (maintenant Bioversity International) |
| **ISTA** | International Seed-Testing Association |
| **MCPD** | Descripteur passeport multi-plantes |
| **MOS** | Echantillon le plus original |
| **MTA** | Accord de transfert de matériel |
| **NASH** | Hybridation de spots d'acides nucléiques |
| **MNC** | Membrane de nitrocellulose |
| **OGM** | Organisme génétiquement modifié |
| **PBST** | Solution saline tamponnée au phosphate avec du Tween |
| **PCR** | Réaction en chaîne par polymérase |
| **PGRFA** | Ressources phytogénétiques pour l'agriculture et l'alimentation |
| **PI** | Propriété intellectuelle |
| **SMC** | Taux d'humidité des semences |
| **SMTA** | Accord de transfert de matériel pour les espèces incluses dans l'Annexe I du Traité international sur les PGRFA |
| **SPGRC** | SADC Plant Genetic Resources Centre |
| **TBIA** | Immuno essai d'empreinte de tissus |
| **UPOV** | Union internationale pour la protection des obtentions végétales |
| **WorldVeg** | AVRDC —The World Vegetable Center |

l'IPGRI et l'INIBAP
opèrent conjointement
sous la dénomination
"Bioversity International"

Avec l'appui du GCRAI

ISBN 978-92-9043-741-3