

AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT
WASHINGTON, D. C. 20523
BIBLIOGRAPHIC INPUT SHEET

FOR AID USE ONLY

Batch 70

1. SUBJECT CLASSIFICATION	A. PRIMARY Food production and nutrition	AF00-0000-0000
	B. SECONDARY Plant production	

2. TITLE AND SUBTITLE
L'essai au tetrazolium pour determiner la vitalite des semences

3. AUTHOR(S)
(101) Miss.State Univ. Seed Technology Laboratory

4. DOCUMENT DATE 1962	5. NUMBER OF PAGES 83p.	6. ARC NUMBER ARC
--------------------------	----------------------------	----------------------

7. REFERENCE ORGANIZATION NAME AND ADDRESS
AID/AFR/RTAC

8. SUPPLEMENTARY NOTES (Sponsoring Organization, Publishers, Availability)
(In Collection: techniques am.,61)

9. ABSTRACT

10. CONTROL NUMBER PN-AAE-687	11. PRICE OF DOCUMENT
12. DESCRIPTORS Seed production Tests Tetrazolium?	13. PROJECT NUMBER
	14. CONTRACT NUMBER AID/AFR/RTAC
	15. TYPE OF DOCUMENT

**l'essai au tétrazolium
pour déterminer
la vitalité des semences**

2^e Edition

Traduction d'un ouvrage en langue anglaise intitulé
THE TETRAZOLIUM TEST FOR SEED VIABILITY
publié en 1962 par
Mississippi State University
Agricultural Experiment Station.

La présente édition en langue française est publiée par le
REGIONAL TECHNICAL AIDS CENTER (R.T.A.C.)
dénommé
CENTRE REGIONAL D'EDITIONS TECHNIQUES (C.R.E.T.)
PARIS - FRANCE
qui relève du
DEPARTMENT OF STATE
AGENCY FOR INTERNATIONAL DEVELOPMENT
WASHINGTON D.C.

Pour tous renseignements au sujet des publications C.R.E.T.
s'adresser à la

Mission Américaine de l'A.I.D.
Ambassade des Etats-Unis d'Amérique
(Capitale du pays d'où émane la demande)

REMERCIEMENTS

Les travaux de recherche et de mise au point qui sont à l'origine du présent bulletin ont été effectués entre 1958 et 1961 par le Mississippi Seed Technology Laboratory (Laboratoire de Technologie des Semences). Au cours des trois dernières années de cette période, une aide financière importante a été fournie par la Southern Seedmen's Association et ses membres des Etats d'Alabama, Arkansas, Floride, Georgie, Kentucky, Louisiane, Mississippi, Caroline du Nord, Oklahoma, Caroline du Sud, Tennessee, Texas et Virginie. Les auteurs, le Laboratoire de Technologie des Semences et la Station Expérimentale d'Agriculture, tiennent à remercier ces associations de leur aide et de leur appui.

Les auteurs expriment aussi leur gratitude à la Station Expérimentale d'Agriculture du Texas et au Baker Seed Laboratory à Memphis, pour avoir bien voulu leur permettre d'utiliser une partie des renseignements qui figurent dans le tableau I. Les dessins des graines et des plantules sont l'œuvre de Miss Janet Raspet.

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	13
I HISTORIQUE	14
<i>Méthodes physiques et chimiques</i>	14
<i>Détermination de la vitalité par la coloration</i>	16
<i>Méthodes fondées sur l'activité des enzymes</i>	17
<i>Autres méthodes</i>	18
II L'ESSAI AU TETRAZOLIUM	20
<i>Mécanisme de la réaction du tétrazolium</i>	21
III STRUCTURE DE LA SEMENCE ET DES PLANTULES	22
<i>Graines et plantules de graminées</i>	22
<i>Graines et plantules de dicotylédonées</i>	24
IV METHODES GENERALES	25
<i>Matériel et équipement</i>	25
<i>Préparation des solutions de tétrazolium</i>	27
<i>Origine et échantillonnage</i>	28
<i>Traitement préalable des semences</i>	29
<i>Préparation des semences</i>	30
<i>Coloration directe</i>	31
<i>Principe des méthodes</i>	33
V. METHODES A EMPLOYER POUR CERTAINES ESPECES DE SEMENCES	34
<i>Maïs</i>	34
<i>Blé (et espèces similaires)</i>	38
<i>Sorgho (et espèces similaires)</i>	42
<i>Riz</i>	46
<i>Fétuque élevée (et espèces similaires)</i>	48
<i>Paspalum variété Pensacola (et espèces similaires)</i>	53
<i>Chiendent pied de poule (et espèces similaires)</i>	56
<i>Coton (et espèces similaires)</i>	60
<i>Soja (et espèces similaires)</i>	64
<i>Vesce velue (et espèces similaires)</i>	69
<i>Trèfle incarnat (et espèces similaires)</i>	72
<i>Pastèque (et espèces similaires)</i>	76
<i>Radis (et espèces similaires)</i>	80
VI LA METHODE VITASCOPE	82
VII EXACTITUDE DE L'EXAMEN AU TETRAZOLIUM	85
VIII LIMITATIONS DE L'ESSAI AU TETRAZOLIUM	87
IX REFERENCES	87
X APPENDICE	92

INTRODUCTION

Les périodes de temps relativement longues nécessaires pour effectuer des essais de germination ont freiné les progrès dans le domaine de l'accroissement de l'efficacité en matière de production et de commercialisation des semences. D'autres facteurs ayant une influence sur la qualité des semences comme la pureté, le taux de fréquence des graines de mauvaises herbes et la teneur en humidité, peuvent être évalués en quelques minutes. Cependant, comme les semences ne présentent d'intérêt que si un pourcentage relativement élevé d'entre elles sont viables, les décisions relatives aux modes de traitement, aux mélanges et à la vente des lots de semences, doivent être fondées soit sur l'intuition, soit sur l'expérience, soit être retardées plusieurs jours ou semaines jusqu'à ce qu'on ait les résultats d'un essai de germination. L'essai au tétrazolium pour déterminer la vitalité des semences, décrit dans la présente brochure, constitue une base beaucoup plus sûre pour prendre des décisions relatives à la vitalité des semences que l'intuition ou l'expérience et les résultats de cet essai peuvent être obtenus en quelques heures au lieu de jours ou de semaines.

L'essai au tétrazolium est connu dans notre pays depuis plus de 15 ans et cependant son emploi ne s'est pas généralisé dans l'industrie des semences ou dans les laboratoires d'essai des semences. L'utilisation limitée de l'essai au tétrazolium peut probablement être imputée à ce qu'il n'existe que peu de renseignements sur l'essai à l'intention de ceux qui en ont le plus grand besoin, c'est-à-dire les grainiers et les spécialistes de l'analyse des semences. Bien qu'une abondante littérature ait été publiée sur la question, une grande partie de celle-ci est rédigée en style extrêmement technique ou en langues étrangères, et de plus les techniques et méthodes n'ont pas été présentées sous une forme directement accessible aux grainiers et aux spécialistes de l'analyse, ni avec suffisamment de détails.

Le présent bulletin a été conçu et rédigé dans le style d'un manuel. Les renseignements sur l'essai au tétrazolium sont présentés sous une forme non technique dans toute la mesure du possible, avec suffisamment de détails pour pouvoir être appliqués dans de bonnes conditions, avec un minimum d'expérience et de connaissances techniques. Les renseignements présentés proviennent en grande partie d'un programme intensif de mise au point et d'évaluation des méthodes d'essai qui a été entrepris au cours des quatre dernières années. Les auteurs ont également largement fait appel à l'expérience et aux travaux d'autres spécialistes dont il est question dans la liste bibliographique.

Le bulletin est divisé en plusieurs sections. Le débutant devrait commencer par se familiariser avec les renseignements donnés aux sections II, III, IV, VII et VIII avant d'essayer d'appliquer les méthodes exposées à la Section V. Ceux qui ont une grande expérience de l'essai au tétrazolum seront probablement surtout intéressés par les Sections I, II et V¹.

I. HISTORIQUE

La nécessité de disposer de méthodes rapides pour estimer ou prévoir le comportement germinatif de semences est reconnue depuis longtemps. Une recherche systématique et scientifique de ces méthodes a déjà été entreprise à la fin du XIX^e siècle. Darsie et ses collaborateurs (20) faisaient remarquer en 1914 que :

« Lorsque... deux ou plusieurs semaines doivent s'écouler même dans les conditions les plus favorables avant que l'on puisse connaître la qualité, c'est-à-dire la faculté germinative des semences auxquelles on s'intéresse, il est hautement souhaitable de trouver une méthode rapide pour de nombreuses raisons. Non seulement une économie de temps est souhaitable, ne serait-ce que pour des raisons pécuniaires, comme dans le cas de l'acheteur des semences, mais aussi il y a moins à craindre, lorsque les semences ne sont exposées qu'un court laps de temps, qu'elles ne soient endommagées par les champignons ou d'autres ennemis des semences considérées. » (pp. 103-104.)

La recherche de techniques destinées à estimer rapidement la vitalité s'est orientée dans plusieurs directions. Certaines ont abouti à des méthodes compliquées et inexactes ; d'autres présentent un grand intérêt mais n'ont pas été exploitées pleinement. On trouvera ci-après une indication de l'orientation des recherches².

METHODES PHYSIQUES ET CHIMIQUES

En 1901, Waller (115) a rédigé un rapport sur une méthode électrique pour déterminer la vitalité des semences. Il a démontré qu'en soumettant à un courant électrique les semences viables on obtenait des « décharges » qui pouvaient être mesurées avec un galvanomètre et que les semences mortes réagissaient différemment au traitement. Les travaux qui ont été accom-

1. Les auteurs sont Associate Agronomists, Assistant Agronomist and Research Assistants respectivement du *Mississippi Seed Technology Laboratory*, Station Expérimentale du Mississippi.

2. Depuis que la présente section a été rédigée, Barton (4) a présenté une étude remarquable sur la question.

plis ultérieurement sur la méthode Waller ont indiqué que cette technique était assez exacte mais qu'elle nécessitait beaucoup de temps et une grande compétence technique.

L'utilisation de méthodes électriques pour déterminer la vitalité des semences a pris une orientation quelque peu différente avec les travaux de Hibbard, Fick et Miller (33-46). Leurs expériences étaient fondées sur l'hypothèse que les semences non viables étaient plus perméables que les semences vivantes, et qu'en conséquence, les électrolytes s'écoulaient plus rapidement des semences mortes et âgées. En trempant une certaine quantité de semences dans de l'eau ou dans des solutions diluées de permanganate de potasse, et en mesurant la résistance électrique de l'eau de trempage, ils ont déterminé que la résistance électrique variait directement en fonction de la vitalité et que la faculté germinative des semences pouvait être estimée avec une certaine exactitude. Plus récemment, Presley (94), Thomas (107) et Helmer (45) ont utilisé cette technique pour estimer rapidement la vigueur ou le pouvoir de multiplication des semences.

Lesage (70) a décrit une méthode quelque peu différente pour estimer la vitalité des semences, méthode fondée sur le taux différent de diffusion des substances des semences vivantes et mortes. Il a trempé des semences dans des concentrations différentes d'hydroxyde de potassium et a mesuré la coloration des solutions. Les semences d'une faible vitalité donnaient une couleur jaune aux solutions tandis que les semences d'une grande vitalité ne le faisaient pas. Tatum (106) a constaté que la turbidité de l'eau dans laquelle étaient trempées des semences de maïs était en liaison étroite avec l'énergie provoquée par le froid. Vaughn et Delouche (113) ont indiqué que la rapidité du gonflement des semences de trèfle déposées sur du buvard humide donnait un indice approximatif de vitalité ; les semences qui étaient gonflées au bout d'une heure ou deux n'étaient généralement pas viables. Vaughn (112) a aussi constaté que la couleur des semences et leur poids spécifique étaient en liaison étroite avec la vitalité des petites semences et légumineuses.

Plusieurs chercheurs (14, 47, 92) ont constaté que la teneur en acide gras libre de certaines espèces de semences était en liaison étroite avec leur vitalité. Au moyen d'une expérience ingénieuse, Hoffpauer (47) a coupé en deux des graines de coton, a planté l'extrémité contenant le germe sur de l'agar et a déterminé la teneur en acide gras libre de l'autre extrémité. Il a constaté que les acides gras libres contenus dans l'huile des différentes semences variaient de 0,3 à 90 %. La plupart des semences qui avaient moins de 3 % de teneur en acide gras libre étaient viables tandis que toutes les semences ayant plus de 5 % de teneur en acide gras libre étaient mortes.

Darsie et Cie (20) ont fondé leur méthode d'essai rapide de vitalité sur un phénomène depuis longtemps connu des physiologues, à savoir que les semences libéraient de la chaleur pendant la germination. Ils ont placé des semences humides dans des flacons de Dewar argentés, ils ont mesuré la production de chaleur et ont conclu que la production de chaleur était directement liée à la vitalité et à la vigueur. Par exemple, ils ont remarqué que le rendement normal en chaleur de 10 grammes de semences d'orge

imbibées était de 0,88° C, et ont suggéré que des rendements en chaleur anormalement élevés étaient le résultat d'une contamination par des champignons et que des rendements anormalement faibles en chaleur étaient attribuables à une faible vitalité et à une vigueur insuffisante. Harmond (43) a constaté récemment que la détermination du rendement calorifique au moyen d'un équipement moderne ouvrait des possibilités considérables pour déterminer l'indice de vitalité. Doroshenko (25) a décrit une méthode plasmolytique pour déterminer la capacité de germination des semences. Cependant, les techniques utilisées étaient assez complexes. Kugler (59) a constaté que les semences non viables de certaines variétés de crucifères contenaient des substances fluorescentes qui s'écoulaient du substratum germinatif, tandis que les semences viables ne contenaient pas de telles substances. Ainsi, une analyse aux ultraviolets a donné une estimation approximative de la vitalité.

Les méthodes indiquées ci-dessus présentent toutes de sérieuses limitations. Tout d'abord, il s'agit de méthodes fondées sur une quantité déterminée de semences et elles ne permettent donc pas d'évaluer séparément des semences. En conséquence, ces méthodes ne sont pas très exactes et peuvent, au stade actuel de développement, donner des résultats exprimés en vitalité faible, moyenne et élevée. En outre, même les résultats relatifs ainsi obtenus doivent être convertis en transformant l'indice particulier obtenu par la méthode en un pourcentage estimé de germination. Il est tout à fait possible que des méthodes fondées sur de grandes quantités de semences soient plus faciles à utiliser pour évaluer la vigueur des semences, que pour estimer le pourcentage de germination.

DETERMINATION DE LA VITALITE PAR COLORATION

Des méthodes fondées sur une évaluation des réactions de semences prises individuellement se sont révélées les meilleures pour prévoir ou estimer la vitalité des semences. Quelques-unes des premières tentatives visant à mettre au point des essais rapides de vitalité étaient fondés sur la réaction des semences individuelles à des matières qui coloraient les semences mortes ou des parties de semences non viables.

En 1876, Dimitrievicz a fait état d'une technique de coloration au moyen de l'acide sulfurique (35). Il a constaté que les embryons viables et affaiblis ou morts se coloraient différemment lorsqu'ils étaient traités à l'acide sulfurique. Il a fallu attendre 1925 pour mettre au point une méthode suffisamment exacte de coloration des semences viables. Neljubow (84,85) a constaté que le carmin d'indigo, colorant à base d'aniline, pénétrait dans les tissus morts mais ne pénétrait pas facilement dans les tissus vivants. Des embryons ont été extirpés ou coupés et trempés dans une solution faible de carmin d'indigo pendant une heure, puis lavés et évalués. L'interprétation des résultats de l'essai était fondée principalement sur la proportion de l'embryon qui n'avait pas été colorée.

D'autres chercheurs (99,111) ont appliqué avec succès la méthode

au carmin d'indigo pour estimer la vitalité des semences d'arbres. Gadd et Kjaer (36) ont utilisé le carmin d'indigo comme élément constitutif d'une teinture double pour déterminer la vitalité des semences de céréales.

METHODE FONDEE SUR L'ACTIVITE DES ENZYMES

Les enzymes sont des bio-catalyseurs qui jouent un rôle essentiel dans le processus complexe de la vie. Comme les enzymes jouent un rôle absolument capital dans le métabolisme des plantes et comme l'activité d'un grand nombre d'entre eux peut être mesurée ou démontrée au moyen de techniques appropriées, les chercheurs ont essayé depuis longtemps d'établir une corrélation entre leur présence ou leur activité avec la vitalité des semences. En fait, de nombreuses méthodes parmi les plus prometteuses et les meilleures pour estimer la vitalité des semences sont fondées sur des essais de certaines enzymes ou groupes d'enzymes.

McHarque (75) a appliqué un essai physiologique standard pour déterminer l'enzyme peroxydase dans les semences de maïs, d'avoine, de soja et de laitue, et a mis au point un essai rapide de vitalité fondé sur l'activité de la peroxydase. La seule limitation de l'essai de McHarque est qu'il nécessite de grosses quantités de semences et qu'il ne peut être appliqué à des semences isolées. Plus récemment, l'essai à la peroxydase a été adapté avec d'assez bons résultats aux semences prises isolément (11).

L'activité de l'enzyme catalase a été utilisée par Davis (23) et Leggatt (69) pour déterminer la vitalité des semences. Cependant, la complexité de la technique employée, et la nécessité d'utiliser de fortes quantités de semences broyées, ont sérieusement limité l'emploi de cette méthode. En outre, il a été démontré que les semences mortes contenaient pendant plusieurs années de la catalase (11).

Les essais de vitalité fondés sur l'activité enzymatique doivent répondre à plusieurs conditions pour pouvoir être appliqués avec succès. Tout d'abord, cette méthode doit permettre l'examen et l'évaluation des réactions de différentes semences. Il est préférable aussi que les réactions soient facilement reconnaissables et ne nécessitent pas de techniques ou des connaissances biochimiques importantes de la part de l'analyste. Une troisième condition très importante est que l'activité de l'enzyme ou des enzymes soit associée étroitement ou liée à la vie des semences.

Turesson (110) a probablement été le premier à étudier un groupe d'enzymes, les déshydrogénases, qui répondent à la plupart des conditions exposées ci-dessus. Cependant, sa technique particulière, qui avait un caractère d'avant-garde, ne tenait pas compte intégralement de toutes les caractéristiques désirables de ces enzymes. Il appliquait des solutions diluées de bleu de méthylène à des semences broyées et, dans certaines conditions appropriées, il pouvait observer la réduction du composé en sa forme incolore. Malgré les très graves limitations de la méthode de Turesson, celle-ci a été à l'origine de découvertes ultérieures.

Il conviendrait cependant de noter une autre caractéristique désirable des déshydrogénases. Les déshydrogénases participent aux réactions d'oxy-

dation-réduction d'un grand nombre de composés organiques. Les formes réduites et oxydées de certains de ces composés sont caractérisées par des couleurs différentes. En conséquence, l'activité enzymatique est un phénomène facilement observable qui entraîne d'importantes modifications de la couleur.

Le chercheur japonais Hasegawa (44) a mis au point un essai de vitalité fondé sur la réduction de sels incolores de sélénium et de tellurium en leur forme élémentaire colorée ; les précipités se formaient sur des cellules vivantes à la suite de l'activité des déshydrogénases. Sakata (96) a révisé les travaux antérieurs sur les sels de sélénium et de tellurium. Eidamnn (30) a travaillé surtout avec des sels doubles de sélénium à perfectionner les travaux d'Hasegawa et a mis au point la méthode au sélénite. Les semences étaient trempées dans de l'eau pendant 24 heures environ, puis transférées dans une solution à 1 ou 2 % de bisélénite où elles restaient pendant 24 heures encore. Au bout de ce temps, les semences étaient lavées et les résultats de l'essai étaient interprétés. L'interprétation était fondée en grande partie sur le mode de coloration de l'embryon. Lalion (64) indiquait une méthode topographique au sélénite pour évaluer la vitalité, qui permettait d'établir une distinction non seulement entre les semences mortes et les semences vivantes, mais aussi entre les semences probablement anormales et à faible vigueur. Plus récemment, Johnson (56) a fait état de travaux très étendus sur le bisélénite. Gadd et Kjaer (36) ont combiné le bisélénite et le carmin d'indigo en mettant au point une méthode à double coloration : les zones vivantes de l'embryon étaient colorées en rouge (bisélénite) tandis que les zones mortes étaient teintées en bleu (carmin d'indigo).

Deux autres méthodes fondées sur l'activité enzymatique méritent d'être signalées. Gadd (35) a utilisé le vert de malachite pour vérifier l'activité des déshydrogénases dans les semences de pois. Les semences viables contenant les enzymes décoloraient le produit chimique. Plaut et Halfon (91) ont mis au point un essai fondé sur l'emploi comme réactif de résazurine. Les embryons viables restaient blancs après le traitement, tandis que les embryons non viables devenaient rouges ou bleus.

La méthode la plus importante pour déterminer rapidement la vitalité est l'essai au tétrazolum. De même que les méthodes au vert de malachite et au sélénite, elle est fondée sur un changement de couleur provoqué par l'activité des enzymes. Il est incontestable que les essais au tétrazolum ont soulevé un vif intérêt parmi les grainiers et les spécialistes de l'analyse des semences, et ont en outre attiré davantage que toutes les techniques antérieures l'attention sur la nécessité d'essais rapides de vitalité. L'historique de ces recherches est étudié dans une autre section.

AUTRES METHODES

Les méthodes rapides d'essais de la vitalité qui ont été examinées ci-dessus étaient toutes du type indirect, c'est-à-dire que l'estimation de la vitalité était fondée sur des phénomènes associés ou liés à la germination

et non pas à la germination proprement dite. A diverses époques, on a proposé des méthodes qui combinaient les avantages de la détermination directe de la germination avec une période d'essai de germination beaucoup plus courte.

On sait depuis longtemps que la température exerce une grande influence sur la rapidité de la germination. Pour la plupart des espèces de semences non dormantes, il y a une gamme de températures sur laquelle les pourcentages finals de germination sont équivalents. Cependant, dans cette gamme, les températures les plus élevées favorisent une germination plus rapide (28, 29).

Delouche (42) signale que les essais de germination du maïs et du soja effectués à 30° C pouvaient être terminés deux ou trois jours plus tôt que des essais à la température recommandée de 20-30° C et sans diminution de l'exactitude. De même, en changeant la température recommandée pour la germination des pastèques de 20-30° C à 30-20° C (30° pendant 16 heures, 20° pendant 8 heures) on pouvait réduire de 4 à 5 jours la période d'essai. Poe et ses collaborateurs (92) ont signalé qu'en utilisant des graines de coton décortiquées, les essais de germination pouvaient être effectués en deux jours.

Dans certains cas, on peut réduire la durée de l'essai en trempant les semences dans de l'eau avant de procéder à l'essai de germination (16). Moore (79) a constaté que le fait de tremper des graines de coton dans une solution diluée de savon augmentait la rapidité de germination.

Le laps de temps considérable nécessaire pour la germination d'un grand nombre de semences n'est que l'un des aspects de l'état de dormance des semences. Nous ne nous efforcerons pas ici de passer en revue les travaux sur les méthodes propres à arrêter le repos des semences. Cependant, il convient de faire mention rapidement de quelques-uns des travaux les plus récents sur les méthodes de détermination rapide de la vitalité des semences d'arbres en état de dormance.

La durée des essais de germination des semences d'arbres et d'arbustes est particulièrement longue. Pour de nombreuses espèces, il n'est pas rare que la durée de germination varie de 40 à 100 jours. Flemion (34) a mis au point une méthode qui abrège considérablement le temps nécessaire pour déterminer la vitalité des semences d'arbres et d'arbustes. Les embryons sont excisés et placés sur du papier filtre humide. Les embryons viables se développent et deviennent verts. Cependant, la méthode de Flemion, tout en étant très exacte, nécessite beaucoup d'habileté et de temps pour préparer les embryons destinés à l'essai. Récemment, Ching et Parker (15) ont mis au point un essai rapide de vitalité pour les semences des conifères qui présente de grands avantages. L'enveloppe extérieure de la semence est rapidement coupée au moyen d'une ponçeuse à moteur. Les semences ouvertes sont alors placées dans une solution à 1 % d'eau oxygénée à la température voulue et restent dans cette solution pendant la durée de l'essai. On peut alors déterminer directement la vitalité des semences au bout de 5 à 9 jours, tandis que pour les essais normaux de germination, il fallait de 40 à 90 jours.

II L'ESSAI AU TETRAZOLIUM

La méthode topographique au sélénite qui a été mise au point en grande partie par Lakon (64) mettait l'accent sur la réaction des différents organes des semences et permettait d'estimer la vitalité des semences avec une très grande exactitude. Cependant, la méthode au sélénite présente un grave inconvénient. Le sélénium est assez toxique et son usage est très dangereux pour les analystes.

En 1941, Kuhn et Jerchel (60) ont découvert que les sels de tétrazolum pouvaient être réduits à partir de formes incolores et solubles en formazans insolubles et colorés dans les tissus vivants. Lorsque Lakon a été mis au courant de cette découverte, il a abandonné les composés toxiques de sélénium en faveur des sels non toxiques de tétrazolum et entrepris des recherches sur les essais rapides de vitalité avec du tétrazolum, essais qu'il a poursuivis jusqu'à sa mort, il y a quelques années. Ses premiers travaux (63,64) ont porté sur les semences de maïs et les petites semences. Il a constaté que lorsque les sels de tétrazolum viennent en contact avec les tissus vivants de l'embryon des semences, le produit chimique est réduit en un pigment insoluble qui « colore » le tissu. Les tissus non vivants ne réduisent pas les sels de tétrazolum. Lakon a mis au point plusieurs méthodes pour préparer les semences en vue de l'essai au tétrazolum. Les semences de maïs étaient trempées pendant une nuit et sectionnées longitudinalement à travers l'embryon avant d'être placées dans une solution de tétrazolum. Pour les petites semences de céréales (sauf l'avoine) les axes embryonniques étaient excisés avant d'être placés dans la solution de tétrazolum. L'interprétation était fondée sur l'importance et l'emplacement d'une tache brillante de rouge carmin produite dans les tissus vivants à la suite de la réduction *in situ* du tétrazolum. Sur plusieurs sels de tétrazolum qu'il a essayés, Lakon a constaté que le chlorure de triphényle-tétrazolum-2,3,5 était le meilleur. Les travaux antérieurs de Lakon sur la méthode au tétrazolum étaient inconnus dans notre pays jusqu'après la guerre en 1945. Au cours de cette année-là, une équipe d'enquêteurs de la Joint Intelligence Agency qui interrogeaient les chercheurs allemands au sujet de leurs activités pendant la guerre a découvert les travaux de Lakon et a fait rapport à leur sujet (27). Peu après, plusieurs documents sur l'essai au tétrazolum ont été publiés en langue anglaise. Porter, Durrell et Romm (93) ont appliqué les techniques de Lakon à plusieurs plantes cultivées y compris les céréales, le maïs, les pois, le soja et le riz. Ils constatèrent que des techniques étaient plus efficaces pour estimer la vitalité des semences de graminées que celle des semences de dicotylédonées. Cottrell (18,19) et Shuel (101) ont également fait rapports sur les études relatives au tétrazolum peu après la guerre.

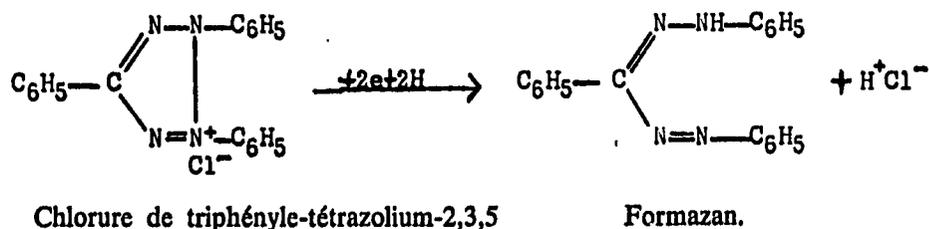
Parmi les chercheurs américains qui ont largement contribué à mettre au point les essais au tétrazolum, il convient de citer Bass (5, 6, 7), Grabe (4), (41), Isely (52), Jensen et ses collaborateurs (54, 55), Metzger (76), Moore et E. Smith (77, 78, 80, 81, 82) et F.G. Smith (103, 104).

Un grand nombre d'ouvrages ont été publiés sur les essais au tétrazolum. Il n'est pas question de passer en revue ici les travaux de tous les

chercheurs en question. Barton (4), Favilli (32), Gadd (35), Grabe (40), Isely (52) et Smith (102) ont passé en revue un grand nombre des travaux effectués antérieurement. Les principales références concernant les différentes espèces de semences sont les suivantes : Semences de graminées (5, 6, 7, 22, 49, 50, 52, 55, 57, 62, 64, 86, 87, 105, 116) ; Graines de légumineuses (13, 25, 45, 100) ; graines de coton (40, 68, 92) ; Semences de cucurbitacées (93) ; Semences de colza (107) ; Semences d'arbres (12, 48, 58, 88, 89, 90). Plusieurs chercheurs (8, 9, 10, 17, 36, 39) ont fait rapport sur l'incidence des dégâts occasionnés aux semences par la gelée, la chaleur et les fumigations sur les résultats des essais au tétrazolium. La méthode au tétrazolium a aussi été utilisée pour déterminer la vitalité du pollen (97) et d'autres parties des plantes (95).

MECANISME DE LA REACTION DU TETRAZOLIUM

Le sel de tétrazolium est un indicateur d'oxydation et de réduction et il a été bien établi que l'apparition dans les tissus d'une couleur rouge non diffusible est le résultat de la réduction du produit chimique par l'action des enzymes. Un ou plusieurs des systèmes de déshydrogénases semble intervenir dans la réaction. (53, 102, 103, 108). La réaction est la suivante : (102).



Smith (103) a effectué une étude détaillée sur la réaction et a conclu que dans les embryons de maïs, la réduction du chlorure de triphényle-tétrazolium est catalysée par des déshydrogénases, liées à la disphosphopyridine-nucléotide (système malique et alcoolique) et qu'elle était facilitée par la diaphorèse. Il a aussi constaté que les déshydrogénases aérobies, telles que l'oxydase de xanthine catalysaient aussi la réaction. L'essai au tétrazolium constitue donc un test de l'activité de certains systèmes d'enzymes. Fort heureusement, la perte d'activité de ces systèmes tend à être parallèle à la perte de la vitalité des semences.

Les enzymes déshydrogénases participent à l'activité respiratoire des systèmes biologiques. Pendant le processus respiratoire, il se produit des corps intermédiaires sur lesquels les enzymes agissent. Le ions d'hydro-

gène ont transférés (en plusieurs phases), au tétrazolium qui, en se combinant à l'hydrogène est réduit en formazan insoluble et coloré (rouge). Comme la réaction se produit dans les cellules et que le pigment ne se diffuse pas, il y a une ligne de démarcation assez nette entre les tissus qui respirent (viables) et ceux qui ne respirent pas (non viables). Les premiers prennent une couleur caractéristique (rouge) tandis que les derniers conservent leur couleur naturelle.

La vitesse de la réaction au tétrazolium est fonction de plusieurs facteurs : le pH (39, 103, 104), la température, (40, 101), la pression atmosphérique (76) et la concentration (103).

III. STRUCTURE DE LA SEMENCE ET DES PLANTULES

Une application intelligente et exacte de l'essai au tétrazolium exige au moins une connaissance générale de la structure des semences et des plantules. Cette connaissance est indispensable pour bien préparer les semences destinées à l'essai et pour interpréter avec exactitude les résultats de ces essais. L'interprétation est fondée essentiellement sur la répartition des tissus vivants et de tissus morts entre les divers organes de l'embryon. Si on ne connaît pas la signification et la fonction de chaque organe, les réactions qui provoquent la coloration sont sans signification.

GRAINES ET PLANTULES DE GRAMINEES

La semence ou « grain » de graminée est une espèce particulière de fruits appelé caryopse. Elle est entourée par l'enveloppe du fruit (paroi de l'ovaire) ou péricarpe. Dans la plupart des espèces, la véritable enveloppe des semences n'est pas bien développée et elle est intimement liée au péricarpe. En plus du péricarpe, les semences de graminées sont généralement entourées de téguments. Dans de nombreuses espèces, à maturité, les téguments se séparent naturellement du grain ou par battage et traitement (blé, seigle, quelques variétés de sorgho, eragrostis, chiendent décortiqué.) Dans d'autres espèces cependant, les téguments ne s'en vont pas (ou ne sont pas enlevés) et restent sur la semence (par exemple : avoine, riz, ray-grass, pâturin des prés, paspalum). Un grain d'avoine est entouré par deux enveloppes, la lemma et la palea, tandis qu'une graine de paspalum est entourée d'une lemma, d'une palea, d'une lemma stérile et d'une glume (fig. 1, A).

La plus grande partie des semences de graminées est constituée par l'endosperme qui est une masse hypertrophiée de tissu contenant de l'amidon qui constitue la principale réserve alimentaire. Le tissu de l'endosperme est généralement mort, sauf, les cellules de la ou des couches extérieures qui sont appelées les aleurones (Fig. 1. B).

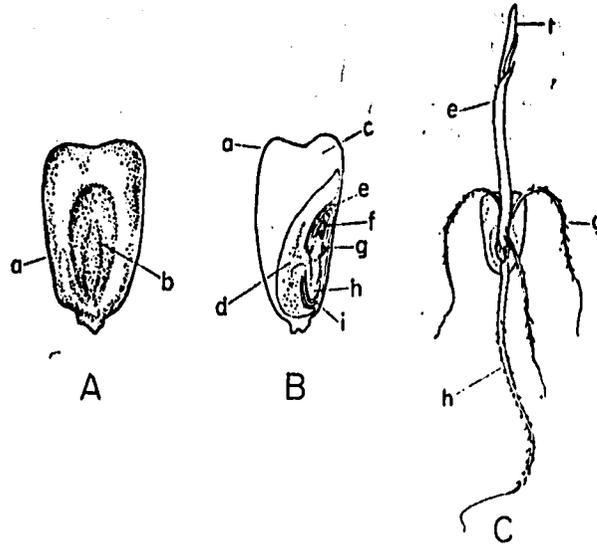


Fig. 1

Structure du grain et de la plantule chez les graminées (maïs) — A. Vue extérieure du caryopse — B. Coupe en deux parties du caryopse — C. Plantule : a) péricarpe, b) germe, c) endosperme, d) scutelle, e) coléoptile, f) plumule, g) racine séminale, h) radicelle, i) coléorhize.

La structure de l'embryon est relativement constante dans toutes les différentes espèces de graminées. L'embryon, est latéralement placé sur le côté de la lemma de la graine. L'embryon peut être petit par rapport à l'endosperme, comme dans le riz, on peut constituer presque la moitié de la graine, comme dans le sorgho, var. halepense.

L'embryon comprend essentiellement trois organes : la plumule et la radicule qui ensemble forment l'axe embryonnaire et la scutelle. La scutelle est en contact avec l'endosperme et elle est plate ou convexe sur sa face intérieure, et plate ou concave sur sa face extérieure. Les bords sont souvent retournés en-dedans et enveloppent partiellement l'axe embryonnaire qui est attaché à la scutelle près du milieu de sa face antérieure (Fig. 1. B).

La plumule est séparée du point d'attache à la scutelle par un axe court, le mésocotyle et comprend une enveloppe protectrice extérieure, la coléoptile, un nombre variable de feuilles embryonnaires et le bourgeon terminal. La radicule est située au-dessous du mésocotyle et elle est aussi entourée par une enveloppe, la coléorhize. Dans certaines espèces, il y a deux ou plusieurs radicelles préformées dans la région immédiatement située au-dessous de la plumule. Deux racines séminales sont généralement visibles dans la section longitudinale de l'embryon du maïs. Cependant dans les autres espèces, les radicelles ne sont pas visibles dans la section longitudinale (Fig. 1. B).

Lors de la germination, la radicule rompt la coléorhize, sort et devient la racine principale. Les radicelles apparaissent plus tard, au cours du processus de germination. La coléoptile sort aussi de la semence et dans le sol, elle est soulevée au-dessus du niveau du sol par allongement de l'axe situé immédiatement au-dessous de la plumule. Lorsqu'elle est sortie du sol, les feuilles apparaissent à travers une fente située près du sommet de la coléoptile (Fig. 1. C).

La croissance et le développement de la radicule ou racine principale ne sont pas nécessaires chez la plupart des graminées pour assurer la survie et la croissance de la plantule et de la plante. Les radicelles et les racines adventives formées aux nœuds supérieurs constituent le principal système racinaire des graminées. Il convient de tenir compte de ce fait au cours de l'interprétation des essais au tétrazolium.

GRAINES ET PLANTULES DE DICOTYLEDONEES

Par rapport aux graines de graminées, la structure de la plupart des graines de dicotylédonées apparaît comme remarquablement simple. Les graines de la plupart de ces espèces importantes pour l'agriculture sont de véritables semences et sont contenues dans une enveloppe. Les graines de quelques espèces, comme le tournesol, le sarrasin et les carottes sont des fruits ou parties de fruits. En outre, les graines de dicotylédonées cultivées sont presque entièrement constituées par l'embryon, sauf l'enveloppe de la semence. Le ricin est l'une des rares dicotylédonées cultivées dont les graines contiennent un tissu endosperme en quantité très importante.

Les graines de dicotylédonées comprennent essentiellement une enveloppe extérieure qui est interrompue seulement par le hile ou point d'attache de la graine dans le fruit. Le hile apparaît surtout dans les légumineuses où la région hilare peut être pigmentée différemment comme dans le pois chiche ou le soja. L'embryon remplit l'intérieur de la graine et comprend principalement deux cotylédons, une radicule (et l'hypocotyle) ainsi qu'une plumule (Fig. 2. A). Les cotylédons peuvent être de grande taille, épais et charnus comme dans le haricot, ou minces et foliacés comme dans la pastèque. Ils peuvent être déroulés comme dans le soja, repliés une fois comme dans le radis, ou plusieurs fois comme dans le coton. Quel que soit le type de pliure des cotylédons, ils sont accolés le long de leurs faces supérieures. La plumule est située à la base des cotylédons entre ceux-ci, au point d'attache à l'hypocotyle (fig. 2, B). La plumule peut être visible à l'œil nu comme dans le soja ou invisible comme les cucurbitacées et les trèfles. L'axe hypocotyle-radicule est de formes diverses : il ressemble à une racine dans les graines de radis et de légumineuses, ou bien il est plat et triangulaire comme dans les cucurbitacées.

Pendant la germination, l'axe hypocotyle-radicule se transforme en hypocotyle et racine principale. Les cotylédons peuvent sortir du sol avant le développement de la plumule (cotylédons épigés comme dans les haricots), ou bien la plumule peut sortir par allongement de l'épicotyle, tandis

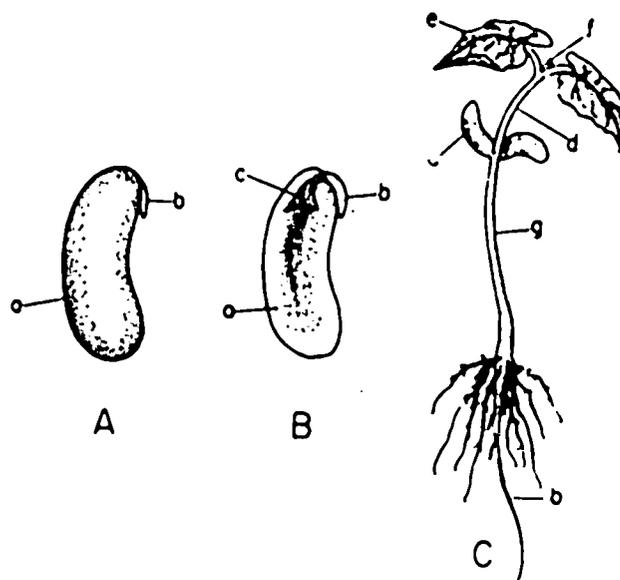


Fig. 2

Structure de la graine et de la plantule des dicotylédones (horicots) — A. vue extérieure, le tégument étant enlevé — B. vue intérieure, un cotylédon étant enlevé — C. plantule. a) cotylédon — b) radicule — c) plumule — b) épicotyle — a) feuille primaire — f) bourgeon terminal — g) hypocotyle.

que les cotylédons restent dans le sol (cotylédons hypogés comme dans le pois ou la vesce). La plumule se transforme en tige et feuilles de la plante (Fig. 2. C).

Le bon développement de la racine principale présente une grande importance chez la plupart des dicotylédones. Si la racine principale est faible ou ne se développe pas, les racines adventives ou secondaires peuvent pousser ; cependant, le développement général de la plante s'en trouve affecté.

IV. METHODES GENERALES

MATERIEL ET EQUIPEMENT (Fig. 3)

Le matériel et l'équipement nécessaires pour l'essai au tétrazolium sont, relativement simples et peu coûteux. Ils consistent essentiellement en :

- 1) tétrazolium,
- 2) coupelles en verre,
- 3) lames de rasoir,
- 4) pinces (pinces à épiler),
- 5) aiguilles à disséquer,
- 6) loupes ou microscope.

Lorsque les essais au tétrazolium doivent être pratiqués couramment, il est souhaitable d'acheter des types normalisés de produits et d'équipement.

Le produit chimique, le chlorure de triphényle-tétrazolium-2,3,5 coûte environ 25 dollars le gramme. Un gramme suffit pour effectuer une cinquantaine ou davantage d'essais sur les graminés à petites graines, 25 essais sur les graminés à grosses graines, 10 essais sur les graines de trèfle et 2 essais sur les graines de la dimension du soja.

Les béciers et les verres de montre sont des récipients idéals pour la préparation et la coloration des semences ainsi que pour l'interprétation des résultats des essais. Pour les graines d'une dimension comparable à celle des trèfles incarnat, il convient d'employer des béciers de 20 ou 50 ml. Pour les graines de la dimension de celles des vesces velues, il faut employer des béciers d'une capacité de 100 ml environ, tandis que des béciers de 200 ou 250 ml conviennent tout particulièrement pour la coloration du soja, des pois et haricots, ainsi que pour la préparation (trempage) du coton et du maïs. Les verres de montre de Syracuse sont idéals pour la coloration d'un grand nombre d'espèces de petites semences, tandis que les boîtes de Petri peuvent être utilisées pour les semences de plus grande dimension. Il convient de souligner cependant que l'on peut utiliser n'importe quel récipient ou soucoupe en verre à la place des béciers et verres de montre qui

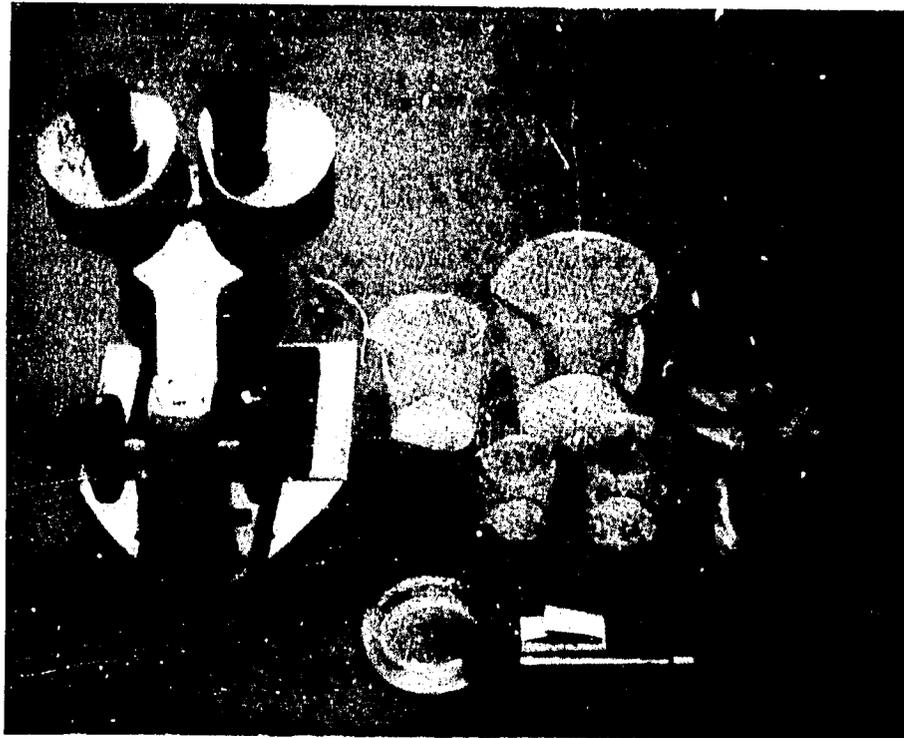


Figure 3. — Equipement et matériel utilisés pour l'essai au tétrazolium

sont plus coûteux. L'analyste trouvera rapidement le récipient qui convient le mieux pour son travail.

Les semences qui doivent être sectionnées avant d'être colorées peuvent l'être au moyen de n'importe quel instrument coupant. Cependant, la lame de rasoir à un seul tranchant convient admirablement bien à cet effet. Elle fait des coupures nettes et propres et elle est peu coûteuse. La perforation des graines de graminées avant la coloration peut se faire particulièrement bien avec une aiguille à coudre mince et pointue. On peut se servir aussi des épingles utilisées pour fixer les insectes dans les boîtes ainsi que des aiguilles à disséquer qui ont été meulées de façon à avoir une pointe mince et aiguë.

On peut utiliser également plusieurs pinces (pinces à épiler) de dimensions diverses. Les types utilisées pour l'essai des semences sont ceux qui conviennent le mieux.

Si l'analyste veut tirer parti de la plus grande rapidité de la coloration à haute température ambiante, il faut qu'il dispose d'un four ou d'une étuve. Les petits germinateurs du type « casserole » dont on trouve la description dans plusieurs catalogues d'équipement de laboratoire, peuvent convenir pour la plupart des usages. Un de ces petits germinateurs peut contenir de 10 à 40 essais en même temps et maintenir une température constante de 30° pour la préparation et de 40° pour la coloration. Si l'on a besoin de davantage d'espace, il faut se procurer une unité plus grande du type étuve. Il convient de souligner cependant que la coloration se fait à la température ambiante, bien que plus lentement.

L'interprétation des résultats des essais, sauf pour les très grosses semences, nécessite un appareil de grossissement. Une loupe à main ou un trépied à pouvoir grossissant de 5 à 10 fois suffit généralement. Cependant, pour les très petites semences, comme celles de trèfle blanc, de pâturin des prés et de chiendent l'exactitude d'interprétation se trouve grandement accrue par l'utilisation d'un microscope stéréoscopique capable de grossir de 9 à 30 fois.

PREPARATION DES SOLUTIONS DE TETRAZOLIUM

Le composé de tétrazolum utilisé est le chlorure de triphényle-tétrazolum-2,3,5. C'est une poudre blanche ou jaune pâle soluble dans l'eau.

Les solutions doivent être préparées avec de l'eau distillée. Ne pas préparer en même temps une quantité supérieure à celle qui est nécessaire pour deux semaines. Bien que la solution soit très stable, elle est souvent contaminée pendant de longues périodes d'entreposage. Lorsqu'elle ne sert pas, la solution doit être placée dans un endroit frais à l'obscurité. L'exposition de la solution à une forte lumière entraîne une réduction du produit chimique et l'apparition d'une couleur rouge dans la solution.

Généralement, des concentrations de 0,1, 0,5 et 1 % en poids/volume sont utilisées. On trouvera dans la section traitant des *méthodes employées pour les différentes espèces de semences* une indication des concentrations qu'il faut employer pour les différents types de graines.

Les solutions de différentes concentrations sont préparées de la façon suivante :

- a) solution à 0,1 % — un gramme de tétrazolium dans 1 000 ml d'eau.
- b) solution à 0,5 % — cinq grammes de tétrazolium dans 1 000 ml d'eau.
- c) solution à 1 % — dix grammes de tétrazolium dans 1 000 ml d'eau.

Il y a lieu de préparer une solution concentrée à 1 % dont on se servira pour obtenir des concentrations plus faibles par dilution. Une solution à 1 % peut être diluée à 0,5 % en mélangeant une partie de solution avec une partie d'eau. On peut préparer une solution à 0,1 % en mélangeant une partie de solution à 1 % avec 9 parties d'eau.

Le pH de la solution doit être compris entre 6 et 8 pour obtenir les meilleurs résultats possibles.

ORIGINE ET ECHANTILLONNAGE

Les semences utilisées pour l'essai normalisé de germination sont prélevées dans un lot de semences pures qui a servi à une analyse de pureté. Le principal objectif de l'essai au tétrazolium étant de donner une estimation des pourcentages de germination, il faut suivre des méthodes analogues. Les semences utilisées pour l'essai au tétrazolium doivent donc être prélevées au hasard dans une fraction de semences pures. L'utilisation de planches de comptage pour les grosses semences ou appareils de comptage pneumatiques pour les petites semences élimineront une grande partie du manque d'uniformité dans le prélèvement de l'échantillon.

Dans certains cas, il pourrait se révéler impossible de faire une analyse de pureté pour se procurer la fraction de semences pures. Pour certaines espèces de graines, en particulier celle de maïs, de coton et de soja, l'analyse de pureté n'est pas nécessaire. Cependant, la définition des semences pures doit toujours être respectée strictement lors du choix des semences destinées à l'essai. Des fragments de semences de plus de la moitié de la dimension des semences originales et non mûres, ridées ou endommagées par les insectes, sont tous considérées comme des semences pures. Dans le cas de semences de graminées de petite dimension, où les matières inertes, peuvent présenter des difficultés, on peut remplacer d'une manière satisfaisante l'analyse de pureté en procédant de la façon suivante : choisir au hasard 150 à 200 semences ; quand les semences sont scindées en deux ou piquées, éliminer comme matière inerte, toutes les semences qui ne sont pas conformes à la définition des semences pures ; lorsqu'on a préparé 100 semences pures, rejeter le reste. Recommencer l'opération autant de fois qu'on le désire.

Il arrive fréquemment que quelques-unes des semences choisies pour l'essai au tétrazolium soient perdues ou endommagées lors de la préparation. En conséquence, il est bon d'inclure dans le lot quelques semences supplémentaires pour chaque essai, c'est-à-dire lorsqu'il faut 100 semences, choisir 110 semences et lorsqu'il en faut 2×50 , utiliser 2×55 . Après préparation, toutes les semences qui sont en excès doivent être rejetées.

Il est très important de choisir avant d'effectuer l'essai proprement dit, le nombre approprié de semences pour l'essai au tétrazolium. Ce serait commettre une grave erreur de procéder différemment. Ceci est particulièrement le cas des types de semences qui sont trempées dans l'eau pendant un certain temps en vue de les préparer pour l'essai. A titre d'exemple, supposons qu'un analyste place plusieurs poignées de graines de coton dans un grand bécber d'eau afin d'attendrir les téguments et de faciliter leur enlèvement. Ensuite, après avoir ramolli les téguments, il insère ses doigts dans le bécber, ramasse quelques semences en même temps et enlève les téguments. Il répète cette opération jusqu'à ce qu'il ait enlevé les téguments de 100 ou 2×100 semences. A la suite de cela, l'essai au tétrazolium donnera toujours un pourcentage de germination inférieur à la réalité car un nombre disproportionné de graines légères et détériorées flottant dans l'eau seront comprises dans l'essai. Il est évident qu'il ne faut pas employer de telles méthodes. Au contraire, placer dans le bécber pour les faire tremper le nombre approprié de semences pour l'essai, avec quelques semences en plus. Après trempage, il faut enlever toutes les semences et les utiliser pour l'essai.

Pour la plupart des usages, 2×100 semences sont suffisantes pour l'essai au tétrazolium. Dans certains cas, 2×50 ou 1×100 semences donneront les renseignements nécessaires. Lorsqu'on ne cherche qu'à faire une évaluation approximative de la vitalité en bonne, moyenne ou médiocre, il suffit de 1×50 semences.

Après avoir choisi les semences, celles-ci doivent être soumises à un traitement préalable en vue de l'essai au tétrazolium.

TRAITEMENT PREALABLE DES SEMENCES

Il est souhaitable et fréquemment nécessaire de soumettre à un traitement préalable les semences avant de les préparer pour l'essai au tétrazolium. Des semences telles que celles d'orge, maïs, blé et riz qui sont coupées en deux, doivent être ramollies par trempage dans de l'eau ou en les plaçant sur une matière humide. Le traitement préalable facilite non seulement le sectionnement mais donne une coloration plus nette et plus claire. Dans des cas exceptionnels, les semences peuvent être fendues en deux à l'état sec. Etant donné que le temps joue un rôle important, la période de trempage doit être aussi courte que possible, mais suffisante pour ramollir les semences destinées à être sectionnées ou décortiquées. Certains prétendent que le traitement préalable prolongé améliore la qualité de l'essai. Le traitement préalable facilite en effet l'interprétation mais cependant, l'allongement de la durée peut ne pas compenser la facilité accrue de l'interprétation.

Le traitement préalable au ramollissement des semences se fait plus rapidement lorsque la température est plus élevée. En général, la plupart des semences peuvent être traitées d'une manière satisfaisante à 30° environ.

PREPARATION DES SEMENCES

Il existe plusieurs méthodes générales pour préparer les semences en vue de l'essai au tétrazolium. Le choix d'une méthode dépend des semences utilisées et la question va maintenant être étudiée en détail pour les différents types de semences.

SECTIONNEMENT DES SEMENCES (Fig. 4 A)

Les grosses semences de graminées de dimensions allant de celles du *Paspalum* à celles de maïs, sont sectionnées longitudinalement selon une ligne médiane à travers l'embryon. Après sectionnement, la moitié de la semence est rejetée et l'autre moitié est gardée pour l'essai. D'une manière générale, il est nécessaire de ramollir les semences en les trempant pendant un certain temps dans l'eau afin qu'elles ne se cassent pas et ne s'émiettent pas pendant le sectionnement. Une lame de rasoir à un seul tranchant constitue un excellent moyen pour sectionner les semences. La coupure doit se faire avec un mouvement de scie ou de glissement plutôt qu'en appuyant pour éviter d'endommager la semence et pour obtenir une coupure nette. Après sectionnement, les semences sont placées immédiatement dans une solution de tétrazolium.

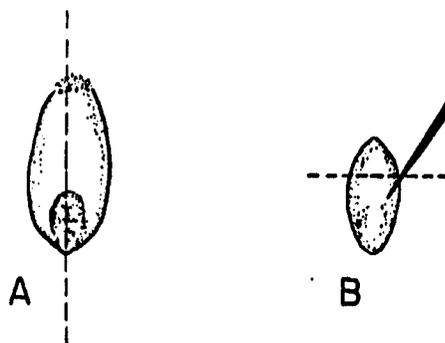


Fig. 4

Méthode de préparation des semences de graminées pour l'essai au tétrazolium. A. Les grosses semences sont fendues longitudinalement à travers l'embryon, ligne brisée. B. Les semences de graminées trop petites pour être coupées longitudinalement sont perforées avec une aiguille dans l'endosperme (point) ou bien on enlève l'extrémité distale (ligne pointillée).

PERFORATION OU ENLEVEMENT DE L'EXTREMITÉ DISTALE (Fig. 4 B)

Les semences de graminées comme celles de chiendent, fléole et pâturin des prés, sont trop petites pour pouvoir être bien coupées en deux. On perce généralement ces semences dans l'endosperme au-dessus

de l'embryon avec une aiguille pointue, ou bien on enlève toute l'extrémité distale (extrémité non embryonnaire de la semence). Un trempage ou traitement préalable est nécessaire avant de perforer ou de couper pour empêcher que la semence ne se brise. Les semences sont traitées préalablement sur du papier filtre humide dans des boîtes de Pétri et sont perforées ou coupées en se servant d'une loupe. Les semences perforées peuvent facilement être enlevées de la pointe de l'aiguille avec l'ongle et être déposées sur un verre de montre contenant une solution de tétrazolium.

ENLEVEMENT DU TEGUMENT DE LA SEMENCE

Dans certains cas, il est nécessaire d'enlever le tégument de la semence et les autres membranes pour permettre l'absorption du tétrazolium. Le trempage est généralement nécessaire pour ramollir suffisamment le tégument pour qu'il puisse être enlevé. Après trempage, le tégument est soigneusement enlevé avec les doigts ou une pince et la semence décortiquée est placée dans la solution de tétrazolium.

COLORATION DIRECTE

Certaines semences, comme celles de trèfle et de vesce, se colorent directement à travers le tégument ; il n'est donc pas nécessaire de leur faire subir un traitement préalable. Les semences séchées à l'air (ou partiellement imbibées) sont placées directement dans la solution de tétrazolium. Les téguments doivent cependant être enlevés avant d'interpréter les résultats. On peut employer un autre système : tremper les semences, enlever le tégument, puis les placer dans le tétrazolium. Le premier système semble être préférable, car les dégâts occasionnés par hasard du fait de l'enlèvement des téguments se produisent après la coloration des semences plutôt qu'avant et les résultats sont donc plus faciles à interpréter.

COLORATION

Il ne faut pas laisser sécher, avant de les placer dans la solution de tétrazolium, les semences qui doivent subir un traitement préalable ou être trempées avant d'être colorées. Elles doivent toujours être recouvertes de solution ou d'eau claire. Par exemple, les graines de soja qui ont été placées pendant toute une nuit sur des serviettes de papier humides, doivent être mises directement dans l'eau pendant plusieurs heures. Après trempage pendant une heure ou deux, il faut enlever l'eau et recouvrir les semences avec un excès de tétrazolium pour permettre une nouvelle absorp-

tion par la graine. Les grains de maïs, après avoir trempé dans l'eau pendant au moins quatre heures, doivent être sectionnés et une moitié du grain doit être immédiatement placée dans la solution de tétrazolium.

Lorsque la coloration a atteint l'intensité désirée (rouge vif), il faut enlever la solution de tétrazolium et laver plusieurs fois les semences dans de l'eau. Après le lavage final, il faut laisser suffisamment d'eau dans la soucoupe pour recouvrir complètement les semences. Si on laisse sécher la surface colorée, des teintes anormales se produisent.

Comme le tétrazolium se réduit lentement en un pigment rouge insoluble sous l'effet de la lumière, les semences doivent être conservées dans l'obscurité pendant la période de coloration.

Les différents types de semences se colorent à une vitesse qui est caractéristique de l'espèce pour une température donnée et une concentration connue de tétrazolium. Les semences de même type ou même celles d'un même lot, peuvent ne pas se colorer avec la même rapidité. L'analyste ne peut donc pas s'attendre à ce que toutes les semences servant à un essai déterminé donnent en même temps la teinte rouge clair qui est la meilleure pour l'interprétation des résultats. Certaines semences se colorent rapidement, d'autres lentement. L'essai doit être terminé en vidant la solution de tétrazolium et en lavant dans l'eau lorsque l'intensité moyenne de coloration atteint le degré optimum pour l'interprétation des résultats. Les semences qui n'ont pas été colorées suffisamment doivent être remises dans le tétrazolium pendant un certain temps.

Les variations de l'intensité de la coloration atteignent leur maximum dans les semences qui sont colorées directement à travers le tégument et en particulier dans les espèces de semences à grande « dureté ». Les semences dont le tégument est facilement perméable mais intact, se colorent plus lentement, tandis que celles qui ont une dureté résiduelle se colorent encore plus lentement. Ainsi, sur 100 semences de trèfle incarnat, placées dans une solution à 1 % de tétrazolium pendant trois heures à 40°, 10 peuvent être colorées en rouge sombre, 40 en rouge vif et 30 en rouge vif sur la radicule et les extrémités des cotylédons (le reste de la semence étant légèrement coloré), 10 légèrement colorées et le reste à peine coloré ou totalement incolore. L'uniformité de la coloration peut être accrue en trempant les semences pendant plusieurs heures dans de l'eau avant de les placer dans la solution de tétrazolium.

Certains analystes enlèvent les téguments des semences avant de les tremper et les teindre. L'uniformité de la coloration est grandement accrue par ce moyen, mais les brisures et les dégâts occasionnés aux semences pendant le décorticage rendent l'interprétation plus difficile. Si une radicule est cassée pendant le décorticage et avant la coloration, il faut rejeter la semence ; si elle est cassée pendant le décorticage après la coloration, l'interprétation reste possible.

L'intensité de la coloration est affectée par un grand nombre de facteurs. L'intensité, la profondeur et la rapidité de la coloration des semences qui sont colorées à travers le tégument ou après enlèvement de ce dernier, mais non pas après sectionnement, sont en rapport étroit avec la qualité des semences. Les semences âgées ou très endommagées ou ayant subi des

dégâts mécaniques, se teignent rapidement, d'une manière intense et en profondeur. Les semences vigoureuses se teignent plus lentement et prennent une couleur rouge brillante, qui ne pénètre pas très profondément. Cependant, d'autres semences ayant une faible vigueur se teignent très lentement et parfois donnent une intensité de coloration plus sombre que le rose pâle, quelle que soit la durée et la période de coloration. Le traitement préalable des semences avant la coloration influe aussi sur l'intensité de celle-ci. Les semences trempées dans de l'eau chaude ou qui ont pu absorber lentement de l'eau toute une nuit sur un substratum mouillé, non seulement se colorent plus rapidement à une température donnée, mais prennent une couleur plus claire et plus brillante.

En conséquence, l'analyste doit faire preuve de discernement en ce qui concerne la longueur de la période de coloration. Une couleur rouge vif est la meilleure ; cependant, il n'est pas toujours possible de l'obtenir.

Il n'est pas nécessaire d'interpréter immédiatement les résultats après la coloration et le lavage des semences. Elles peuvent être placées dans un réfrigérateur ou autre endroit frais (à l'abri de la lumière) et on peut attendre plusieurs heures, voire une nuit, avant d'interpréter les résultats.

PRINCIPE DES METHODES

Les méthodes et procédures décrites dans la section suivante sont fondées sur les résultats d'un programme intensif de quatre ans sur la mise au point de l'évaluation de l'essai au tétrazolium. La méthode généralement suivie a consisté à choisir une espèce représentative dans un groupe d'espèces voisines dont les semences ont des caractéristiques similaires. Par exemple, le trèfle incarnat a été choisi comme espèce représentative des légumineuses à petites semences (luzerne, trèfle violet, trèfle blanc, lespedeza, etc.). Les méthodes et procédures ont ensuite été mises au point pour l'espèce représentative. Après avoir été mises au point, ces méthodes ont été essayées sur d'autres espèces du groupe pour déterminer leur valeur. Ainsi, toute modification dans la méthode ou la procédure nécessaire pour une espèce particulière, a été mise au point et évaluée d'une manière approfondie.

Bien que la description donnée dans le présent ouvrage ait été faite en grande partie sur la base des travaux effectués sur des espèces représentatives, on s'est efforcé aussi de « généraliser ». On trouvera, à la fin de la documentation relative aux espèces représentatives, une indication des modifications et adaptations des méthodes d'essais à employer pour les autres espèces du groupe.

Il s'est révélé impossible de mettre au point et d'évaluer des méthodes d'essai pour toutes les espèces voisines d'importance économique, voire même de couvrir tous les « groupes » d'importance économique. On estime cependant que les méthodes qui ont été mises au point et les espèces étudiées sont suffisamment différentes pour qu'au moins l'une des méthodes d'essai décrites puisse être appliquée à presque n'importe quelle espèce de

semence non étudiée dans le présent ouvrage. Par exemple, il est arrivé qu'après avoir mis au point la plupart des méthodes d'essai, l'on ait reçu une demande de mise au point d'un essai pour les graines de dah (*Hibiscus cannabinus*). Comme le dah et le coton appartiennent à la même famille, la structure des graines de dah a été examinée pour déterminer ses points communs avec celle du coton. On a constaté que les deux graines étaient très semblables. Les méthodes d'essai mises au point pour la graine de coton ont donc été essayées sur les graines de dah et on a constaté qu'elles pouvaient être utilisées avec seulement une légère modification.

Les méthodes décrites ici peuvent être qualifiées de méthodes à « haute température ». On a constaté précédemment que la réaction du tétrazolium est beaucoup plus rapide à 40° qu'à la température ambiante normale. En conséquence, pendant tous les travaux de mise au point, on s'est constamment servi d'une température de 40°. Cependant, on a également indiqué les périodes moyennes de coloration à température ambiante.

Les critères d'interprétation sont fondés sur les résultats d'un grand nombre d'essais comparatifs de germination et d'essais au tétrazolium. Pour les espèces autres que les graminées, on a utilisé une autre technique. Les semences ont été légèrement colorées dans une solution à 0,1 % de chlorure de triphényle de tétrazolium-2,3,5 ou violet de tétrazolium et on a dessiné la structure de la coloration sur les différentes semences. Les semences ont ensuite été placées sur du papier humide pour germer. Cette méthode a permis d'établir une corrélation directe entre le mode de coloration et la faculté germinative des diverses semences. Plusieurs milliers d'essais de semences ont été faits. D'après ces renseignements, on a établi une classification des réactions types de coloration pour chaque espèce.

Les auteurs se sont heurtés à un grave problème de sémantique lorsqu'il s'est agi d'enregistrer toutes les observations sur les teintes de couleurs, la clarté de la coloration, la texture du tissu, observations qui ont gagné en précision avec l'expérience. Bien que ce problème n'ait pas été résolu d'une manière satisfaisante, les auteurs se sont efforcés de faire figurer dans la description le plus grand nombre possible d'observations.

V. METHODES A EMPLOYER POUR CERTAINES ESPECES DE SEMENCES

MAIS (Zea mays)

STRUCTURE DU GRAIN ET DE LA PLANTULE

La structure du grain et de la plantule de maïs a été examinée en détail dans une section précédente (fig. 1).

PREPARATION ET COLORATION DES SEMENCES

Le tétrazolium ne traverse pas le péricarpe cireux du maïs. Il est donc nécessaire de couper les semences à travers l'embryon afin d'exposer les tissus embryonnaires au produit chimique. Etant donné qu'il est presque impossible de fendre les semences sèches sans les briser, les semences doivent être ramollies (traitement préalable) par trempage dans de l'eau avant le sectionnement. Généralement, il suffit de les laisser de quatre à six heures dans de l'eau à 30°. Si l'on dispose de plus de temps, le traitement préalable des semences pendant toute une nuit sur du papier humide à 30° améliorera la clarté de la coloration et facilitera l'interprétation des résultats. Lorsque les semences ont été traitées ou ramollies, elles sont placées sur un buvard humide puis sectionnées longitudinalement et par le milieu à travers l'embryon avec une lame de rasoir à un seul bord tranchant ou avec tout autre instrument très coupant. La coupure doit être faite avec un mouvement de glissement ou de scie pour empêcher l'écrasement ou l'éclatement des tissus. La moitié de chaque semence est ensuite placée immédiatement dans une solution de tétrazolium à 0,5 %, l'autre moitié étant rejetée. Les grains de maïs se colorent d'une manière satisfaisante en trente minutes ou une heure à 40° C ou dans un temps un peu plus long à la température ambiante. Pour certains lots, il faut parfois plus de temps. Lorsque la coloration est devenue rouge vif, on enlève la solution de tétrazolium et on lave les semences plusieurs fois dans de l'eau fraîche. Il faut conserver suffisamment d'eau après le lavage final pour couvrir complètement les semences.

INTERPRETATION

Bien que l'embryon d'un grain de maïs soit facilement visible à l'œil nu, l'interprétation est grandement facilitée par l'emploi d'une loupe à faible pouvoir grossissant. Les grains qui ne peuvent pas germer comprennent ceux dont les embryons sont complètement incolores ou n'ont que certaines zones colorées. La radicule peut être non colorée jusqu'aux trois quarts de sa longueur (à partir du bout) sans que la faculté germinative du grain en soit altérée. Cependant, si la zone non viable de la radicule s'étend vers le haut dans la région d'où partent les radicelles, le grain doit être classé comme non viable.

La plumule est un organe extrêmement critique et même des zones insignifiantes qui ne sont pas colorées empêchent le grain de germer normalement. Il arrive qu'un grain ne soit pas sectionné exactement à travers la plumule et que la coléoptile puisse entourer complètement les feuilles rudimentaires. Comme le tétrazolium ne pénètre pas facilement dans la partie intacte de la plumule, le tissu peut être classé par erreur comme non viable. Cependant, au moyen d'une loupe, on peut facilement vérifier si l'absence de coloration est le résultat de la présence d'un tissu non viable ou d'un embryon mal sectionné. Sur une plumule mal sectionnée,

la coléoptile intacte paraît comme brillante, cireuse, conique, tandis que le tissu non viable est très blanc, mat et mou. Dans ce cas, la coléoptile doit être convenablement sectionnée en se servant d'une loupe et les grains doivent être remis dans la solution de tétrazolum pendant quelques minutes encore.

Aussi bien l'extrémité supérieure que l'extrémité inférieure de la scutelle peuvent être non viables ou non colorées sans que la faculté germinative du grain en soit altérée. Cependant, si la scutelle est complètement dépourvue de coloration, ou si la zone de fixation de la scutelle à l'axe embryonnaire est complètement dépourvue de coloration, le grain peut être classé comme non viable.

Une écume blanchâtre revêt fréquemment la partie colorée des embryons des semences âgées et des semences de faible vigueur. Si cette écume est superficielle, la faculté germinative n'en est pas altérée. Si, cependant, l'écume est profonde et tendue, le grain doit être considéré comme non viable.

La planche n° 1 représente seize réactions types de coloration de grains de maïs. La signification et la classification de chaque type de coloration sont indiquées dans la légende.

L'exactitude de cet essai est excellente. Sur les grains âgés ou les grains d'une faible vigueur, l'erreur la plus fréquente est celle qui consiste à sous-estimer la faculté germinative.

PLANCHE I

Critères pour interpréter les résultats d'essais au tétrazolum sur des grains de maïs. Les régions noires indiquent les tissus colorés et viables ; les régions blanches représentent les tissus non colorés et non viables.

- | | |
|----------|--|
| N° 1 | Viable : tout l'embryon est coloré en rouge clair. |
| N° 2 — 4 | Viables : les extrémités de la scutelle ne sont pas colorées. |
| N° 5 — 6 | Viables : les extrémités de la scutelle ne sont pas colorées ; les régions non critiques de la radicule ne sont pas colorées. |
| N° 7 — 8 | Non viables : la zone d'où partent les radicelles n'est pas colorée. |
| N° 9 | Non viable : la plumule n'est pas colorée. |
| N° 10 | Non viable : la partie centrale de la scutelle et la zone de développement des radicelles séminales ne sont pas colorées. |
| N° 11 | Non viable : la plumule et la radicule ne sont pas colorées. |
| N° 12 | Non viable : la zone non colorée de la partie inférieure de la scutelle et de la radicule se prolonge dans la région où les radicelles prennent naissance. |
| N° 13 | Non viable : la scutelle est entièrement non colorée. |
| N° 14 | Non viable : la scutelle et la radicule ne sont pas colorées. |
| N° 15 | Non viable : coloration rose très pâle. |
| N° 16 | Non viable : tout l'embryon est incolore. |

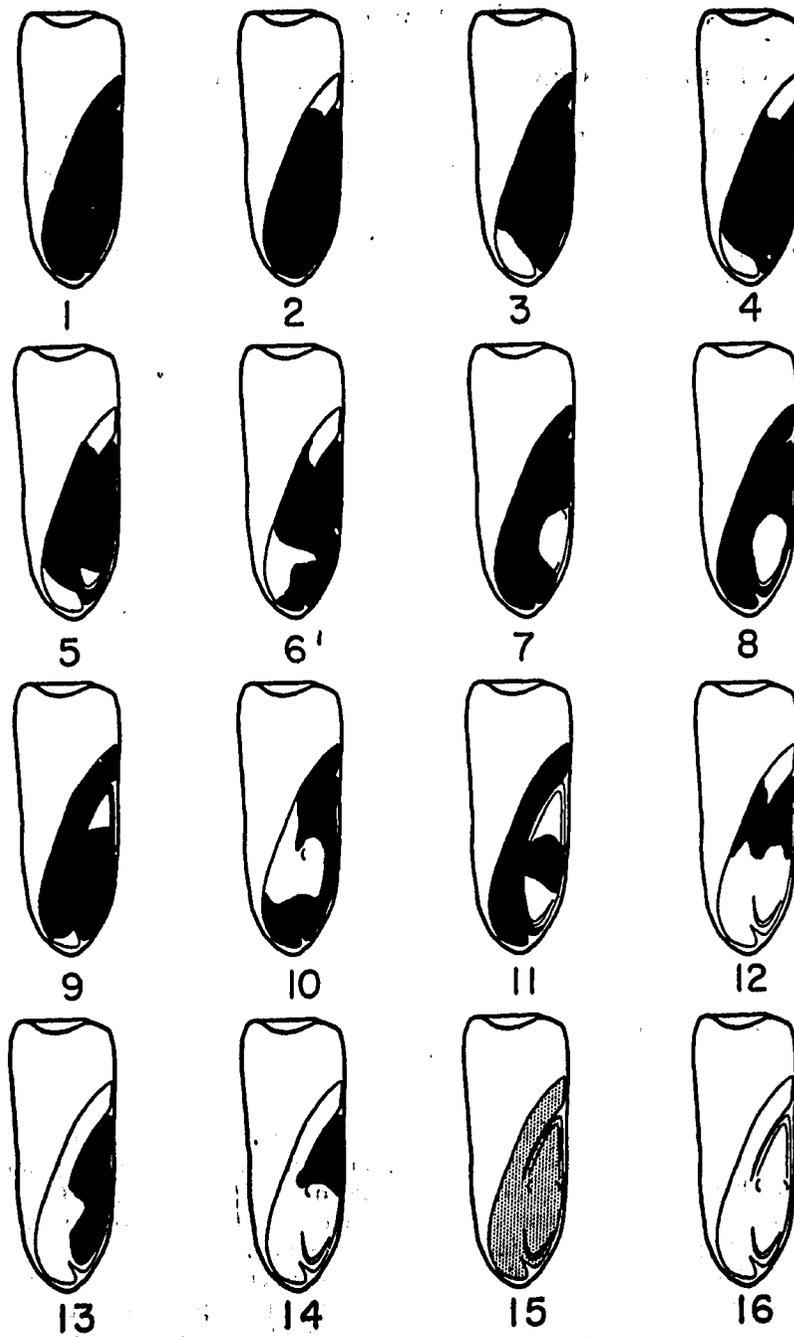


PLANCHE 1

BLE (*Triticum spp*)

STRUCTURE DU GRAIN ET DE LA PLANTULE

La semence ou grain de blé est un fruit sec indéhiscent, à une graine (caryopse), dont l'enveloppe extérieure, ou péricarpe, est soudée au tégument proprement dit. Le grain de blé a généralement une forme ovale. Le côté dorsal ou « supérieur » est lisse et arrondi, tandis que le côté ventral ou « inférieur » est pourvu d'un sillon ou fente longitudinale. L'embryon ou germe est placé à la base et latéralement sur le côté dorsal de la graine et il est visible sous forme d'une petite zone ridée (fig. 5 A).

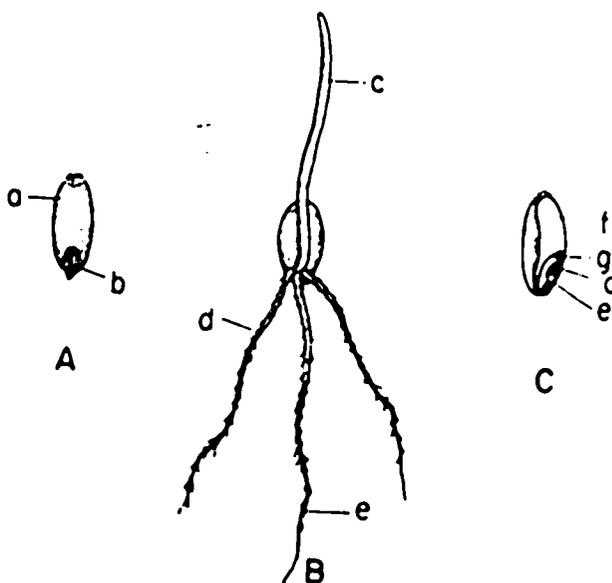


Fig. 5

Structure du grain et de la plantule de blé. A. — Grain intact. B. — Plantule. C. — Grain sectionné. e) Péricarpe, b) germe, c) plumule, d) radicelle, e) racine principale (radicule), f) endosperme, g) scutelle.

L'endosperme occupe la majeure partie de l'intérieur du grain. L'embryon consiste en un axe court au sommet duquel se trouve la plumule et à la base duquel est située la radicule ou racine principale. Cet axe est attaché au centre à une scutelle charnue en forme de bouclier située entre l'endosperme et l'axe embryonnaire. La plumule comprend les feuilles embryonnaires et le bourgeon terminal qui sont entourés d'une enveloppe protectrice, la coléoptile. La radicule ou racine principale est située à la base de l'axe embryonnaire et elle est entourée de la coléorhize. Les radicules sont différenciées dans l'embryon mais ne sont ordinairement pas

visibles dans la section médiane longitudinale. Elles prennent naissance dans la zone située immédiatement au-dessous du point d'attache de la plumule (fig. 5 C).

Pendant la germination, la radicule sort et se transforme en racine principale. La plumule apparaît ensuite toujours entourée par la coléoptyle et les feuilles ne tardent pas à en sortir. Les radicelles se développent peu après l'apparition de la racine primaire (fig. 5 B).

PREPARATION ET COLORATION DES SEMENCES

Les grains de blé doivent être coupés en deux avant d'être colorés. Il suffit généralement de les tremper de trois à quatre heures dans de l'eau à la température ambiante pour adoucir les grains que l'on veut couper. Il est bon de faire subir un traitement préalable aux grains pendant une nuit entre des buvards humides si l'on dispose de suffisamment de temps. Après avoir été ramollis, les grains peuvent être sectionnés sans être brisés et ils sont ensuite sortis de l'eau et placés sur un buvard humide.

Les grains sont ensuite sectionnés longitudinalement et par le milieu à travers l'embryon. Une moitié de chaque grain est placée dans une solution à 0,5 % de tétrazolium, l'autre moitié est jetée. Lorsque tous les grains ont été sectionnés, on les soumet à une température de 40°. A cette température, une coloration satisfaisante apparaît entre trente minutes et une heure, tandis qu'à la température ambiante il faut de une à deux heures pour colorer. Lorsque la coloration est devenue d'une intensité rouge clair, on filtre la solution et on lave plusieurs fois les grains dans de l'eau fraîche. Il faut qu'il y ait suffisamment d'eau après le dernier lavage pour recouvrir complètement les grains.

INTERPRETATION

Pour interpréter les résultats, il faut une loupe afin de bien discerner les éléments essentiels de l'embryon. D'une manière générale, les grains qui ne peuvent pas germer comprennent les suivants : 1) grains dont l'embryon est totalement dépourvu de coloration ; 2) grains dont plus des trois quarts de la radicule (à partir du haut) ne sont pas colorés ; 3) grains ayant des zones non colorées sur la plumule ; 4) grains ayant une zone importante non colorée au point d'attache de la scutelle avec l'axe embryonnaire ; 5) grains dont la scutelle est entièrement dépourvue de coloration ; 6) grains dans lesquels la région située immédiatement au-dessous de la plumule n'est pas colorée.

La planche n° 2 représente seize modes de coloration typiques. La signification et la classification de chaque structure sont indiquées dans la légende.

L'exactitude de l'essai est excellente. Les résultats de l'essai au tétrazolum sur des grains récoltés récemment et sur des grains dormants sont fréquemment supérieurs à ceux donnés par les essais de germination. Cependant, lorsque le repos cesse ou est interrompu, les résultats des essais de germination coïncident d'assez près avec ceux des essais au tétrazolum.

ADAPTATION A DES ESPECES SIMILAIRES DE SEMENCES

Les procédures et méthodes décrites ci-dessus peuvent être adaptées facilement à d'autres types de semences ainsi qu'il est indiqué ci-dessous :

1. AVOINE (*Avena* spp.)

Tremper les grains pendant quatre heures, sectionner, colorer pendant trente minutes à une heure à 40° dans une solution de tétrazolum à 0,5 % (un peu plus longtemps à température ambiante). Si on éprouve des difficultés à sectionner les grains qui ont la paléa et la lemma attachées, il convient de les enlever avant de placer les grains dans l'eau. L'interprétation est la même que pour le blé.

2. ORGE (*hordeum* vulgare)

Tremper les grains dans de l'eau pendant quatre à cinq heures, les sectionner, colorer pendant trente minutes à une heure à 40° dans une solution de tétrazolum à 0,5 % (un peu plus longtemps à la température ambiante). Les grains d'orge peuvent être sectionnés en partant du côté « arrière » ou ventral en suivant la rainure. L'interprétation est la même que pour le blé.

PLANCHE 2

Critères pour interpréter les résultats des essais au tétrazolum sur les grains de blé.
Zones blanches représentent les tissus non colorés et morts.

N° 1	Viable : tout l'embryon est coloré en rouge vif.
Nos 2 — 3	Viables : les extrémités de la scutelle ne sont pas colorées.
N° 6	Viable : les extrémités de la scutelle, la pointe de la radicule et la coléorhyze ne sont pas colorées.
N° 7	Non viable : Plus des trois-quarts de la radicule ne sont pas colorés.
N° 8	Non viable : la plumule n'est pas colorée.
N° 9	Non viable : la partie centrale de la scutelle et le nœud de la scutelle ne sont pas colorés.
N° 10	Non viable : l'axe embryonnaire n'est pas coloré.
N° 12	Non viable : toute la moitié supérieure de l'embryon n'est pas colorée.
N° 13	Non viable : la scutelle n'est pas colorée.
N° 14	Non viable : la scutelle, la radicule et la coléorhyze ne sont pas colorées.
N° 15	Non viable : la coloration est d'un rose pâle.
N° 16	Non viable : tout l'embryon est incolore.

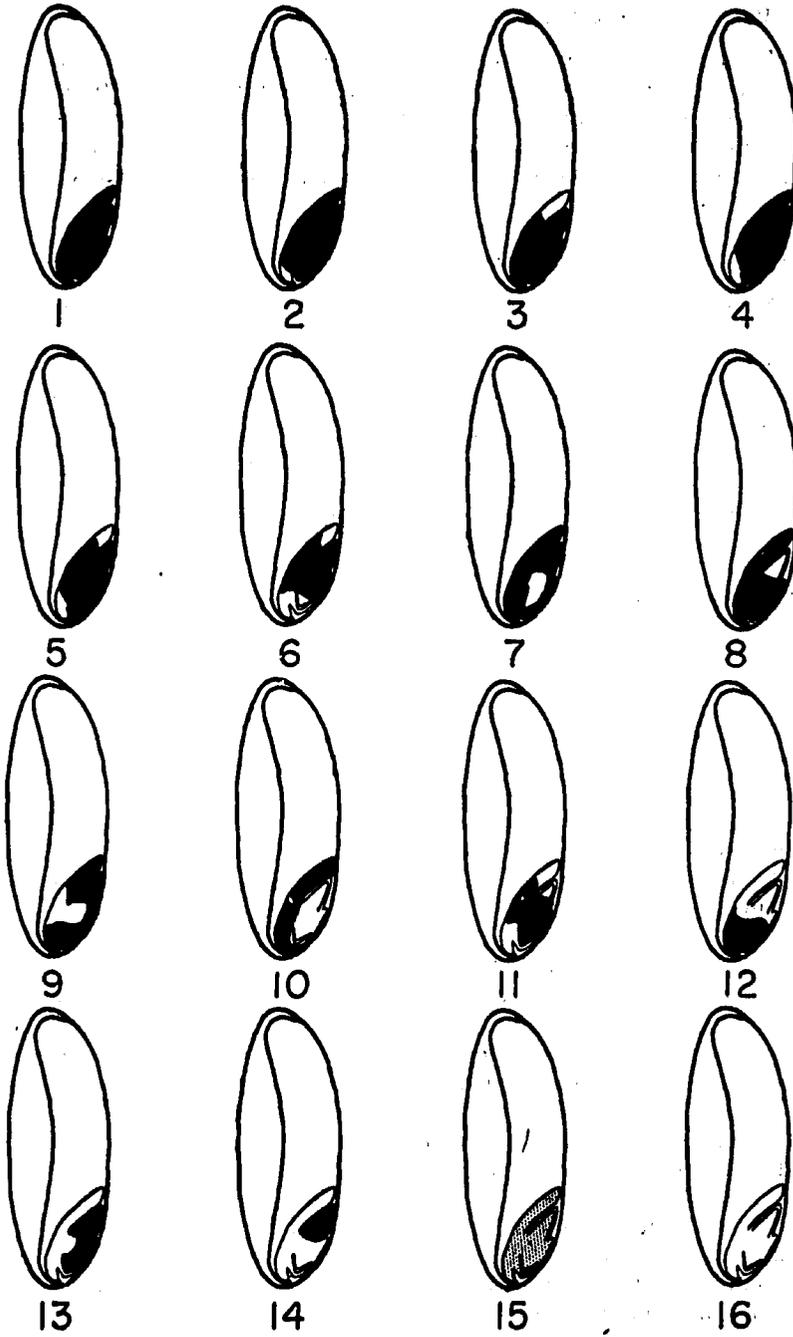


PLANCHE 2

3. SEIGLE (secale cereale)

Tremper les grains dans de l'eau pendant quatre à cinq heures, les sectionner, colorer pendant trente minutes à une heure à 40° dans une solution de tétrazolium à 0,5 % (un peu plus longtemps à la température ambiante). La radicule du seigle est proéminente et pointue ; il faut veiller à ce que la pointe ne soit pas brisée pendant le sectionnement.

4. SORGHO (sorgum vulgare)

Structure des grains et de la plantule : le grain de sorgho est un fruit ou caryopse à une seule graine, sec, indéhiscant. Les glumes ou téguments sont généralement enlevés lors de la récolte et du battage. Cependant, ils persistent dans quelques variétés. Les grains mûrs ont tendance à être globulaires ou en forme de poire et quelquefois ils sont aplatis sur la partie dorsale et ventrale. L'embryon ou germe est généralement discernable vers la base du côté dorsal. Le grain est entouré par le péricarpe (fig. 6, 2).

L'intérieur du grain est occupé par l'endosperme et l'embryon. L'embryon est relativement gros et comprend trois organes principaux : 1) la plumule ; 2) la radicule et 3) la scutelle. La plumule est placée à l'extrémité d'un axe court (mésocotyle) et elle est entourée par la coléoptile. La radicule est continue et son axe est situé à son extrémité proximale ou basilaire et il est entouré aussi par une gaine, le coléorhyse. La scutelle a une forme de bouclier et elle est située entre l'endosperme et l'axe embryonnaire. Elle est attachée en son centre à l'axe embryonnaire. Il n'y a pas de radicelles pré-formées comme dans le cas du maïs et du blé (fig. 6, C).

Lors de la germination, la radicule sort et pousse rapidement ; de nombreuses radicelles apparaissent. La plumule sort toujours engainée par la caléoptile. Cependant, les feuilles sortent rapidement par une fente située près du sommet du coléoptile (fig. 6, B).

Préparation et coloration des semences : on trempe les grains de sorgho pendant quatre à cinq heures dans de l'eau chaude à 40° pour les ramollir en vue de les sectionner. La préparation des grains sur du papier humide pendant une longue période de temps n'est pas nécessaire, cependant elle améliore la qualité de la coloration. Lorsque les grains ont été ramollis, on les place sur des buvards humides et on les sectionne par le milieu et longitudinalement à travers l'embryon. Une moitié de chaque grain est placée immédiatement dans une solution à 0,5 % de tétrazolium ; l'autre moitié est jetée.

Une coloration satisfaisante se produit généralement entre trente minutes et une heure à 40°, ou en une période plus longue à température ambiante. Il est préférable de vérifier les progrès de la réaction et de vider la solution lorsque l'intensité moyenne de coloration atteint le rouge vif. La solution de tétrazolium est ensuite remplacée par de l'eau fraîche après plusieurs lavages.

Interprétation : l'interprétation n'est pas difficile. Il est préférable d'employer une loupe afin que toutes les structures de l'embryon soient clairement visibles. Les grains non viables comprennent les suivants : 1) les grains sur lesquels plus de la moitié de l'extrémité de la radicule n'est pas colorée ; 2) les grains sur lesquels une partie de la plumule n'est pas colorée ; 3) les grains dont la partie centrale de la scutelle n'est pas colorée et 4) les grains dont les embryons sont colorés en rose très pâle.

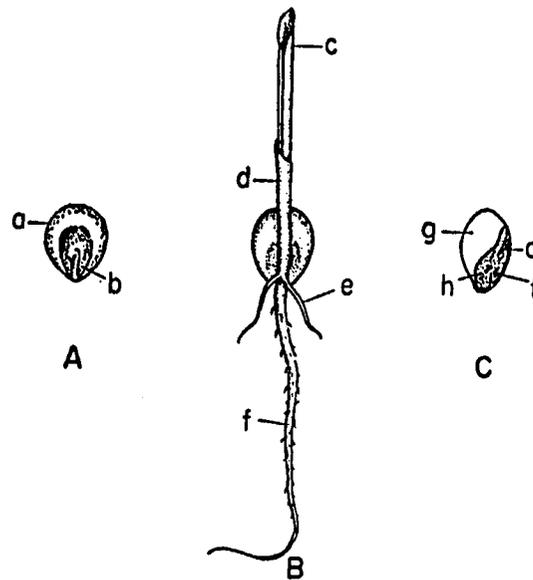


Fig. 6

Structure du grain et de la plantule de sorgho. A. Grain — B. Plantule — C. Grain sectionné, a) péricarpe, b) germe, c) plumule, d) coléoptile, e) racine latérale, f) racine principale (radicule), g) endosperme, h) scutelle.

Il est évident, d'après ce qui précède, que les critères retenus pour interpréter la coloration de la radicule sur le sorgho ne sont pas les mêmes que pour les autres grains. Dans le sorgho, la radicule ou racine principale n'est pas une structure indispensable. La racine principale, en même temps que les racines latérales qui poussent sur toute sa longueur, constitue le système racinaire pendant le début de la croissance de la plantule. Il n'y a pas de véritables radicelles. Les racines adventives provenant des nœuds basilaires contribuent à la croissance du système racinaire de la plantule et de la plante. Comme la racine principale est indispensable, tout dégât qui touche plus que le bout extrême provoque un développement anormal de la plantule.

La planche 3 représente seize réactions typiques de coloration. La signification et la classification de chaque réaction sont indiquées dans la légende.

Adaptation à des espèces similaires de graines.

Les procédures décrites ci-dessus pour le sorgho sont facilement adaptables à des graines de variétés similaires en y apportant les modifications suivantes :

1. SORGHO D'ALEP (sorghum halepense)

Placer les grains entre des buvards humides pendant seize heures (toute une nuit), sectionner les grains et les placer dans une solution à 0,5 % de tétrazolium pendant trois à quatre heures à 40° ou six à huit heures à la température ambiante. L'interprétation est analogue à celle du sorgho. Comme les grains dormants ne se colorent pas, les résultats de l'essai au tétrazolium sont équivalents au pourcentage de germination plus un certain pourcentage de grains durs.

2. SORGHO à petits grains (sorghum sudanense)

Faire tremper les grains pendant quatre à six heures dans de l'eau à 30°, sectionner les grains et les colorer dans une solution à 0,5 % de tétrazolium pendant une heure ou deux — à 40° (un peu plus longtemps à température ambiante). L'interprétation est analogue à celle du sorgho.

3. SORGHO alnum : même chose que pour le précédent.

PLANCHE 3

Critères pour interpréter les résultats des essais au tétrazolium sur les grains de sorgho. Les zones noires indiquent les tissus colorés et vivants ; les zones blanches représentent les tissus non colorés et morts.

N° 1	Viable : embryon uniformément coloré.
N°s 2 — 5	Viabiles : extrémités de la scutelle non colorées.
N° 6	Viable : extrémités de la scutelle non colorées, coléorhise et pointe extrême de la radicule non colorées.
N° 7	Non viable : radicule non colorée.
N° 8	Non viable : plumule non colorée.
N° 9	Non viable : partie centrale de la scutelle non colorée ; les zones non colorées s'étendent au mézocotyle.
N° 10	Non viable : radicule complètement incolore.
N° 11	Non viable : moitié inférieure de l'embryon non colorée.
N° 12	Non viable : partie supérieure de l'embryon non colorée.
N° 13	Non viable : scutelle non colorée.
N° 14	Non viable : scutelle et radicule non colorées.
N° 15	Non viable : embryon coloré en rose très pâle.
N° 16	Non viable : embryon entièrement incolore.

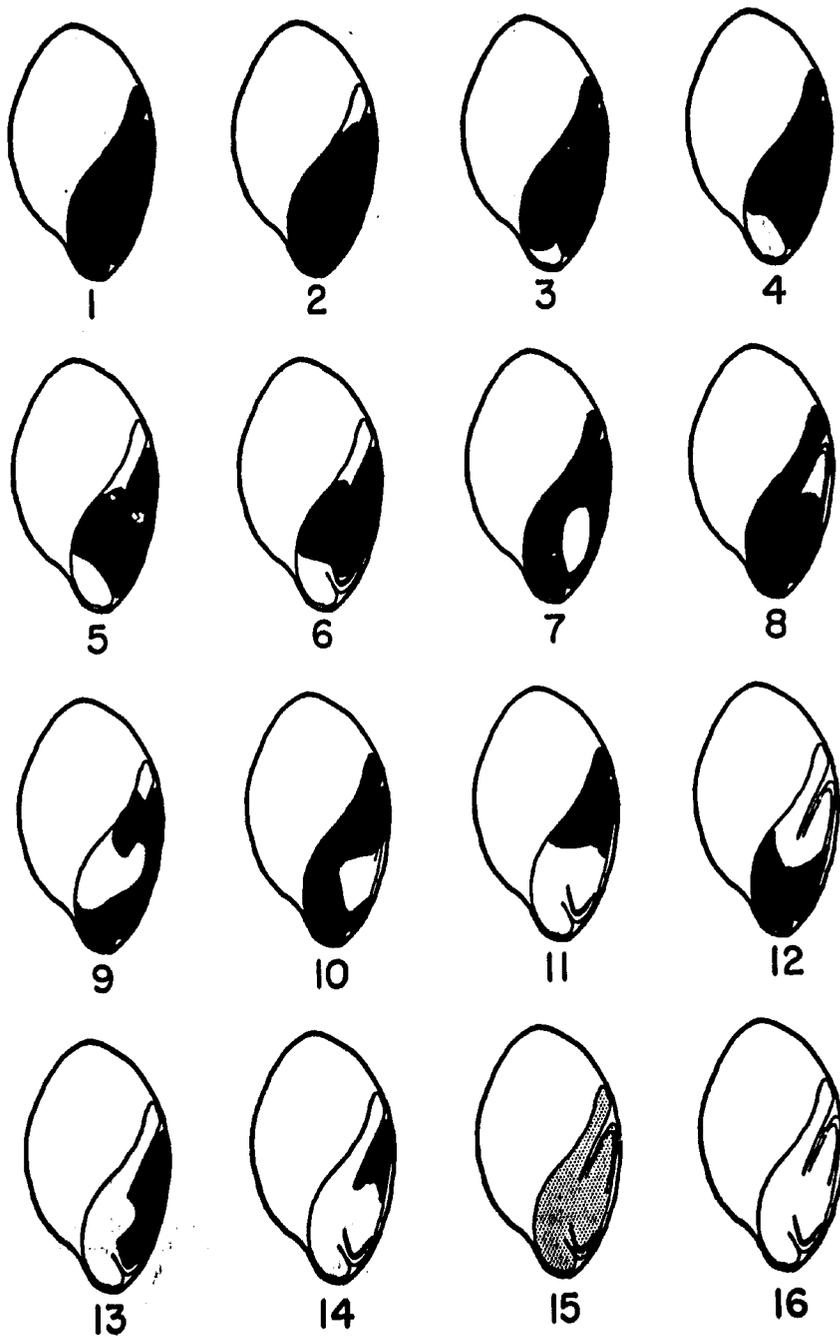


PLANCHE 3

RIZ (*Oryza sativa*)*Structure du grain et de la plantule.*

La semence de riz est un fruit sec, indéhiscent, contenant une seule graine entourée de deux bractées, la lemma et la paléa, entre lesquelles se trouvent deux petits glumes. Les grains de riz sont aplatis latéralement par rapport aux grains des autres céréales qui sont aplatis dorso-ventralement (Fig. 7. A).

L'embryon est situé à la base de la face étroite et dorsale du caryopse (du côté de la lemma). Il est relativement petit par rapport à l'endosperme. L'embryon comprend trois organes principaux : 1) la plumule, 2) la radicule, 3) la scutelle. La plumule et la radicule sont réunies par une courte tige et constituent l'axe embryonnaire. L'axe embryonnaire n'est pas rectiligne comme dans les autres céréales, mais il a une forme de boomerang. Le bras long dirigé vers le haut est la plumule entourée par la coléoptile. La radicule constitue le bras basilaire dirigé horizontalement et elle est entourée par la coléorhize. L'axe embryonnaire est attaché en son centre à la scutelle qui est située entre l'endosperme et l'axe embryonnaire. (Fig. 7. C).

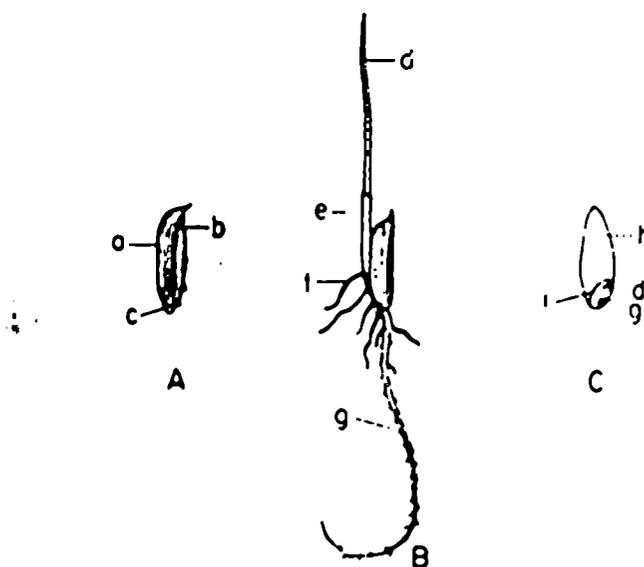


Fig 7

Structure du Grain et de la plantule de riz. A. grain — B. Plantule — C. grain sectionné, a) lemma, b) palea, c) glume, d) plumule, e) coléoptile, f) racine latérale, g) racine principale (radicule), h) endosperme, i) scutelle.

Lors de la germination, la radicule sort de la base du grain et est suivie rapidement de deux racines supplémentaires qui toutes ensuite donnent naissance à de courtes racines latérales. Le système racinaire

principal se développe ultérieurement à partir des nœuds de la tige au-dessous du niveau du sol. Après apparition de la racine principale, la plumule sort encore engainée par la coléoptile mais les feuilles ne tardent pas à sortir par la fente latérale près du sommet de la coléoptile (Fig. 7 B.)

Préparation et coloration des grains.

Le tétrazolium ne pénètre pas le péricarpe cireux du grain de riz. En conséquence, le péricarpe doit être rompu d'une manière quelconque pour permettre l'absorption du produit chimique par l'embryon. Il existe plusieurs méthodes permettant d'atteindre ce résultat.

Méthode 1. — Préparer les semences dans de l'eau ou sur une matière humide pendant 8 à 16 heures (toute une nuit) puis les sectionner par le milieu et longitudinalement à travers l'embryon.

Méthode 2. — Décortiquer le grain, le préparer pendant 8 à 16 heures dans de l'eau ou en le posant sur une matière humide, puis fendre le péricarpe sur le côté de l'embryon.

Méthode 3. — Décortiquer le grain, le préparer pendant 16 à 24 heures en le faisant tremper dans de l'eau ou en le posant sur une matière humide à 30°, puis placer les grains directement dans la solution de tétrazolium. (Pendant la longue période de préparation, l'embryon se développe généralement suffisamment pour rompre le péricarpe).

La méthode 1 est à préférer car elle expose la structure interne de l'embryon et facilite la coloration ainsi que l'interprétation. Il faut beaucoup d'habileté et de patience cependant pour sectionner exactement les grains aplatis latéralement. La seconde méthode est satisfaisante, mais la coloration est plus lente et l'interprétation doit être fondée sur l'aspect extérieur de l'embryon à travers le péricarpe translucide.

La méthode 3 présente le même inconvénient que la méthode 2. En outre, le péricarpe de certains grains ne se rompt pas pendant la période de préparation et en conséquence le tétrazolium n'entre pas en contact avec l'embryon. Il faut détecter ces grains, puis en rompre artificiellement le péricarpe et les placer de nouveau dans la solution de tétrazolium.

Les méthodes exposées ci-après s'appliquent tout particulièrement au sectionnement, mais cependant elles peuvent être facilement adaptées aux deux autres méthodes.

Après avoir sectionné les grains, une moitié de chacun d'eux est placée immédiatement dans une solution de tétrazolium à 0,5 %. A 40°, la coloration se fait en une ou deux heures, tandis qu'il faut de 3 à 6 heures à la température ambiante. Lorsque la coloration a atteint l'intensité voulue, on vide la solution puis on lave les grains plusieurs fois dans de l'eau fraîche, en laissant suffisamment d'eau après le dernier lavage pour les recouvrir.

Interprétation.

L'interprétation doit se faire au moyen d'une loupe. Les grains non viables comprennent les suivants : 1) les grains dont la plumule est partiellement ou complètement incolore, 2) les grains sur lesquels la partie centrale

de la scutelle est incolore, 3) les grains dont les 2/3 de la radicule (à partir du bout) ne sont pas colorés, et 4) les grains dont l'embryon est coloré en rose pâle.

La Planche 4 représente 16 types de coloration. La signification et la classification de chaque réaction sont indiquées dans la légende.

L'exactitude de cet essai est satisfaisante. Les grains récoltés récemment sont fréquemment dormants et l'essai au tétrazolium donne des résultats supérieurs à ceux des essais de germination. Comme le repos est généralement de courte durée, le pourcentage de germination atteindra au bout de quelques semaines le même chiffre que celui qui est donné par les essais au tétrazolium.

FETUQUE FLEVEE (*Festuca arundinacea*)

Structure de la graine et de la plantule.

La semence de fétuque est un fruit sec indéhiscent à une graine, entourée par deux bractées, la lemma et la paléa. La lemma est la plus grande des deux bractées et elle est arrondie à sa partie inférieure et son bord entoure le bord extérieur de la pallea aplatie. Un élément court, la rachile, est présent près de la base de la palea. L'embryon est placé latéralement et basilairement dans la graine au-dessous de la lemma (Fig. 8 A).

La structure de l'embryon est analogue à celle des autres graminées. La plumule est entourée par la coléoptile et elle est située à la partie terminale, sur un axe court : le mésocotyle. La radicule, qui est entourée par la

PLANCHE 4

Critères pour interpréter les résultats des essais au tétrazolium sur les grains de riz. Les zones noires indiquent les tissus colorés et vivants ; les zones blanches représentent les tissus non colorés et morts.

N° 1	Viable : l'embryon est coloré uniformément et complètement.
N° 2 — 3	Viables : les extrémités de la scutelle ne sont pas colorées.
N° 4	Viable : le bout extrême de la radicule n'est pas coloré.
N° 5	Viable : les deux extrémités de la scutelle ne sont pas colorées.
N° 6	Viable : la partie supérieure et la partie basilaire de la scutelle ne sont pas colorées ; la coléorhize et le bout de la radicule ne sont pas colorés.
N° 7	Non viable : une partie de la plumule n'est pas colorée.
N° 8	Non viable : la partie supérieure de la radicule n'est pas colorée.
N° 9	Non viable : la scutelle est complètement incolore.
N° 10	Non viable : l'axe embryonnaire n'est pas coloré.
N° 11	Non viable : la moitié supérieure de l'embryon n'est pas colorée.
N° 12	Non viable : la moitié inférieure de l'embryon n'est pas colorée.
N° 13	Non viable : l'axe embryonnaire et la majeure partie de la scutelle ne sont pas colorés.
N° 14	Non viable : la scutelle et la radicule ne sont pas colorées.
N° 15	Non viable : l'embryon est coloré en rose très pâle.
N° 16	Non viable : l'embryon est complètement incolore.

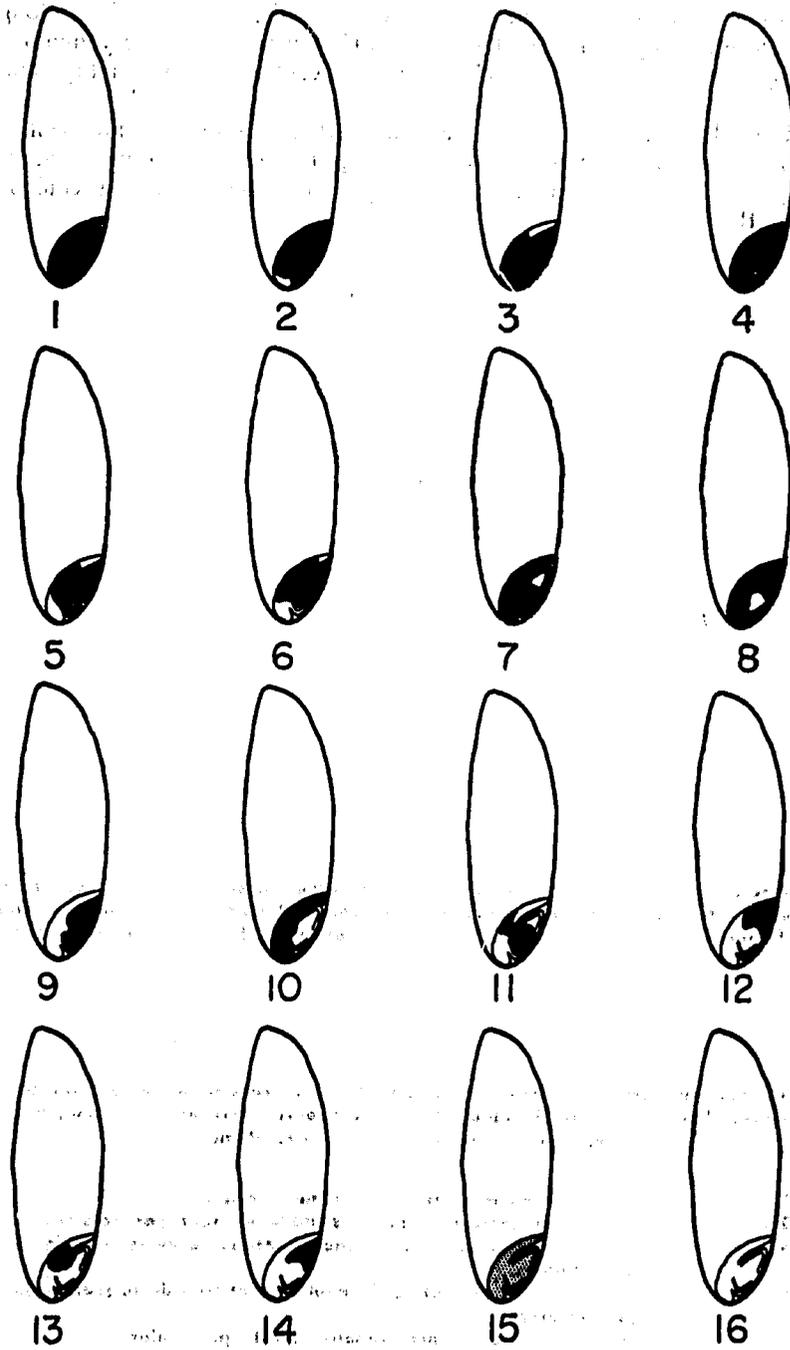


PLANCHE 4

coléorhyse est divisée basalement et elle est disposée dans le prolongement du mésocotyle. La scutelle est située entre l'axe embryonnaire et l'endosperme et elle est attachée en son centre à l'axe embryonnaire (Fig. 8 C).

Lors de la germination, la racine sort et s'allonge rapidement. La plumule sort encore entourée de la coléoptile, mais les feuilles ne tardent pas à sortir par une fente située près du sommet de la coléoptile (Fig. 8 B).

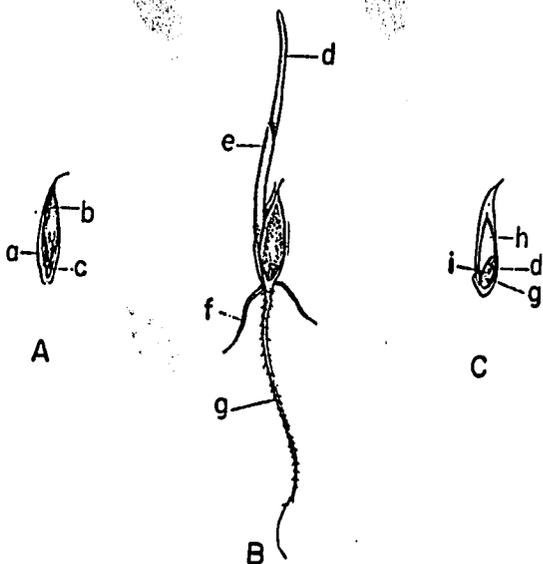


Fig. 8

Structure de la graine et de la plantule de la fétuque élevée. A. graine, vue ventrale. B. plantule, C. graine sectionnée, a) lemme, b) palea, c) rachille, d) plumule, e) coléoptile, f) racine latérale, g) racine principale, (radicule), h) endosperme, i) scutelle.

PLANCHE 5

Critères pour interpréter les résultats des essais au tétrazolium sur les graines de fétuque élevée. Les zones noires indiquent les tissus colorés et vivants ; les zones blanches représentant les tissus non colorés et morts.

- | | |
|------------|--|
| N° 1: | Viable : l'embryon est complètement coloré. |
| Nos 2. — 4 | Viables : les extrémités de la scutelle ne sont pas colorées. |
| N° 5: | Non viable : la racine et la moitié inférieure de la scutelle ne sont pas colorées. |
| N° 6: | Non viable : la plumule et la moitié supérieure de la scutelle ne sont pas colorées. |
| N° 7: | Non viable : l'axe embryonnaire n'est pas coloré. |
| N° 8: | Non viable : La racine et la scutelle ne sont pas colorées. |
| N° 9: | Non viable : l'embryon est complètement incolore ou d'un rose pâle. |



PLANCHE 5

Préparation et coloration des graines.

Comme le tétrazolum ne pénètre pas à travers le tégument (péricarpe) de la fétuque, les graines doivent être sectionnées de façon à exposer l'embryon au produit chimique. La méthode la plus satisfaisante consiste à traiter préalablement les graines sur du papier filtre humide pendant 16 heures (toute une nuit) à température ambiante afin d'activer le tissu embryonnaire et de ramollir suffisamment les graines pour pouvoir les couper. Un système moins satisfaisant mais qui donne des résultats acceptables en cas de besoin, consiste à tremper les graines dans de l'eau pendant 4 heures environ avant de les sectionner.

Après avoir traité les graines ou les avoir ramollies dans de l'eau, on les sectionne longitudinalement et au milieu à travers l'embryon.

Comme les graines sont assez petites, le débutant peut éprouver des difficultés à faire une section médiane à travers l'embryon. Le bord coupant glisse souvent d'un côté ou de l'autre et l'embryon est sectionné autrement que par le centre, ou bien il fait complètement défaut. Seule, la pratique permettra d'acquérir l'habileté nécessaire pour sectionner les graines. Le débutant doit examiner chaque graine sous une loupe en vue de bien la sectionner, jusqu'à ce qu'il ait acquis l'habileté nécessaire. Après sectionnement, une moitié de chaque graine est placée immédiatement dans une solution de tétrazolum à 0,5 % et l'autre moitié est jetée.

A 40° on obtient une coloration satisfaisante en 2 ou 3 heures. A la température ambiante, il faut de 3 à 6 heures. Après coloration, on enlève les graines de la solution de tétrazolum, puis on les lave plusieurs fois à l'eau fraîche. Il faut garder suffisamment d'eau dans le récipient après le dernier lavage pour recouvrir complètement la graine.

Interprétation.

Une interprétation exacte n'est possible qu'au moyen d'un instrument grossissant. Les embryons sont petits et doivent être examinés soigneusement avant de prendre une décision quant au caractère viable ou non viable de la graine.

L'intensité de la coloration varie considérablement suivant les graines. Elle a manifestement peu de signification, sauf dans le cas d'embryons colorés en rose très pâle, qui sont classés comme non viables.

Les graines non viables comprennent aussi celles qui ont un embryon complètement incolore, un axe embryonnaire incolore et la moitié inférieure ou supérieure de l'embryon incolore. Les tissus morts ou incolores peuvent être d'une couleur jaunâtre, en plus du blanc habituel.

L'exactitude de l'essai est bonne. Cependant, l'habileté nécessaire pour préparer les graines destinées à l'essai est plus difficile à acquérir que dans le cas des céréales. L'erreur la plus courante consiste probablement à surestimer la faculté germinative.

Adaptation à des espèces similaires de graines.

Les procédures et méthodes décrites ci-dessus pour la fétuque élevée peuvent être adaptées aux espèces similaires de graines en y apportant les modifications suivantes :

1) *Raygrass* (*Lolium* spp.) : mêmes méthodes que pour la fétuque. La coloration est un peu plus rapide (1 h 1/2 à 2 heures à 40°).

2) *Brome* (*Bromus cartharticus*) : mêmes méthodes que pour la fétuque, mais la coloration est un peu plus lente, (3 à 5 heures à 40°).

PASPALUM VARIETE PENSACOLA (*Paspalum notatum*)*Structure de la graine et de la plantule.*

La semence du *Paspalum* est un fruit sec, indéhiscent à une graine, entourée par quatre bractées : une glume, une lemma stérile, une lemma fertile et une palea. Les graines ont une forme ovale avec une surface dorsale arrondie et une surface ventrale aplatie (fig. 9, A).

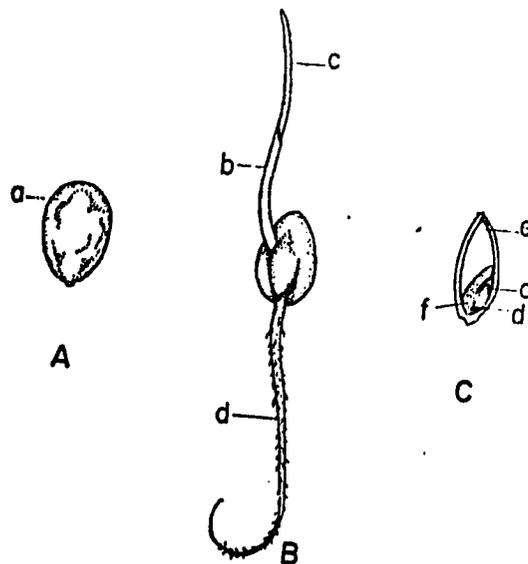


Fig. 9

Structure de la graine et de la plantule de *Paspalum*, var. *Pensacola*. A. graine, B. plantule, C. graine sectionnée : a) tégument, b) coléoptile, c) plumule, d) racine primaire (radicule), e) endosperme, f) scutelle.

L'endosperme occupe la majeure partie de l'intérieur de la graine. La plumule est placée au bout d'un axe court tandis que la radicule est divisée basilairement et dans le prolongement de l'axe. La plumule est engainée dans la coléoptile, tandis que la coléorhyse entoure la radicule. L'axe embryonnaire est fixé en son centre à la scutelle qui est située entre l'endosperme et l'axe embryonnaire (Fig. 9 C).

Préparation et coloration des graines.

Les graines de *Paspalum* var. *Pensacola* doivent être sectionnées pour permettre au tétrazolium d'entrer en contact avec le tissu de l'embryon. Un traitement préalable est nécessaire aussi pour l'obtention d'une coloration claire et facilement interprétable. Les graines doivent être préparées pendant 16 heures (toute une nuit) sur une matière humide à 30°. Après traitement, on sectionne les graines longitudinalement et au milieu à travers l'embryon. La moitié de chaque graine est placée dans une solution à 0,5 % - 1 % de tétrazolium et l'autre moitié est jetée.

On obtient une coloration satisfaisante en deux ou trois heures à 40° ou en 6 à 8 heures à la température ambiante. Après achèvement de la coloration, vider la solution et laver les graines plusieurs fois dans de l'eau fraîche. Garder suffisamment d'eau après le dernier lavage pour recouvrir complètement les graines.

Interprétation.

Il n'est possible de faire une interprétation exacte qu'au moyen d'une loupe. L'intensité de la coloration peut varier du rose au rouge sombre.

Il semble apparemment que l'intensité de la coloration ait peu d'importance, sauf dans le cas de taches roses très pâles qui font classer la graine comme non viable.

PLANCHE 6

Critères pour interpréter les résultats des essais au tétrazolium sur des graines de *Paspalum* var. *Pensacola*. Les zones noires indiquent un tissu coloré et vivant, tandis que les zones blanches représentent un tissu mort et non coloré.

- | | |
|-----------|---|
| N° 1 | Viable : embryon complètement coloré. |
| Nos 2 — 4 | Viables : extrémités de la scutelle non colorées. |
| N° 5 | Non viable : moitié inférieure de l'embryon non colorée. |
| N° 6 | Non viable : l'axe embryonnaire n'est pas coloré. |
| N° 7 | Non viable : la moitié supérieure de l'embryon n'est pas colorée. |
| N° 8 | Non viable : la scutelle et la radicule ne sont pas colorées. |
| N° 9 | Non viable : l'embryon est complètement incolore ou seulement coloré en rose très pâle. |

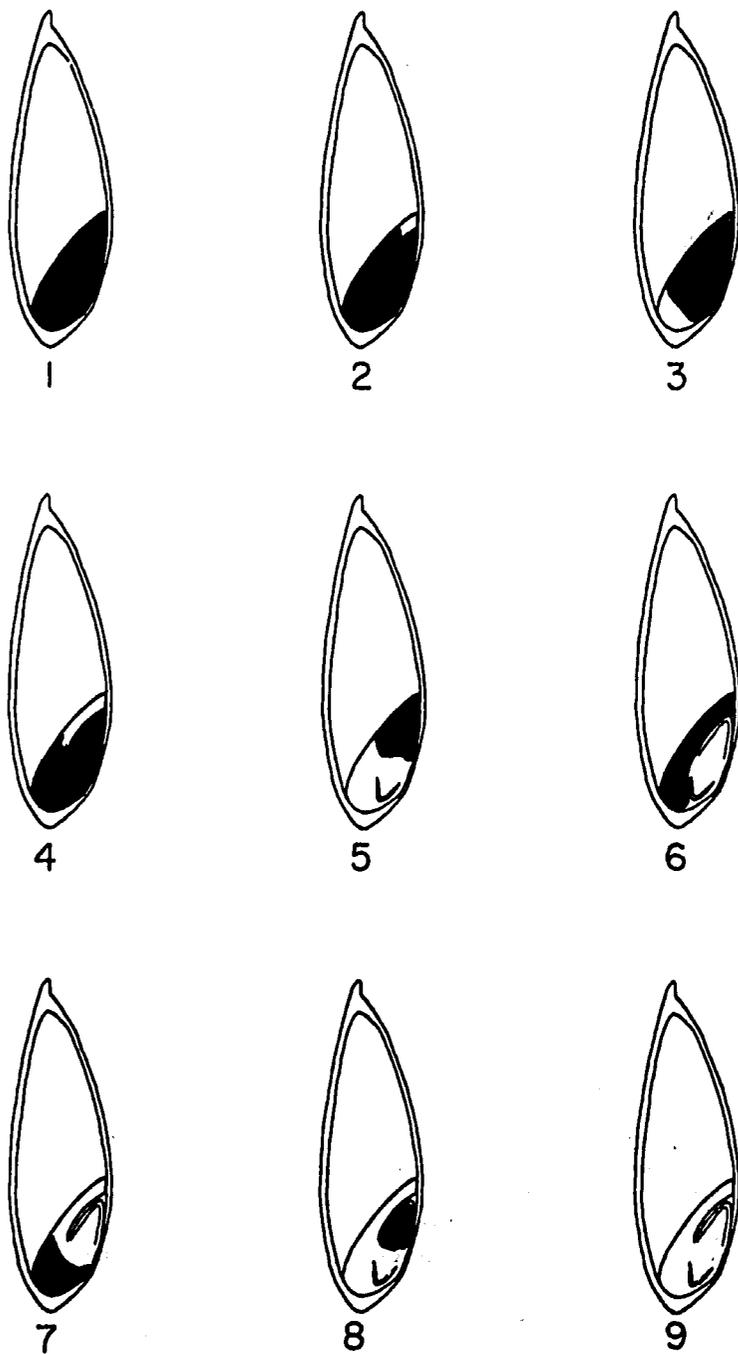


PLANCHE 6

Les graines non viables comprennent aussi les suivantes : 1) les graines sur lesquelles la moitié supérieure et la moitié inférieure de l'embryon ne sont pas colorées, 2) les graines sur lesquelles la scutelle n'est absolument pas colorée, 3) les graines sur lesquelles l'axe entre la radicule et la plumule n'est pas coloré, 4) les graines sur lesquelles tout l'axe embryonnaire n'est pas coloré et 5) les graines dont tout l'embryon est incolore.

L'exactitude de l'essai est bonne. Il convient cependant de souligner une fois de plus que les graines dormantes réagissent positivement et se colorent. Ainsi les résultats de l'essai au tétrazolium donnent une estimation de la vitalité totale et doivent être comparés avec le pourcentage de germination plus le pourcentage de graines dures.

La Planche 6 représente neuf réactions types de coloration. La signification et la classification de chaque réaction sont indiquées dans la légende.

Adaptation à des espèces similaires de graines.

Les méthodes indiquées ci-dessus sont facilement adaptables à d'autres espèces de graines en y apportant les modifications indiquées.

1. *Paspalum d'Argentine* (*Paspalum notatum*) : Mêmes méthodes que celles décrites pour le Pensacola, sauf le temps, de coloration qui est de 4 à 6 heures à 40° et de 8 à 10 heures à température ambiante.

2. *Paspalum dilatatum* : Mêmes méthodes que celles décrites pour la variété Pensacola, sauf le temps de coloration qui est de 3 à 6 heures à 40° et de 8 à 10 heures à température ambiante.

3. *Paspalum platycaule* (*Axonopus affinis*) : Mêmes méthodes que celles décrites pour la variété Pensacola, avec cette différence que le temps de coloration est de 4 à 6 heures à 40° et de 8 à 10 heures à température ambiante (*Paspalum platycaule* peut aussi être essayé par les méthodes qui sont décrites pour le chien-pied de poule).

CHIENDENT PIED DE POULE (*Cynodon dactylon*)

Structure de la graine et de la plantule.

Les semences de chien-pied sont des fruits à une graine ou caryopse. Les graines vendues dans le commerce sont généralement décortiquées, bien que l'on trouve parfois des lots de graines non décortiquées. Les graines décortiquées sont petites, de forme ovale et d'une couleur brunâtre. La lemma des graines non décortiquées est fortement comprimée et de couleur paille (Fig. 10 A).

L'embryon est visible vers la base du côté dorsal de la graine. La structure interne de l'embryon est analogue à celle du *Paspalum*. Vue du haut, la radicule de la plumule ressemble à un axe en forme d'haltère logé dans une scutelle charnue en forme de bouclier (Fig. 10 C).

Au moment de la germination, la radicule sort et pousse rapidement. La plumule apparaît encore engainée par la coléoptile, mais les feuilles ne tardent pas à en sortir (Fig. 10 B).

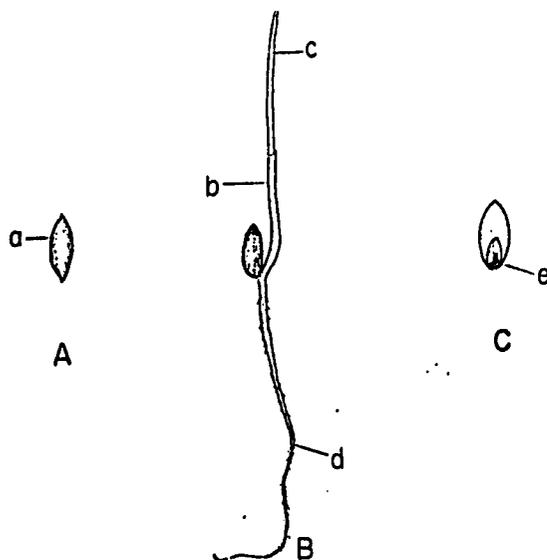


Fig. 10

Structure de la graine et de la plantule de chiendent pied de poule. A. graine, vue latérale — B. plantule — C. graine vue frontale, a) péricarpe, b) coléoptile, c) plumule, d) racine principale, e) germe (embryon).

Préparation et coloration des graines.

La plupart des graines de chiendent vendues dans le commerce sont décortiquées. On ne trouve que rarement des lots de graines non décortiquées. Peu importe que les graines de chiendent soient décortiquées ou non en ce qui concerne les techniques d'essai au tétrazolium. Les deux espèces de graines sont traitées de la même façon.

On prépare les graines de chiendent en les plaçant sur du papier filtre humide pendant 16 heures (toute une nuit) à une température de 30° à 35°. Après traitement on perce l'endosperme près de l'embryon avec une aiguille pointue ; les graines sont ensuite immédiatement placées dans une solution de tétrazolium à 0,5 - 1 %. La perforation des graines se fait très facilement lorsque celles-ci ont séjourné sur du papier filtre humide. Après perforation, les graines restent généralement sur l'aiguille. On peut alors les faire tomber dans la solution de tétrazolium avec le bout du doigt. La perforation des graines doit être faite sous un grossissement suffisant pour que l'embryon ne soit pas endommagé.

Une coloration satisfaisante se produit en 6 à 8 heures à 40°. A la température ambiante il faut 12 heures au moins. Lorsqu'on a obtenu une

coloration satisfaisante, on vide la solution de tétrazolium et on lave les graines plusieurs fois dans de l'eau. On enlève ensuite l'eau et on recouvre les graines avec une quantité suffisante de solution de lactophénol³, pour faciliter l'examen microscopique. Il faut laisser les graines au contact de cette solution pendant une à deux heures. Il est recommandé de laisser les graines dans la solution pendant l'interprétation.

Interprétation.

On ne peut interpréter d'une manière exacte l'essai qu'à condition de se servir d'un instrument à fort grossissement. Il est préférable d'employer un stéréoscope binoculaire, mais une loupe à main à grossissement de 7 à 10 suffira. Les embryons des graines viables apparaissent comme des taches rouge vif. On peut mieux voir la couleur rouge en regardant les graines sur un fond noir avec un éclairage oblique ou latéral.

Les graines non viables comprennent celles dont les embryons sont complètement incolores, celles dont la moitié supérieure ou inférieure de l'embryon n'est pas colorée, et celles qui ont un embryon coloré en rose très pâle.

La Planche 7 représente neuf réactions types de coloration. La signification de chaque réaction et sa classification sont données dans la légende.

L'exactitude de l'essai au tétrazolium est bonne. Les différences constatées entre les résultats d'essai au tétrazolium et les résultats des essais de germination sont généralement dans le sens d'une surestimation de la vitalité avec l'essai au tétrazolium. Dans de nombreux cas l'essai standard de germination est en défaut en raison d'un repos résiduel ou d'une sensibilité extrême de la graine au milieu de la germination.

3. Cf. Annexe pour la formule.

PLANCHE 7

Critères pour interpréter les résultats des essais au tétrazolium sur les graines de chendent pied de poule. Les zones noires indiquent les tissus colorés et vivants, les zones blanches représentent le tissu non coloré et mort.

N° 1	Viable : embryon complètement coloré.
N° 2	Viable : bords de la scutelle non colorés.
N° 3	Viable : les parties basilaires de la scutelle et la radicule ne sont pas colorées.
N° 4	Non viable : la moitié inférieure de l'embryon n'est pas colorée.
N° 5	Non viable : la moitié supérieure de l'embryon n'est pas colorée.
N° 6	Non viable : la radicule et la scutelle ne sont pas colorées.
N° 7	Non viable : l'axe embryonnaire n'est pas coloré.
N° 8	Non viable : l'embryon est coloré en rose pâle.
N° 9	Non viable : l'embryon est complètement incolore.

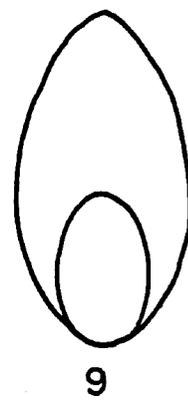
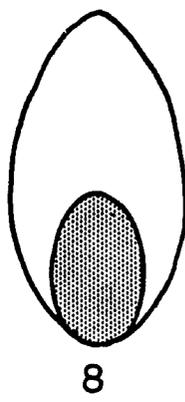
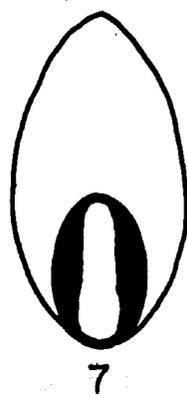
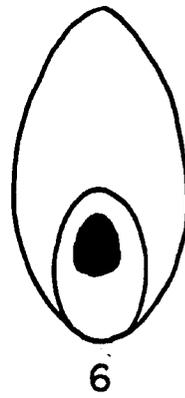
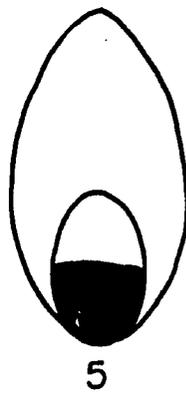
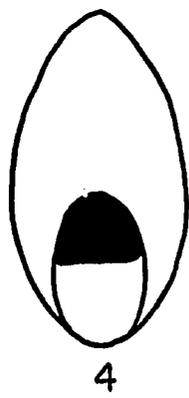
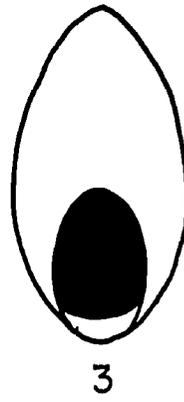
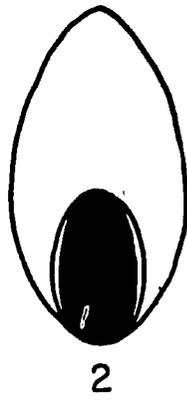
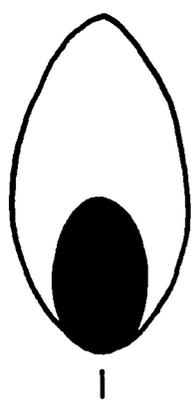


PLANCHE 7

Adaptation à des espèces similaires de graines.

Les méthodes indiquées ci-dessus peuvent être adaptées à d'autres types de semence, comme indiqué ci-dessous :

1. *Pâturin des prés* (*Poa pratensis*) : mêmes méthodes que pour le chiendent.

2. *Fléole* (*Pleum pratense*) : mêmes méthodes que pour le chiendent.

3. *Paspalum platycaule* (*Axonopus affinis*) : mêmes méthodes que pour le chiendent.

COTON (*Gossypium* spp)*Structure de la graine et de la plantule.*

Le revêtement de la graine de coton comprend deux couches intimement associées provenant des téguments extérieur et intérieur. Les cellules épidermiques du tégument extérieur se développent dans la fibre du coton. Ces fibres sont enlevées du tégument de la semence pendant l'égrenage. Les semences commerciales peuvent être entièrement couvertes de duvet (semences égrenées) ou partiellement couvertes de duvet (défibrage mécanique) ou complètement lisses et exemptes de fibres (défibrage à l'acide). (Fig. 11 A).

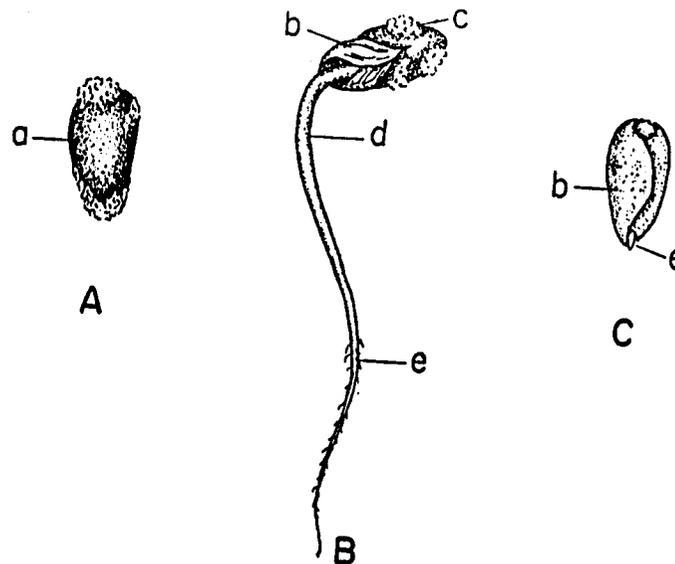


Fig. 11

Structure de la graine et de la plantule de coton — A. Graine — B. Plantule — C. Embryon, a) tégument, b) cotylédon, c) duvet, d) hypocotyle, e) racine principale (radicule).

L'intérieur de la graine est presque entièrement occupé par l'embryon. L'endosperme (et la nucelle) ne sont représentés que par une membrane, mince comme du papier, qui entoure l'embryon en y adhérant étroitement. Un embryon mûr comprend une courte racicule droite, deux gros cotylédons minces d'une forme compliquée et une plumule rudimentaire (Fig. 11 C).

Au moment de la germination, la racicule sort et pousse rapidement. Les racines latérales ne se développent qu'au bout de 7 à 12 jours. Les cotylédons sortent du tégument qui se déploie. La plumule commence alors à se transformer en feuilles et tige de la plante (Fig. 11 B).

Préparation et coloration des graines.

Comme le tétrazolium ne pénètre pas à travers le tégument des graines de coton, il faut l'enlever. L'enlèvement du tégument se fait très facilement après trempage des graines dans de l'eau chaude à 30° ou 35° pendant au moins 5 à 6 heures.

Un autre système consiste à placer les grains sur du papier humide pendant 16 heures (une nuit) à 30°. L'ongle du pouce est peut-être le meilleur instrument pour enlever le tégument de la graine. Après enlèvement du tégument, il faut placer de nouveau les graines dans de l'eau chaude pendant 30 minutes à une heure, pour ramollir encore la membrane mince qui adhère au cotylédon. (L'enlèvement de cette membrane est nécessaire aussi pour permettre l'absorption du tétrazolium par l'embryon.) Lorsque la membrane a été suffisamment ramollie, elle peut facilement être enlevée de la graine avec les doigts. Il faut veiller pendant l'enlèvement du tégument et de membrane à endommager le moins possibles les tissus de la graine.

Après enlèvement de la membrane, tremper immédiatement les graines dans une solution de tétrazolium à 0,5 - 1 %. A 40°, il faut 1 à 2 heures pour colorer les graines, tandis qu'à température ambiante il faut de 2 à 4 heures. Quelle que soit la température, les graines doivent rester dans la solution de tétrazolium jusqu'à ce qu'on en obtienne une coloration rouge satisfaisante mais pas trop intense. Lorsqu'on a obtenu une couleur satisfaisante, vider la solution de tétrazolium et laver plusieurs fois les graines dans de l'eau fraîche. Il faut laisser suffisamment d'eau après le dernier lavage pour recouvrir complètement les graines.

Lorsqu'on enlève les téguments, on constate que certaines graines sont manifestement pourries et mortes. Il n'est pas nécessaire de tremper ces graines dans la solution de tétrazolium. Il convient cependant de compter ces graines et de les faire figurer dans le calcul des résultats de l'essai.

Interprétation.

L'interprétation des résultats des essais au tétrazolium sur des graines de coton est difficile. Avec de l'expérience cependant, il est possible d'estimer la vitalité avec une exactitude raisonnable. Le débutant ne se

découragera pas trop vite s'il n'oublie pas que les essais de germination des graines de coton sont difficiles aussi et donnent des résultats variables. Les graines non viables comprennent les suivantes : 1) les graines sur lesquelles la partie non colorée de la radicule s'étend au-delà de sa pointe extrême, 2) les graines sur lesquelles plus d'un tiers du tissu des cotylédons n'est pas coloré, 3) les graines qui sont colorées en rouge anormalement sombre (rouge pourpre) et 4) les graines d'une teinte rouge-grisâtre ou rouge trouble. Ces deux dernières catégories de graines non viables sont caractérisées aussi par la mollesse du tissu et par l'absence de toute expansion des cotylédons. Les graines paraissent ainsi beaucoup plus petites que les graines viables dont les cotylédons se développent, exposant ainsi la radicule et augmentent la dimension de la graine.

La Planche 8 indique quinze réactions types de coloration. Les illustrations sont données deux par deux et représentent les deux côtés de la graine. La signification et la classification de chaque réaction sont indiquées dans la légende.

L'exactitude de l'essai augmente avec l'expérience. Le débutant doit faire un grand nombre d'essais comparatifs de germination et d'essais au tétrazolium jusqu'à ce qu'il ait acquis suffisamment de confiance en lui-même et dans l'essai. Les différences les plus fréquentes se produisent lorsque l'on soumet à l'expérience des graines non traitées. Les résultats de l'essai au tétrazolium des graines non traitées peuvent être très supérieurs aux résultats des essais correspondants de germination. Si les graines doi-

PLANCHE 8

Critères pour interpréter les résultats d'essai au tétrazolium sur des graines de coton. Les illustrations sont groupées deux par deux et représentent les deux côtés de la graine. Les zones noires indiquent le tissu coloré et vivant tandis que les zones blanches représentent le tissu non coloré et mort.

- | | |
|------------|--|
| N° 1 | Viable : graine complètement colorée, la coloration n'est pas trop intense. |
| N°s 2 — 5 | Viables : quelques petites zones non colorées sur les cotylédons. |
| N° 6 | Viable : moins du tiers des cotylédons n'est pas coloré. |
| N° 7 | Viable : l'extrémité de la radicule n'est pas colorée ; petites taches non colorées sur les cotylédons. |
| N° 8 | Non viable : plus du tiers des cotylédons n'est pas coloré ; l'extrémité de la radicule n'est pas colorée. |
| N°s 9 — 10 | Non viables : la partie non colorée de la radicule s'étend au-delà de sa partie extrême. |
| N° 11 | Non viable : les zones non colorées des cotylédons se prolongent dans la région où la radicule et les cotylédons sont fixés. |
| N° 12 | Non viable : plus du tiers du tissu des cotylédons n'est pas coloré. |
| N° 13 | Non viable : les graines sont colorées en rouge gris ou en rouge sombre ou laiteux — les cotylédons ne sont pas développés ; la graine est relativement plus petite que les graines viables. |
| N° 14 | Non viable : la coloration est anormalement sombre et de couleur rouge pourpre ; les cotylédons ne sont pas développés et la graine est relativement plus petite qu'une graine viable. |
| N° 15 | Non viable : la graine est entièrement incolore. |

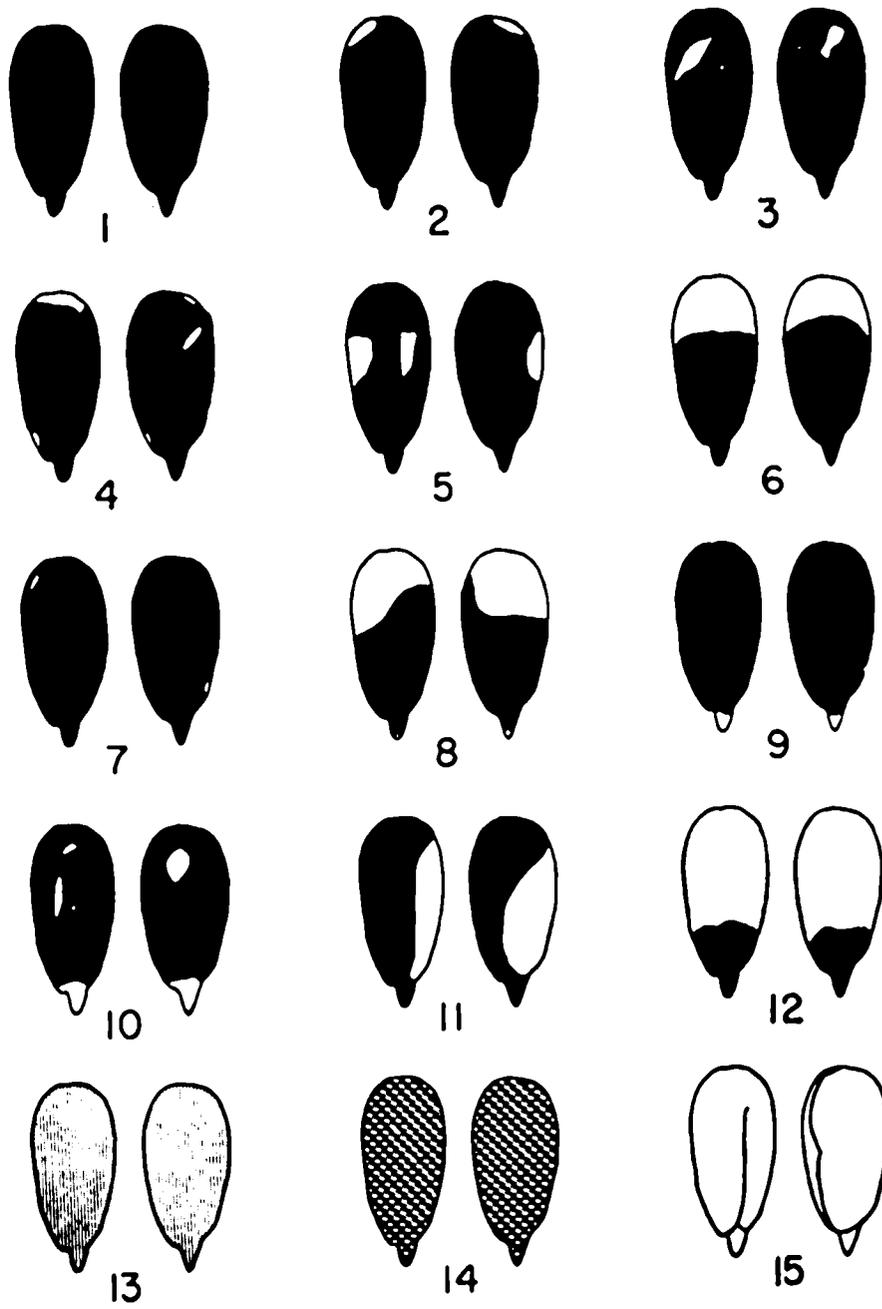


PLANCHE 8

vent être finalement traitées, bien souvent les résultats de l'essai au tétrazolum donnent une meilleure indication de la faculté germinative que les essais habituels de germination.

Adaptation à des espèces similaires de graines.

Les techniques décrites ci-dessus pour les graines de coton sont applicables à d'autres espèces de graines, à condition d'y apporter les modifications suivantes :

Dah (*Hibiscus cannabinus*) : placer les graines directement dans une solution à 1 % de tétrazolum à 40°. Après 4 à 6 heures, vider le tétrazolum et le remplacer par de l'eau. Enlever les téguments des graines et placer de nouveau les semences légèrement colorées dans du tétrazolum pendant 1 à 2 heures encore. L'interprétation est analogue à celle des graines de coton.

SOJA (*Glycine max*)

Structure de la graine et de la plantule.

La graine de soja a généralement une forme sphérique avec un tégument relativement mince. Le hile, point d'attache de la graine dans la gousse, a une forme linéaire ou elliptique et est situé sur la face ventrale du tégument. Il peut être pigmenté de façon variée (Fig. 12 A).

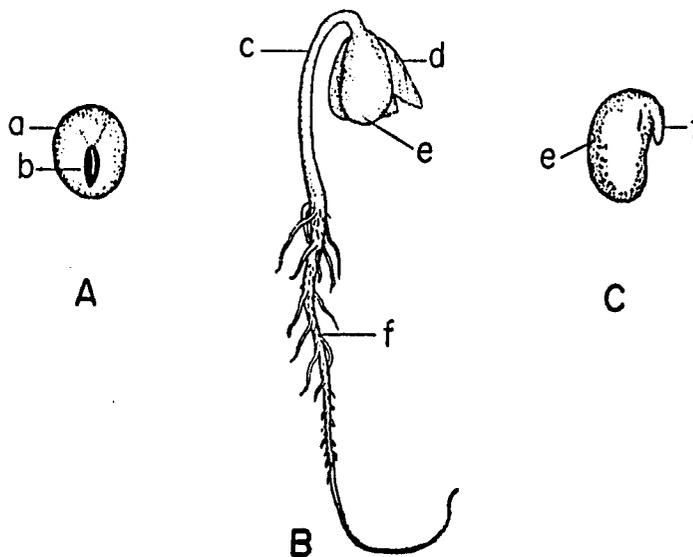


Fig. 12

Structure de la graine et de la plantule de soja. A. graine — B. plantule — C. embryon, a) tégument, b) hile, c) hypocotyle, d) plumule, e) cotylédon, f) racine principale (radicule).

L'endosperme n'est représenté que par une mince couche de cellules. Le reste de l'intérieur de la graine est occupé par l'embryon. L'embryon consiste en deux cotylédons épais et charnus, à court axe hypocotylé radiculé et une plumule bien développée (deux feuilles sont généralement visibles). L'extrémité de la plumule est fixée sur l'axe de la radicule hypocotyle et elle est située entre les cotylédons (Fig. 12 C).

Au moment de la germination, la radicule perce le tégument et pousse rapidement. Les cotylédons et la plumule sont poussés au-dessus de la surface du sol (développement épigé) par élongation de l'hypocotyle. Les cotylédons se développent, puis se plissent lorsque la plumule commence à se développer (Fig. 12 B).

Préparation et coloration des graines.

Bien que le tétrazolium pénètre facilement dans les téguments de la plupart des variétés de soja, les graines doivent cependant être préparées avant d'être placées dans la solution de tétrazolium. La préparation est nécessaire pour deux raisons : 1) un grand nombre de graines placées directement dans une solution de tétrazolium (ou dans l'eau) absorbent l'eau si rapidement que le tégument éclate et que les cotylédons se séparent, et 2) la préparation améliore la qualité et la clarté de la coloration, facilitant ainsi l'interprétation. Les graines doivent être préparées pendant 6 heures au moins sur du papier humide. Cependant, une préparation pendant 16 heures (toute une nuit) est préférable.

Après préparation, on place les graines directement dans une solution de tétrazolium à 1 %. Il faut utiliser suffisamment de solution pour permettre une plus ample absorption et un gonflement de la graine. A 40° on obtient une coloration suffisante en 2 à 4 heures, suivant la variété. On peut employer des températures plus basses (température ambiante) mais il faut alors 5 à 7 heures pour obtenir une coloration. Quelle que soit la température, les graines doivent rester dans la solution de tétrazolium jusqu'à obtention d'une coloration rouge vif, mais pas trop intense. Lorsqu'on a obtenu l'intensité désirée de coloration, on vide la solution de tétrazolium puis on lave les graines plusieurs fois dans de l'eau, en laissant suffisamment d'eau après le dernier lavage pour recouvrir complètement les graines.

Certaines variétés, en particulier celles ayant des téguments de couleur sombre, se colorent plus uniformément et d'une manière plus satisfaisante si on enlève les téguments après la préparation et avant coloration. Le tétrazolium ne traverse pas le tégument des variétés à grains bruns ou noirs aussi facilement que dans les variétés à tégument de couleur claire.

Interprétation.

A la fin de la période de coloration on constatera que quelques-unes des graines sont fortement endommagées ou cassées. Ces graines ne sont généralement pas viables. Les téguments des autres graines restent intacts

ou laissent apparaître une légère rupture ou des fentes peu importantes. Ces graines peuvent être viables ou non viables. Les téguments doivent être enlevés pour permettre l'examen des réactions de coloration. Généralement le tégument peut facilement être enlevé en pressant fermement les graines à l'une de leurs extrémités entre le pouce et l'index.

Les graines non viables comprennent les suivantes : 1) les graines avec une zone non colorée à la jonction de l'axe radicule-hypocotyle et des cotylédons, 2) les graines sur lesquelles la partie non colorée de la radicule s'étend au-delà de sa pointe extrême, 3) les graines avec plus de la moitié de la surface du cotylédon non colorée (du haut vers le bas), 4) les graines de coloration anormalement sombre ou rouge pourpre (la coloration pénètre généralement complètement à travers les cotylédons épais, 5) les graines avec une coloration indistincte ou laiteuse⁴ et 6) les graines uniformément colorées mais avec des craquelures minces ou ténues dans la radicule ou à

4. Cette situation est probablement due à un manque de coloration des couches extérieures des cellules des cotylédons, ainsi qu'à une coloration intense de l'intérieur des cotylédons. Ainsi, l'intérieur fortement coloré vu à travers une couche translucide et non colorée a un aspect rouge laiteux.

PLANCHE 9

Critères pour l'interprétation des résultats des essais au tétrazolium sur les graines de soja. Les illustrations sont groupées deux par deux et représentent les deux côtés de la graine. Les zones noires indiquent le tissu coloré vivant tandis que les zones blanches représentent le tissu non coloré et mort.

- | | |
|----------|---|
| N° 1 | Viable : graine complètement colorée ; la coloration n'est pas trop intense. |
| N° 2 — 5 | Viables : quelques petites zones non colorées sur les cotylédons. |
| N° 6 | Viable : la pointe extrême de la radicule n'est pas colorée ; les cotylédons présentent quelques zones non colorées. |
| N° 7 | Non viable : la partie non colorée de la radicule s'étend au-delà de la pointe extrême. |
| N° 8 | Non viable : la jonction de l'axe radicule-hypocotyle et des cotylédons n'est pas colorée. |
| N° 9 | Non viable : zones non colorées dans la région où la plumule est située. |
| N° 10 | Non viable : séries de zones non colorées sur la partie supérieure de l'axe radicule-hypocotyle. |
| N° 11 | Non viable : plus de la moitié de l'extrémité supérieure des cotylédons n'est pas colorée. |
| N° 12 | Non viable : l'extrémité basilaire des cotylédons et l'axe radicule hypocotyle sont d'un rouge laiteux, la coloration s'étend sur toute la section transversale des cotylédons. |
| N° 13 | Non viable : comme pour 12, sauf que la zone rouge laiteux est plus développée. |
| N° 14 | Non viable : les graines sont colorées en rouge pourpre ; la coloration s'étend sur toute la section transversale des cotylédons. |
| N° 15 | Non viable : les graines sont complètement incolores. |

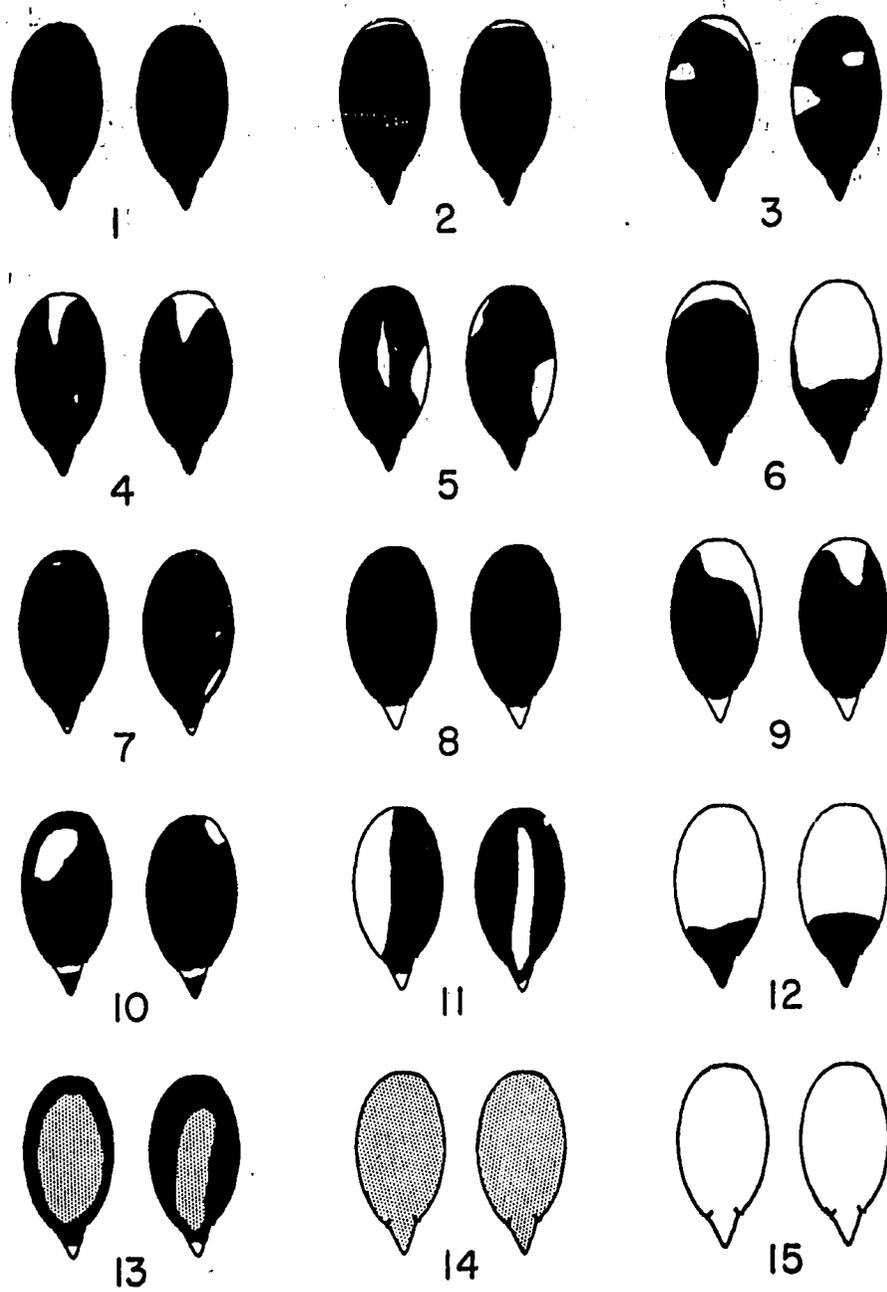


PLANCHE 9

la jonction de l'axe radicule-hypocotyle et des cotylédons (les faces des craquelures sont généralement blanchâtres).

L'intensité de la coloration varie considérablement même sur la même graine. Ceci à peu d'importance sauf dans le cas indiqué ci-dessus. Cependant, le tissu mort ne doit pas être confondu avec le tissu légèrement coloré. Le tissu mort est généralement caractérisé par une couleur blanche cadavérique et par une texture molle. S'il y a le moindre doute en ce qui concerne la classification proprement dite du tissu, il convient de remettre la graine dans la solution de tétrazolium pendant 30 minutes - 1 heure.

Lorsque les graines sont colorées directement à travers le tégument, les faces en contact des cotylédons des graines à forte vitalité ne se colorent généralement pas, probablement par suite de l'absence de contact entre ce tissu et le tétrazolium. Une coupe transversale des cotylédons des graines vigoureuses révèle aussi que la coloration par le tétrazolium est assez superficielle c'est-à-dire qu'elle ne s'étend pas profondément dans le tissu du cotylédon. D'autre part, les cotylédons des graines détériorées et les deux faces opposées du cotylédon sont fortement colorées. Apparemment, le tissu sain et vigoureux empêche la pénétration du tétrazolium tandis que le tissu détérioré est plus perméable.

La Planche 9 représente quinze réactions types de coloration. Les illustrations sont groupées deux par deux et représentent les deux côtés de la graine. La signification et la classification de chaque réaction sont indiquées dans la légende.

L'exactitude de l'essai est bonne. Le débutant aura intérêt à faire des essais comparatifs de germination et des essais au tétrazolium jusqu'à ce qu'il se soit familiarisé avec les différentes teintes et intensités de couleur obtenus lors de l'essai au tétrazolium.

Adaptation à des variétés similaires de graines.

La méthode qui vient d'être décrite pour le soja peut être adaptée à d'autres types de graines en y apportant les modifications indiquées ci-dessous :

1. *Vigna sinensis* : préparer les semences pendant 16 heures sur du papier humide, puis les placer directement dans une solution de tétrazolium à 1 % pendant 2 à 3 heures à 40°, ou 4 à 6 heures à température ambiante. Enlever les téguments et interpréter comme pour le soja. (*Attention* : la zone cotylédonnaire située directement au-dessous de la radicule est généralement non colorée ou seulement légèrement colorée ; ce tissu ne doit pas être classé comme mort, à moins qu'il ne soit manifestement pourri.)

2. *Haricots* (*Phaseolus* spp.) : Préparer les graines pendant 16 heures sur du papier humide. Placer directement dans une solution de tétrazolium à 1 % pendant 2 à 3 heures à 40° ou 6 à 8 heures à température ambiante. Enlever les téguments et interpréter comme pour le soja. Tous les haricots qui sont trop légèrement colorés pour qu'on puisse faire une interprétation doivent être remis dans du tétrazolium pendant 30 minutes à 1 heure.

VESCE VELUE (*Vicia villosa*)*Structure de la graine et de la plantule.*

Les graines de vesce velue ont une forme sphérique et une couleur généralement noire. Le tégument est relativement épais et le hile est ovale ou elliptique, mais il n'est généralement pas coloré d'une façon distincte (Fig. 13 A).

L'embryon comprend deux cotylédons épais et charnus, une courte racicule en forme de coin et une plumule rudimentaire (ou épicotyle) (Fig. 13 C).

Lors de la germination, la racicule perce le tégument, les cotylédons restent sous le sol (développement hypogée) tandis que l'épicotyle s'allonge et pousse la plumule au-dessus de la surface du sol (Fig. 13 B).

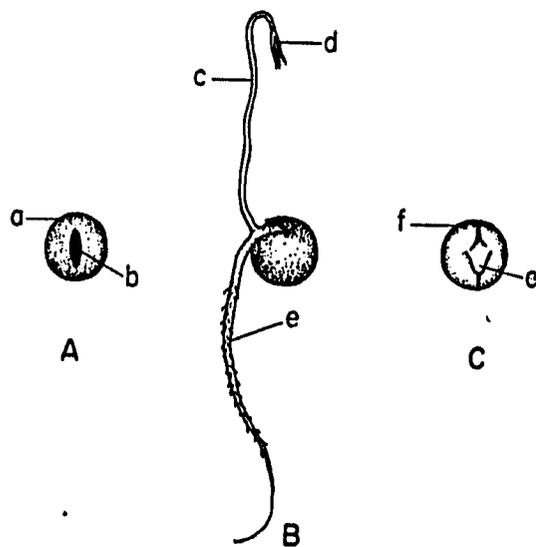


Fig. 13

Structure de la graine et de la plantule de la Vesce velue. A. graine — B. plantule, — C. embryon, a) tégument, b) hile, c) épicotyle, d) bourgeon terminal, e) racine principale (radicule) f) cotylédon.

Préparation et coloration des graines.

Les graines de vesce velue peuvent être colorée directement à travers le tégument. Cependant, l'uniformité de coloration se trouve grandement améliorée si l'on trempe tout d'abord les graines dans de l'eau à 25° pendant 3 à 4 heures. Après trempage, placer les graines dans une solution de tétrazolium à 1 %.

La coloration nécessite 2 à 3 heures à 40° ou 5 à 7 heures à température ambiante. A la fin de la période de coloration, on vide la solution de tétrazolium et on lave les graines plusieurs fois dans de l'eau. Il faut laisser suffisamment d'eau après le lavage final pour complètement recouvrir les graines.

Les graines dures de vesce velues présentent parfois des difficultés. Il y a deux manières de résoudre ce problème : 1) une graine qui n'a pas absorbé d'eau à la fin de la période initiale de trempage peut être légèrement frottée avec de la toile émeri ou être perforée avec une aiguille et remise dans la solution de tétrazolium ; 2) les graines dures peuvent être comptées et considérées comme telles, de même que dans l'essai normal de germination. La première méthode est à préférer.

Interprétation.

Les téguments doivent être enlevés pour interpréter les résultats de l'essai. Il est facile de les enlever en brisant le tégument avec une pince à extrémités pointues puis en poussant doucement et régulièrement jusqu'à ce que l'embryon sorte. Il arrive que les cotylédons se séparent pendant l'enlèvement du tégument. Ceci n'a pas d'importance si les deux moitiés restent ensemble car les semences sont déjà colorées et l'interprétation est encore possible.

Comme les téguments des diverses graines ont une perméabilité différente, la coloration est rarement d'une intensité uniforme. L'intensité de la coloration présente peu d'importance tant qu'il n'y a pas risque de confondre le tissu *légèrement* coloré avec le tissu mort non coloré. Les graines douteuses doivent être remises dans la solution de tétrazolium pendant encore une heure.

PLANCHE 10

Critères pour interpréter les essais au tétrazolium sur des graines de vesce velue. Les illustrations sont groupées deux par deux et représentent les deux côtés de la graine. Les zones noires indiquent le tissu coloré et vivant tandis que les zones blanches indiquent le tissu non coloré et mort.

- | | |
|-----------|---|
| N° 1 | Viable : graine complètement colorée. |
| N°s 2 — 5 | Viables : zones non colorées, non critiques sur les cotylédons. |
| N° 6 | Viable : pointe extrême de la radicule non colorée. |
| N° 7 | Viable : pointe extrême de la radicule non colorée, la moitié d'un cotylédon n'est pas colorée. |
| N° 8 | Non viable : la partie non colorée de la radicule s'étend au-delà de la pointe extrême. |
| N° 9 | Non viable : zone non colorée sur la partie supérieure de la radicule. |
| N° 10 | Non viable : le point de jonction de la radicule et des cotylédons n'est pas coloré. |
| N° 11 | Non viable : plus de la moitié du tissu cotylédonnaire n'est pas coloré. |
| N° 12 | Non viable : vastes zones marbrées de tissu non coloré. |
| N° 13 | Non viable : seule la partie centrale du cotylédon est colorée. |
| N° 14 | Non viable : seule la partie centrale du cotylédon est colorée. |
| N° 15 | Non viable : la graine est complètement incolore. |

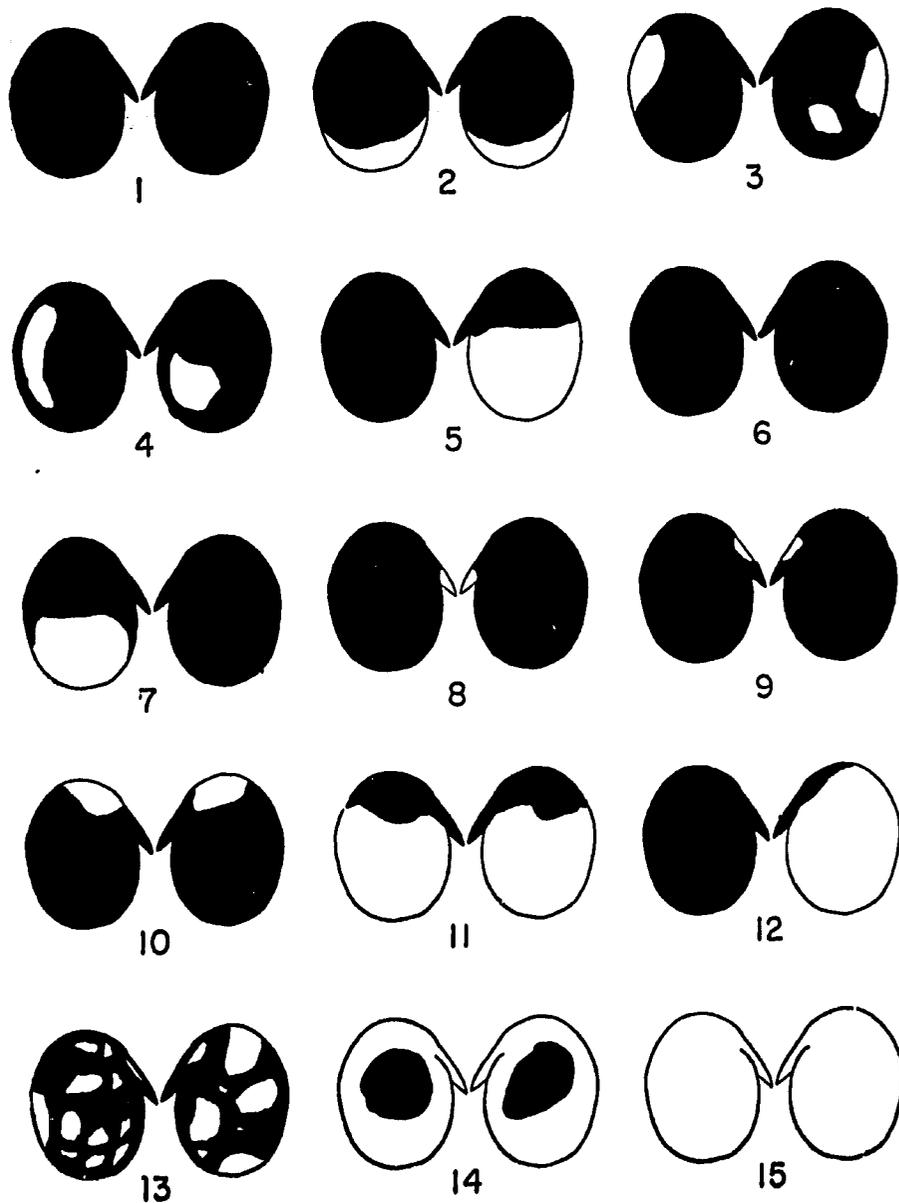


PLANCHE 10

Les graines non viables comprennent les suivantes : 1) les graines sur lesquelles la partie non colorée de la radicule s'étend au-delà de sa pointe extrême ; 2) les graines avec plus de la moitié du tissu cotylédonaire non coloré et 3) les graines qui ont une zone non colorée au point de jonction des cotylédons et de la radicule.

L'interprétation est assez facile. La plupart des graines non viables sont complètement incolores et ont un tissu mou, d'une couleur allant du blanc au jaune vert. On rencontre souvent des semences endommagées par les charançons. Si les dégâts sont légers, et n'atteignent pas la plumule, les graines peuvent être classées comme viables.

La Planche 10 représente 10 réactions types de coloration. Les illustrations sont groupées deux par deux et elles représentent les deux côtés de la graine. La signification et la classification de chaque structure sont indiquées dans la légende.

Adaptation à des espèces similaires de graines.

Les méthodes décrites ci-dessus pour la vesce velue peuvent être adaptées à d'autres types de graines à condition d'y apporter les modifications suivantes :

1. *Pois d'hiver à fleur blanche* (*Lathyrus hirsutus*) : même méthodes que pour la vesce velue. Avec les graines dures très difficiles à traiter on peut procéder comme pour la vesce velue.

2. *Vesce commune* (*Vicia sativa*) : mêmes méthodes que pour la vesce velue.

3. *Pois fourragés d'Autriche* (*Pisum sativum* var. *arvense*) : même méthodes que pour la vesce velue.

4. *Petits pois* (*Pisum sativum*) : tremper les graines pendant 4 à 6 heures dans de l'eau comme pour la vesce velue. Les cotylédons de nombreuses variétés de pois cultivés étant naturellement d'une couleur verdâtre, une coloration rouge verdâtre est typique.

TREFLE INCARNAT (*Trifolium incarnatum*)

Structure de la graine et de la plantule.

Les graines de trèfle incarnat ont une forme légèrement ovoïde et sont d'une couleur allant du jaune-marron au jaune clair. Le tégument n'est interrompu que par le hile qui est relativement peu apparent (Fig. 14 A).

L'embryon remplit la totalité de l'intérieur de la semence. Il comprend deux cotylédons charnus attachés par des pétioles minuscules sur l'axe radicule-hypocotyle qui est courbe. La plumule est rudimentaire (Fig. 14 C).

Lors de la germination, la radicule fait éclater le tégument. Les cotylédons sont poussés au-dessus de la surface du sol par l'hypocotyle allongé. Au-dessus du sol, les cotylédons se développent et augmentent de dimension (Fig. 14 B).

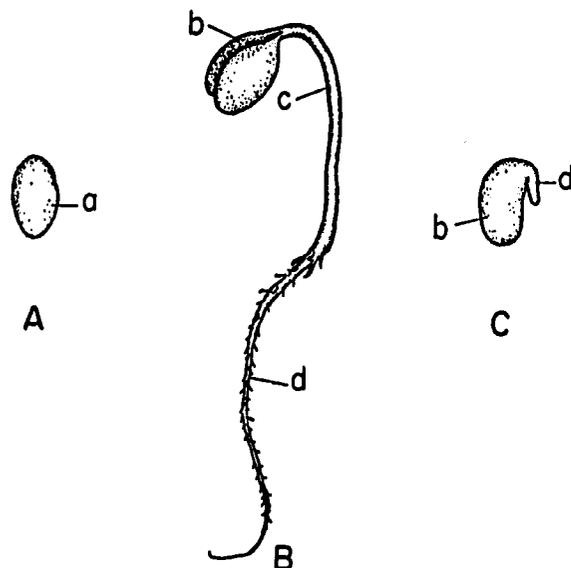


Fig. 14

Structure de la graine et de la plantule du trèfle incarnat. A. graine — B. plantule — C. embryon, a) tégument, b) cotylédon, c) hypocotyle, d) racine principale (radicule).

Préparation et coloration de la semence.

La préparation du trèfle incarnat n'est pas nécessaire. Les graines peuvent être placées directement dans une solution de tétrazolium à 0,5 - 1 %. Il faut de 2 à 4 heures pour colorer à 40°, tandis qu'à température ambiante il faut de 4 à 6 heures. Un autre système qui améliore l'uniformité de la coloration consiste à tremper les graines dans de l'eau pendant 2 heures avant de les placer dans la solution de tétrazolium.

Lorsqu'on a obtenu une coloration satisfaisante, on vide la solution et on lave les graines plusieurs fois dans de l'eau froide. Après le dernier lavage, il faut garder suffisamment d'eau dans le plat pour recouvrir complètement les graines. Les graines dures sont souvent difficiles à traiter. On peut les compter comme graines dures — comme dans les essais normaux de germination ou bien les scarifier légèrement en les frottant avec de la toile émeri et en les remettant dans la solution de tétrazolium.

Interprétation.

Il ne faut tenter l'interprétation qu'au moyen d'une loupe. Les graines très détériorées présentent de graves ruptures du tégument et des craquelures, des fentes ou du tissu pourri, visibles dans les fentes. Les graines de ce type ne sont manifestement pas viables et peuvent être enlevées immé-

diatement du plat et être placées dans la catégorie non viables. Les téguments des autres graines doivent cependant être enlevés. Cette opération peut se faire en brisant le tégument avec une pince pointue et en exerçant une légère pression jusqu'à ce que l'embryon sorte.

Après enlèvement des téguments, on examine soigneusement les graines des deux côtés. Les graines non viables comprennent les suivantes : 1) les graines qui ont plus de la pointe extrême de la radicule non colorée, 2) les graines avec des zones non colorées à la jonction des cotylédons et de l'axe radicule-hypocotyle, 3) les graines sur lesquelles plus de la moitié du tissu cotylédonaire n'est pas coloré, 4) les graines ayant une coloration anormale, rouge-grise ou rouge-orange, et 5) les graines ayant des taches vitreuses ou des zones transparentes et rouges ou roses dans l'axe radicule-hypocotyle. (Ces graines donnent des plantules anormales ayant des hypocotyles et des racines aqueuses.)

L'intensité de la coloration est rarement uniforme lorsque les graines sont colorées à travers le tégument. D'une manière générale, l'extrémité supérieure des cotylédons vers le côté dorsal et la pointe de la radicule présente une coloration rouge intense. La partie basilaire des cotylédons et la partie supérieure vers le côté ventral sont souvent légèrement colorés. Il s'agit d'une réaction normale qui ne doit causer aucune inquiétude. Le tissu vivant légèrement coloré peut se distinguer du tissu mort incolore par un léger voile rose et une apparence de croisillon (sous la loupe) sur

PLANCHE 11

Critères pour interpréter les résultats des essais au tétrazolium sur des graines de trèfle incarnat. Les illustrations sont groupées deux par deux et représentent les deux côtés de la graine. Les zones noires indiquent le tissu coloré et vivant ; les zones blanches représentent le tissu non coloré et mort.

- | | |
|----------|---|
| N° 1 | Viable : graine complètement colorée. |
| N° 2 — 4 | Viables : quelques petites zones non colorées sur les cotylédons. |
| N° 5 | Viable : petites zones non colorées sur la partie supérieure de l'axe radicule-hypocotyle. |
| N° 6 | Viable : l'extrémité de la radicule n'est pas colorée ; quelques petites zones non colorées sur les cotylédons. |
| N° 7 | Non viable : la partie non colorée de la radicule s'étend au-delà de sa pointe extrême. |
| N° 8 | Non viable : zone non colorée à la jonction des cotylédons et de l'axe radicule-hypocotyle. |
| N° 9 | Non viable : zone non colorée près du point d'attache des cotylédons et de l'axe radicule hypocotyle au-dessus de l'endroit où se développe la plumule. |
| N° 10 | Non viable : l'axe radicule hypocotyle est traversé par une zone non colorée. |
| N° 11 | Non viable : zones non colorées sur l'axe radicule hypocotyle et au point d'attache des cotylédons à l'axe. |
| N° 12 | Non viable : plus de la moitié du tissu cotylédonaire n'est pas colorée. |
| N° 13 | Non viable : l'axe radicule-hypocotyle n'est pas coloré. |
| N° 14 | Non viable : graine de coloration anormale, rouge grise, rouge orange ou vitreuse ou encore rouge transparente. |
| N° 15 | Non viable : graine complètement incolore. |

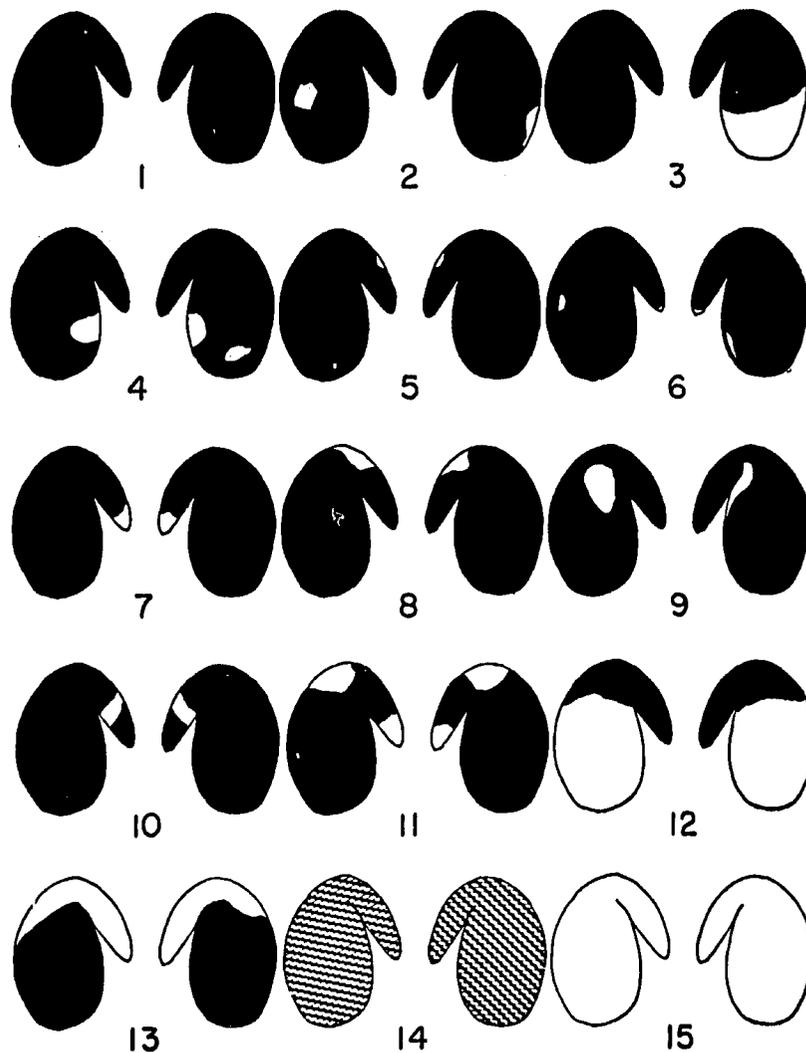


PLANCHE 11

ce dernier. Le tissu mort est généralement très blanc (ou vert) mou et lisse d'aspect.

L'exactitude de l'essai est bonne à condition que les couleurs anormales soient reconnues comme telles et soient correctement interprétées.

La Planche 11 représente 15 réactions types de coloration. Les illustrations sont groupées deux par deux et représentent les deux côtés de la graine. La signification et la classification de chaque structure est indiquée dans la légende.

Adaptation à des espèces similaires de graines :

Les procédures et méthodes décrites ci-dessus pour le trèfle incarnat sont facilement adaptables à d'autres espèces similaires de graines, avec les modifications indiquées. L'interprétation est analogue à celle qui a été décrite pour le trèfle incarnat.

1. *Trèfle blanc* (*trifolium repens*) : tremper dans l'eau pendant 2 à 3 heures et placer dans une solution de tétrazolium à 1 % pendant 4 à 6 heures à 40° ou 8 à 10 heures à température ambiante. Les graines dures sont une source de grandes difficultés. Après trempage initial, toutes les graines encore dures peuvent être scarifiées et replacées dans la solution de tétrazolium, ou bien peuvent être traitées comme les autres graines et être comptées comme dures à la fin de l'essai.

2. *Trèfle violet* (*trifolium pratense*) : tremper les graines pendant 2 heures dans de l'eau, puis les placer dans une solution de tétrazolium à 1 % pendant 4 à 6 heures à 40° ou pendant 6 à 10 heures à température ambiante. Traiter les graines dures comme celles de trèfle blanc.

4. *Mélilot* (*Melilotus spp*) : tremper les graines pendant 2 heures dans de l'eau puis les passer dans une solution de tétrazolium à 1 % pendant 3 à 4 heures à 40° ou pendant 7 à 8 heures à température ambiante. Traiter les graines dures comme celles de trèfle blanc.

4. *Mélilot* (*Melilotus spp*) : tremper les graines pendant 2 heures dans de l'eau puis les passer dans une solution de tétrazolium à 1 % pendant 4 à 5 heures à 40° ou 8 à 10 heures à température ambiante. Traiter les graines dures comme celles de trèfle blanc.

5. *Lespedeza* (*Lespedeza spp*) : enlever les téguments puis frotter les semences sur de la toile émeri fine avec le doigt. Tremper dans l'eau pendant 2 heures puis scarifier de nouveau les graines qui restent encore dures. Placer dans une solution de tétrazolium à 1 % pendant 3 à 5 heures à 40° ou 8 heures à température ambiante.

PASTEQUE (*Citrullus vulgaris*)*Structure de la graine et de la plantule.*

Les graines de pastèques sont aplaties et de forme ovale avec un tégument bien développé (Fig. 15 A).

L'embryon remplit la totalité de l'intérieur de la graine et il est recouvert par une membrane mince comme du papier (endosperme) qui adhère étroitement à l'embryon.

Les cotylédons sont plats et souvent veinés. L'axe racicule-hypocotyle est court et de forme triangulaire, partiellement entouré par les bords basilaires des cotylédons. La plumule est rudimentaire (Fig. 15 C).

Lors de la germination, la radicule fait éclater le tégument et l'hypocotyle sort en ayant une forme d'arc avec une partie en saillie (crosse) sur son côté inférieur qui retient un côté du tégument, tandis que l'allongement de l'hypocotyle arqué sépare l'autre moitié de celui-ci (Fig. 15 B).

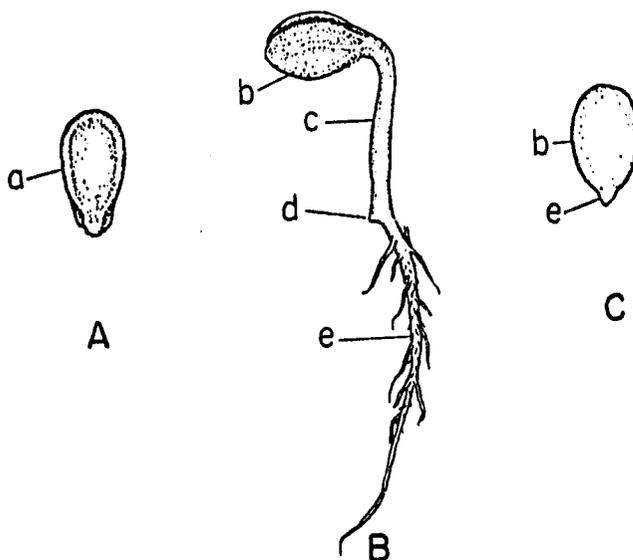


Fig. 15

Structure de la graine et de la plantule de pastèque. A. graine — B. plantule — C. embryon, a) tégument, b) cotylédon, c) hypocotyle, d) nœud, e) racine principale (radicule).

Préparation et coloration des graines :

Le tégument et la membrane mince comme du papier doivent être enlevés avant la coloration. Les graines doivent être trempées dans de l'eau tiède (30° à 35°) pendant 1 heure. Ce trempage est suffisant pour ramollir les téguments sans faire gonfler d'une manière sensible l'embryon. Si on laisse tremper trop longtemps les graines, l'embryon se gonfle et appuie fortement contre le tégument, ce qui rend difficile l'enlèvement de ce dernier sans endommager l'embryon. Le tégument peut être enlevé en coupant à travers le bord supérieur de la graine et en fendant le tégument avec des pinces ou l'ongle du doigt. Après enlèvement des téguments, faire tremper de nouveau les graines dans de l'eau chaude pendant 1 ou 2 heures, ou jusqu'à ce que la membrane mince comme du papier qui entoure la graine soit enlevée. Si cette membrane n'est pas enlevée, les graines ne se colorent pas bien.

Après enlèvement de la membrane, les graines sont placées immédiatement dans une solution de tétrazolium à 1 %. On obtient une coloration satisfaisante en 1 ou 2 heures à 40° ou 2 à 5 heures à la température ambiante. Lorsque la coloration a atteint une intensité rouge vif, on vide la

solution et on lave plusieurs fois les graines dans de l'eau en laissant suffisamment d'eau après le dernier lavage pour recouvrir complètement les graines.

Interprétation.

L'interprétation est relativement aisée. Les graines non viables comprennent les suivantes : 1) graines avec plus de la moitié du tissu cotylédonaire non coloré, 2) graines sur lesquelles la partie de la radicule non colorée s'étend au-delà de sa pointe extrême, et 3) les graines avec des taches rouge-nébuleux ou rouge-laiteux sur la radicule ou recouvrant complètement les cotylédons. Des zones non colorées moins importantes sur le cotylédon n'affectent pas la vitalité de la graine.

La Planche 12 représente quinze réactions types de coloration. Les illustrations sont placées par paires et représentent les deux côtés de la graine. La signification et la classification de chaque réaction de coloration sont indiquées dans la légende.

L'exactitude de l'essai est bonne. La plus grande difficulté réside dans l'enlèvement des téguments de la graine et de la membrane intérieure et dans l'interprétation correcte des couleurs anormales.

Adaptation aux espèces similaires de graines.

On peut essayer les autres espèces de cucurbitacées en suivant les méthodes indiquées ci-dessus. L'extrême difficulté rencontrée pour enlever le tégument de la semence et la membrane inférieure de quelques-unes des

PLANCHE 12

Critères pour interpréter les résultats des essais au tétrazolium sur des graines de pastèque. Les illustrations sont groupées deux par deux et représentent les deux côtés de la graine. Les zones noires indiquent le tissu coloré et vivant ; les zones blanches représentent le tissu non coloré et mort.

- | | |
|-----------|---|
| N° 1 | Viable : graine complètement colorée. |
| N°s 2 — 6 | Viables : des parties peu importantes des cotylédons ne sont pas colorées. |
| N° 7 | Viable : l'extrémité de la radicule n'est pas colorée. |
| N°s 8 — 9 | Non viables : la partie non colorée de la radicule s'étend au-delà de sa pointe extrême, petites zones non colorées sur les cotylédons. |
| N° 10 | Non viable : bande de tissu non coloré traversant l'axe radicule-hypocotyle ; petites zones non colorées sur le côté des cotylédons. |
| N° 11 | Non viable : bande non colorée s'étendant sur l'axe radicule-hypocotyle d'un côté et zone non colorée sur la radicule de l'autre côté. |
| N° 12 | Non viable : plus de la moitié du tissu cotylédonaire n'est pas colorée. |
| N° 13 | Non viable : taches nébuleuses ou rouge laiteux dans la partie centrale du cotylédon s'étendant dans la zone d'attache de l'axe radicule-hypocotyle et des cotylédons ; la partie de la radicule non colorée dépasse l'extrémité. |
| N° 14 | Non viable : toute la graine a une couleur rouge nébuleuse ou rouge laiteuse. |
| N° 15 | Non viable : la semence est complètement incolore. |

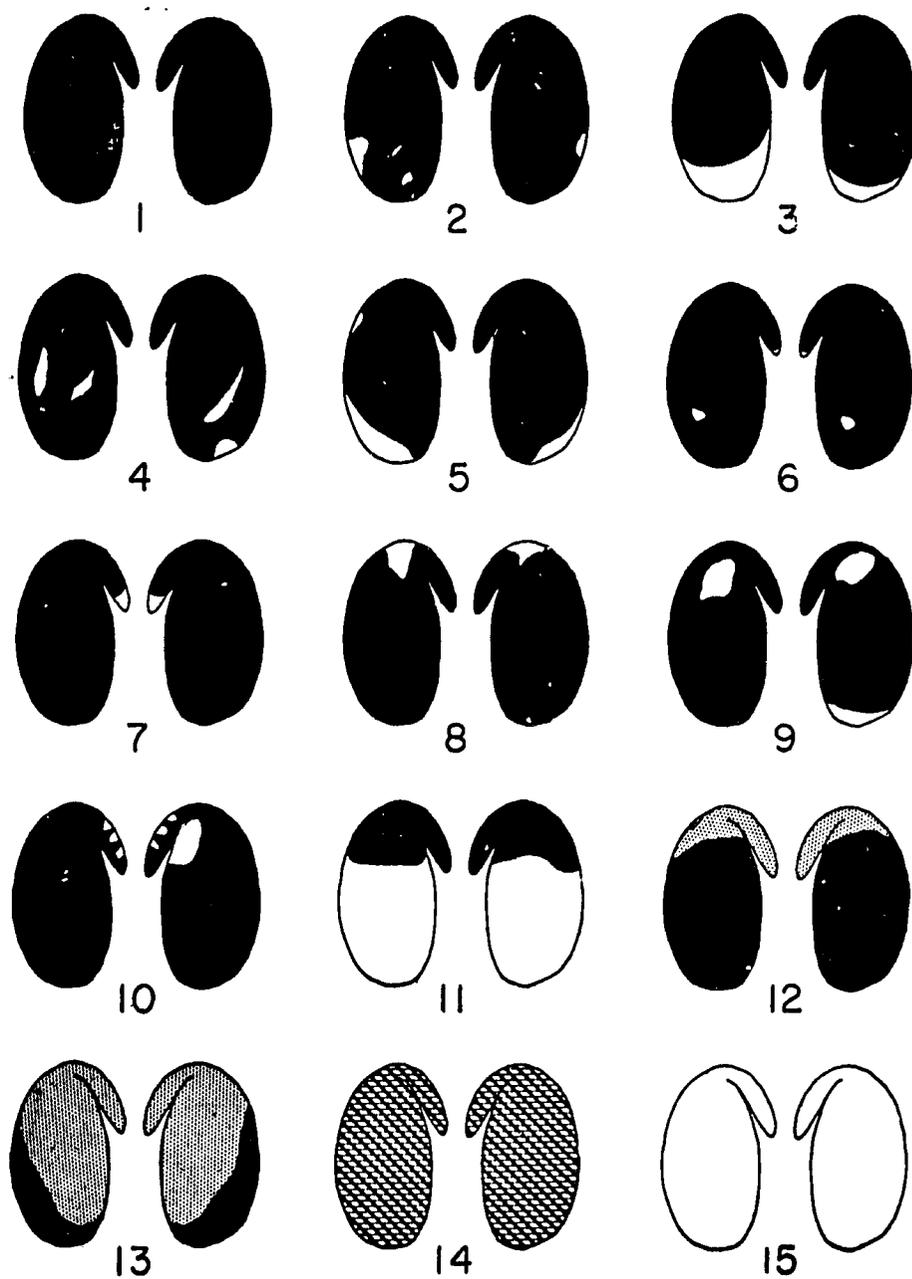


PLANCHE 12

graines de cucurbitacées de petites dimensions (concombres, melons) impose une grave limitation à l'application pratique de l'essai de ces espèces au tétrazolium.

RADIS (*Raphanus sativus*)

Structure de la graine et de la plantule.

Les graines de radis ont une forme globulaire et leur couleur varie du jaune au brun. Le tégument est relativement lisse et mince (Fig. 16 A).

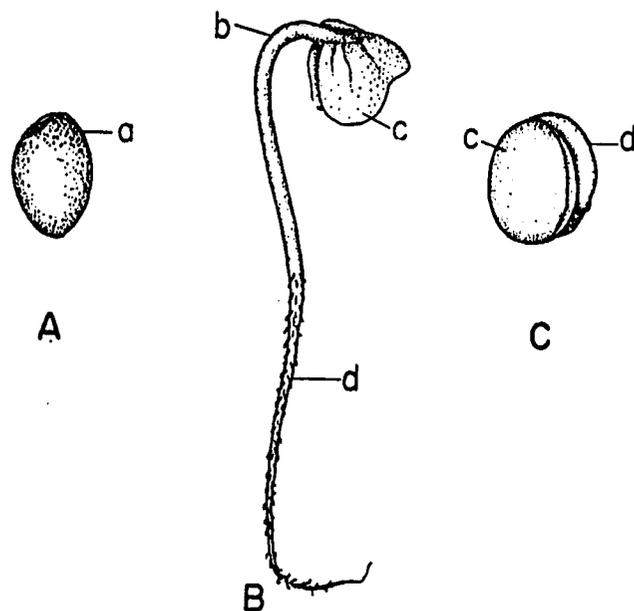


Fig. 16

Structure de la graine et de la plante du radis. A. Graine — B. Plantule — C. Embryon, a) tégument, b) hypocotyle, c) cotylédon extérieur, d) racine principale (radicule).

L'embryon du radis remplit la totalité de l'intérieur de la graine. Les cotylédons sont larges et pliés longitudinalement de sorte que seul le cotylédon « extérieur » et les bords du cotylédon intérieur sont visibles dans la graine décortiquée (cotylédons condupliqués). L'axe racicule-hypocotyle est disposé contre le cotylédon intérieure dans l'angle formé par les replis cotylédonaires, son extrémité étant dirigée vers le haut du cotylédon (Fig. 16 C).

Lors de la germination, la racicule fait éclater le tégument et l'axe racicule-hypocotyle s'allonge en poussant les cotylédons au-dessus du sol. Les cotylédons se déplient alors et se développent (fig. 16, C).

Préparation et coloration des graines.

Les téguments des graines de radis et autres crucifères, doivent être enlevés car ils sont relativement imperméables au tétrazolium. L'enlèvement du tégument se fait très facilement lorsque les graines ont été préparées toute une nuit sur du buvard humide. Pendant la période de préparation, un grand nombre de graines se gonflent tellement que le tégument se rompt, ce qui permet de l'enlever facilement. Un autre système consiste à tremper les graines dans de l'eau pendant 3 à 4 heures avant d'enlever le tégument. La scarification des graines dans de petits pots doublée de papier de verre affaiblit le tégument, permet la pénétration rapide de l'eau et facilite l'enlèvement des téguments. Il faut veiller, pendant l'enlèvement du tégument, à endommager le moins possible l'embryon. Tout dégât occasionné par l'enlèvement du tégument doit être noté pour empêcher toute confusion avec d'autres imperfections au moment de l'interprétation.

Les graines décortiquées sont placées immédiatement dans une solution de tétrazolium à 1 % à 40°. A cette température, on obtient une coloration satisfaisante en 1 ou 2 heures, tandis qu'à des températures plus basses il faut une durée de coloration un peu plus longue. Quelle que soit la température, les graines doivent rester dans la solution jusqu'à ce qu'on ait obtenu une coloration rouge vif mais pas trop intense. Lorsque les graines ont été colorées d'une manière satisfaisante, on vide la solution et on lave plusieurs fois les graines dans de l'eau fraîche. Il faut garder suffisamment d'eau après le dernier lavage pour recouvrir complètement les graines.

Interprétation.

Les graines ne se colorent pas toutes avec la même intensité pendant un temps déterminé. Certaines prennent une couleur rouge sombre, tandis que d'autres deviennent roses. Les teintes allant du rose au rouge sombre sont interprétées comme indiquant un tissu viable. Le cotylédon intérieur a généralement une coloration plus claire que la radicule et que le cotylédon extérieur.

En raison de la faible dimension de la graine, il est nécessaire d'employer une loupe pour faire une interprétation exacte. Les graines non viables comprennent les suivantes : 1) graines sur lesquelles la moitié du tissu cotylédonnaire n'est pas coloré, 2) graines sur lesquelles la partie de la radicule qui n'est pas colorée s'étend au-delà de la pointe extrême, et 3) les graines avec une zone non colorée à la jonction des cotylédons et de l'axe radicule hypocotyle.

La Planche 13 représente 15 réactions types de coloration. Les illustrations sont groupées deux par deux et représentent les deux côtés de la graine. Seuls les bords du cotylédon intérieur sont représentés. La signification et la classification de chaque réaction de coloration sont indiquées dans la légende.

L'exactitude de l'essai est bonne. La principale difficulté réside dans l'enlèvement des téguments.

Adaptation à des espèces similaires de graines.

Les techniques et méthodes décrites ci-dessus pour le radis peuvent être appliquées sans changement aux espèces de Brassica. Il convient de souligner cependant que l'enlèvement des téguments de quelques-unes des variétés à très petites graines est extrêmement difficile.

VI. LA METHODE VITASCOPE

Le Vitascope est un instrument dans lequel un vide réglé et une forte température sont employés pour accélérer le taux de la réaction au tétrazolum, c'est-à-dire la coloration. L'instrument est pourvu aussi d'un dispositif automatique et complet de vannes qui recyclent la solution de tétrazolum. Cet appareil a été mis au point en Europe et il est en vente dans notre pays (fig. 17).

Le Vitascope permet d'obtenir des colorations satisfaisantes et interprétables sur un grand nombre de graines en 10 à 50 minutes. Il convient

PLANCHE 13

Critères pour interpréter les résultats des essais au tétrazolum sur des graines de radis. Les illustrations sont groupées par paire et représentent les deux côtés de la graine. Les zones noires indiquent le tissu coloré et vivant tandis que les zones blanches représentent le tissu non coloré et mort.

- | | |
|----------|--|
| N° 1 | Viable : graine complètement colorée. |
| N° 2 — 4 | Viables : zones non colorées sans importance sur les cotylédons extérieur et intérieur. |
| N° 5 | Viable : la majeure partie du cotylédon extérieur. |
| N° 6 | Viable : l'extrémité de la radicule n'est pas colorée. |
| N° 7 | Viable : l'extrémité de la radicule n'est pas colorée, une grande partie du cotylédon extérieur n'est pas colorée. |
| N° 8 | Non viable : la partie de la radicule non colorée s'étend au-delà de sa pointe extrême. |
| N° 9 | Non viable : la jonction des cotylédons et de l'axe radicule-hypocotyle n'est pas colorée. |
| N° 10 | Non viable : la radicule est pratiquement entièrement traversée par une bande non colorée ; des zones non colorées moins importantes se trouvent sur le côté extérieur. |
| N° 11 | Non viable : plusieurs zones non colorées importantes sur la radicule. |
| N° 12 | Non viable : le cotylédon intérieur est entièrement incolore et une grande partie du cotylédon extérieur n'est pas colorée (plus de la moitié du tissu cotylédonaire n'est pas colorée). |
| N° 13 | Non viable : l'axe radicule-hypocotyle est entièrement incolore. |
| N° 14 | Non viable : les cotylédons sont entièrement incolores. |
| N° 15 | Non viable : la graine est complètement incolore. |

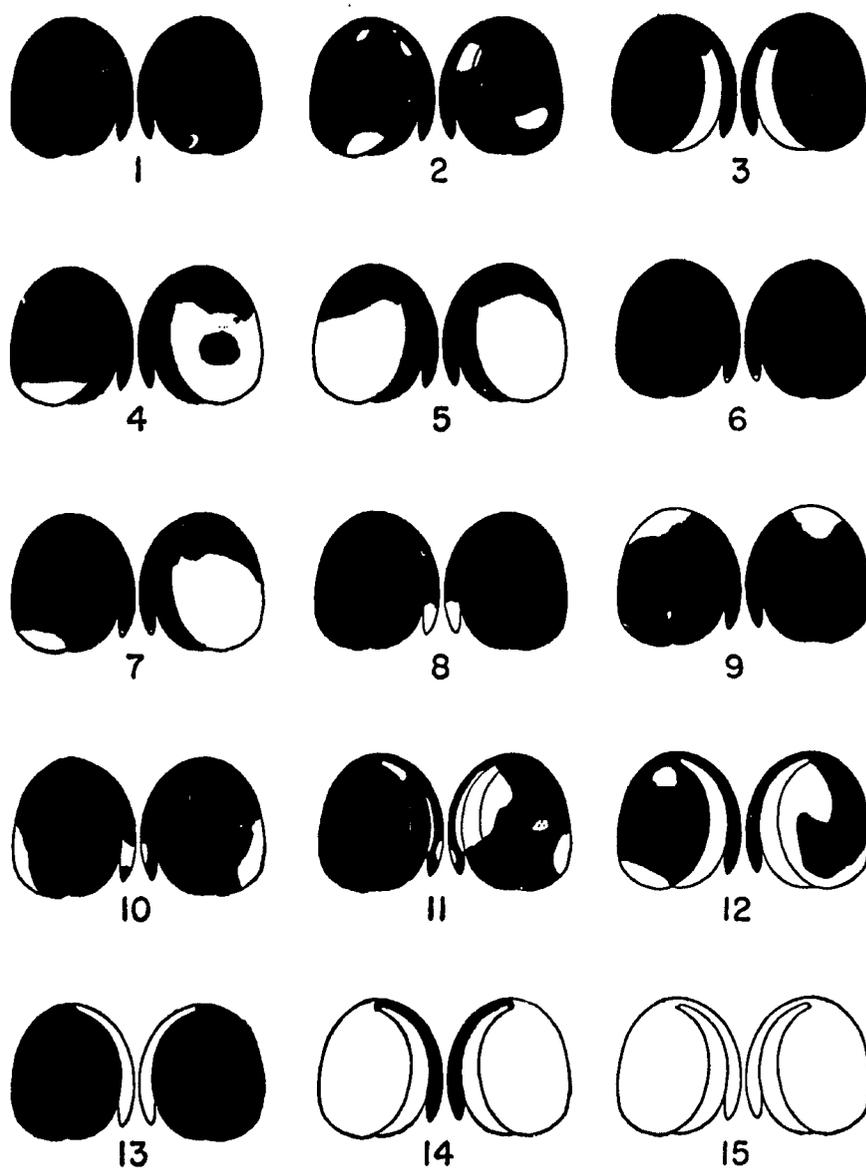


PLANCHE 13

de souligner cependant que le Vitascope n'accélère que la réaction de coloration. Le temps nécessaire pour préparer et faire subir un traitement préalable est approximativement le même lorsque les semences sont colorées par le Vitascope ou dans une assiette à la température ambiante. En outre, le Vitascope ne supprime ni ne facilite l'interprétation du résultat des essais. On ne peut obtenir des résultats exacts que par un examen méticuleux et critique des réactions de coloration sur les diverses graines, ainsi qu'il a été indiqué précédemment. Les périodes de coloration et autres renseignements relatifs à la méthode Vitascope sont donnés dans le Tableau I.

TABLEAU I. — METHODE VITASCOPE POUR EFFECTUER LES ESSAIS AU TETRAZOLIUM¹

PLANTE	PRÉPARATION	DURÉE DE COLORATION
<i>Graminées, grosses graines</i> , maïs, blé, avoine, orge, seigle, sorgho)	Tremper dans l'eau pendant 4 heures Sectionner à travers l'embryon.	10-30 min.
<i>Graminées, graines de dimensions moyennes</i> (fétuques, raygrass, brome commun, dactyle, brome de Schrader, chiendent pied de poule, sorgho d'Alep, paspalum platycaule)	Placer sur une matière humide pendant 4 à 16 heures. Sectionner à travers l'embryon.	20-40 min.
<i>Graminées, petites graines</i> (chiendent, fléole, pâturin des prés, paspalum platycaule)	Placer sur une matière humide pendant 4 à 16 heures. Perforer les graines dans l'endosperme près de l'embryon.	30-60 min.
<i>Coton</i>	Tremper dans l'eau pendant 4 heures, enlever le tégument et les autres membranes.	15-20 min.
<i>Légumineuses, grosses graines</i> (soja, pois, haricots)	Placer les graines sur une matière humide pendant 2 heures, puis dans l'eau pendant 2 à 3 heures. Enlever les téguments.	15-20 min.
<i>Légumineuses, petites graines</i> (trèfle, luzerne, lespedeza, vesces)	Placer les graines sur une matière humide pendant 4 à 8 heures, piquer les graines sur le côté opposé à la radicule.	20-30 min.

1. Ces renseignements sont fondés en grande partie sur les méthodes décrites par Baker (2) et Metzger (76).

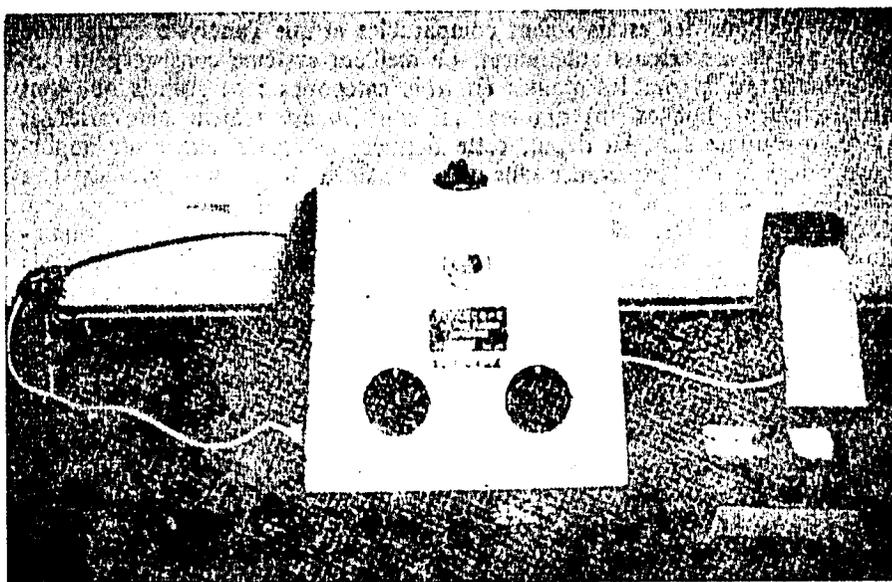


Figure 17. — Le Vitascope.

VII. EXACTITUDE DE L'EXAMEN AU TETRAZOLIUM

Rien ne peut remplacer l'expérience, et l'expérience ne s'acquiert qu'avec la pratique. Celui qui effectue pour la première fois l'essai au tétrazolium sous-estimera ou surestimera fréquemment le pourcentage de germination, en dépit de tous les conseils, avis et références, schémas et autre documentation dont il pourrait disposer. L'objet du présent bulletin n'est pas de donner des directives sûres pour l'essai au tétrazolium, mais plutôt de fournir les renseignements de base nécessaires qui permettront d'acquérir de l'expérience. Les méthodes présentées ici permettront d'obtenir une coloration satisfaisante des différentes espèces de graines. Les critères d'interprétation donneront, s'ils sont suivis exactement, des résultats relativement exacts dans la plupart des cas. Il est évident, cependant, qu'il n'est pas possible d'examiner toutes les combinaisons possibles de tissus colorés et non colorés, qui en fait ne sont même pas toutes connues, car un grand nombre de lots présentent des problèmes nouveaux et uniques en leur genre, même à l'analyste expérimenté. Il n'est pas possible non plus de décrire avec exactitude les teintes de couleur, la texture et la fermeté des tissus, la clarté de la coloration, facteurs qui tous influencent l'interprétation et qui présentent une grande importance pour l'analyste expérimenté.

La meilleure façon d'interpréter avec exactitude les résultats des essais au tétrazolium consiste à faire des essais comparatifs de germination et au tétrazolium. Ces essais comparatifs peuvent être répétés jusqu'à ce

que les résultats des essais soient comparables et que l'analyste comprenne les causes de ses erreurs antérieures. Le meilleur système consiste peut-être pour l'analyste à trier les graines en trois catégories : a) graines qui sont manifestement bonnes, b) graines qui sont manifestement mauvaises et c) graines douteuses. Au début, cette dernière catégorie sera assez importante, mais avec l'expérience elle sera ramenée à quelques graines. Les réactions de coloration sur les graines de la catégorie douteuse devront être soigneusement notées. Si l'on connaît les résultats d'un essai de germination, on pourra s'efforcer de classer les graines douteuses et de noter les effets de la classification sur le pourcentage de germination probable. Une étude soigneuse du problème permettra de classer avec exactitude les graines.

Il ne suffit pas de faire un essai comparatif au tétrazolium et un essai de germination une seule fois ou sur un seul échantillon. Il ne faut pas non plus s'estimer satisfait parce que la moyenne de plusieurs essais au tétrazolium sur différents échantillons se rapproche de la moyenne des résultats des essais de germination sur les mêmes échantillons. L'utilisation de l'essai au tétrazolium exige que le pourcentage de germination soit estimé avec précision sur chaque échantillon.

Le débutant doit veiller à ne pas tirer hâtivement des conclusions et doit être conscient du danger que présente la compensation des erreurs. Le pourcentage de germination d'un seul essai peut être calculé avec une approximation suffisante, simplement parce que l'analyste a classé le même nombre de graines comme viables alors qu'elles étaient non viables, et comme non viables celles qui étaient viables. Ainsi, dans un cas on obtient des résultats excellents, alors que la vitalité d'un autre échantillon risque d'être surestimé ou sous-estimé considérablement.

L'exactitude s'améliorera avec la pratique et l'expérience. En fait, l'analyste expérimenté qui remarque une différence entre les résultats des essais de germination et au tétrazolium sur le même échantillon mettra fréquemment en doute l'exactitude de l'essai de germination. Il est bon de ne pas oublier qu'il y a des erreurs dans les essais de germination, aussi bien qu'il y a des erreurs dans les essais au tétrazolium. La faute n'incombe pas toujours à l'essai au tétrazolium.

Il arrive fréquemment qu'en essayant des graines comme celles de coton, de pois et d'avoine, les résultats des essais au tétrazolium soient sensiblement supérieurs aux résultats des essais de germination. Dans de nombreux cas, on constatera que les graines n'ont pas été traitées avec un fongicide. Si les graines ont été traitées, les essais de germination augmentent généralement et se rapprochent des résultats des essais au tétrazolium. Par exemple, les grains d'avoine qui véhiculent le champignon de la nielle ont fréquemment un pourcentage de germination de 40 à 50, tandis que les résultats des essais au tétrazolium indiquent 85 %. Si les grains sont traités, le pourcentage de germination passe généralement à 85 % environ.

En résumé, la pratique est nécessaire pour acquérir le degré d'exactitude voulu. La pratique et l'amélioration de l'exactitude s'accompagnent aussi de la confiance. Un analyste ne peut pas commencer à appliquer couramment les essais au tétrazolium tant qu'il n'aura pas confiance en lui-même et dans l'essai.

VIII. LIMITATIONS DE L'ESSAI AU TETRAZOLIUM

Pour employer intelligemment l'essai au tétrazolium, il faut au moins en connaître les limites. Certaines de ces limites qui ont trait à des espèces de semences particulières, ont déjà été indiquées. Les facteurs, ainsi que d'autres, qui n'ont pas été mentionnés précédemment, sont étudiés ci-dessous :

1. Bien que les résultats de l'essai au tétrazolium puissent être obtenus dans un temps relativement court, l'essai nécessite généralement plus d'homme/heures de travail que l'essai de germination.

2. Quelques-unes des techniques et méthodes d'essai au tétrazolium sont extrêmement fastidieuses et nécessitent à la fois de la patience et de l'expérience.

3. Pour les plantes qui ont des semences dures, l'essai au tétrazolium n'indique pas exactement la proportion de graines viables et de graines dures contenues dans l'échantillon. Cependant, si les résultats des essais sont correctement interprétés, ils doivent être comparables au total des graines viables plus le pourcentage de graines dures.

4. L'essai au tétrazolium n'établit pas de différence entre les graines dormantes (c'est-à-dire dures) et les graines non dormantes. Ainsi, pour les espèces de semences qui restent longtemps dormantes, les résultats des essais au tétrazolium sont très supérieurs au résultat des essais de germination. Lorsqu'il est habituel d'indiquer la mention « graines dures », les résultats des essais au tétrazolium doivent se rapprocher du total des graines germables plus le pourcentage de graines dures.

5. Les dégâts occasionnés aux graines par les produits chimiques de traitement (fongicides, insecticides, fumigants) ne sont généralement pas détectés par l'essai au tétrazolium. Les graines qui ont été endommagées par un agent chimique se colorent aussi bien que les graines viables.

6. L'essai au tétrazolium ne permet pas toujours de détecter avec exactitude les dégâts occasionnés récemment par la gelée, la chaleur ou les machines.

7. Comme l'essai au tétrazolium ne comporte pas de germination, les micro-organismes qui nuisent aux plantules ne sont pas détectés.

Bien qu'il puisse sembler que l'essai au tétrazolium ait beaucoup trop de limitations pour pouvoir être d'un usage général, la proportion de lots de semences pour lesquels ces limitations peuvent jouer est assez faible.

IX. REFERENCES

1. Association of Official Seed Analysts. 1960. Rules for Testing Seeds. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 49(2):1-71.
2. Baker, Louise C. 1960. Tentative methods for tetrazolium testing of various Southern seed. Seed Technologists News 29(1):9-13.
3. _____, 1959. Value and limitations of quick viability seed testing. Seeds-men's Digest 10(2):52.

4. Barton, Lela V. 1961. Seed Preservation and Longevity. Interscience Publishers, Inc., New York, 216 pp.
5. Bass, L. N. 1955. Determining the viability of western wheatgrass seed lots. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 45:102-104.
6. ———, 1953. 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as an indicator of the viability of Kentucky bluegrass seed. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 43:131-135.
7. ———, 1955. 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as an indicator of the viability of timothy seed. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 45:45-47.
8. Bennett, Norah. 1948. Tetrazolium chloride as a test reagent for freezing injury of corn seed. M. S. Thesis. Iowa State University Library, Ames, Iowa.
9. ———, and W. E. Loomis. 1949. Tetrazolium chloride as a test reagent for freezing injury of seed corn. Plant Physiol. 24:162-174.
10. Brewer, H. E. 1959. Tetrazolium chloride as a test for damage in artificially cured peanuts. Science 110:451-452.
11. Brucher, H. 1948. Eine Schnellmethode zur Bestimmung der Keimfähigkeit von Samen. Physiol. Plant. 1:343-348.
12. Bulat, H., and W. Lindenbein, 1961. Zwanzig Jahre Erfahrung mit der Tetrazolium-Methode an Geholzsamen. Line Übersicht. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 267(3):453-471.
13. Cabral, J.F., and Maria F. Cruz. 1960. The topographical tetrazolium method for determining germinating capacity of *Lupinus luteus* L. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 25:474-483.
14. Ching, T. M. 1960. Free fatty acid as a rapid estimation of viability in crimson clover seed. 1960 Agron. Abstrs., p. 68.
15. ———, and M. C. Parker. 1959. Hydrogen peroxide for rapid viability tests of some coniferous tree seeds. Forest Sci. 4:128-134.
16. Chippendale, H. G. 1934. The effect of soaking in water on the « seeds » of some Graminae. Ann. Appl. Biol. 21:225-232.
17. Cobb, R. D. 1956. 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as a viability indicator of seeds fumigated with methyl bromide. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 46:62-66.
18. Cottrell, H. J. 1947. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. Nature 159:748.
19. ———, 1948. Tetrazolium salt as a seed germination indicator. Ann. Appl. Biol. 35:123-131.
20. Darsie, M. L., Charlotte Elliot, and G. J. Pierce. 1914. A study of the germinating power of seeds. Bot. Gaz. 58:101-136.
21. Davidson, W. A. and O. L. Justice. 1959. Comments on tetrazolium testing. News Letter Assoc. Off. Seed Anal. 33(1):26-27.
22. Davics, P. W. A., and J. Winstanley. 1957. The use of 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as a measure of the seed viability of Mexican grass *Ixophorus unisetus* (Presl.) Schlecht. Trop. Agr. (St. Augustine) 34(2):144-148.
23. Davis, W. E. 1926. The use of catalase as a means of determining the viability of seeds. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 18:33-39.
24. Delouche, J. C. 1943. Influence of moisture and temperature levels on the germination of corn, soybeans and watermelons. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 43:117-126.
25. ———, Mabel Raspet, and Myrta Lienhard. 1961. Application of the tetrazolium test to crimson clover. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 51:151-154.
26. Doroshenko, A. V. 1937. Plasmolytic method of determining the germination capacity of seed. Bull. Appl. Bot. Pl.-Breed., Ser. IV, 2:119.
27. Dutcher, R. A. 1945. Report of Joint Intelligence Objectives Agency. PB-1247, September, 1945.
28. Edwards, T. I. 1934. Relation of germination of soybeans to temperature and length of incubation time. Plant Physiol. 9:1-35.
29. ———, 1932. Temperature relations of seed germination. Quart. Rev. Biol. 7:428-443.
30. Eldmann, F. 1938. Eine neue biochemische Methode zur Erkennung des Aussaawertes von Samen. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 10:203-211.

31. Eggebrecht, H. Die Untersuchung von Saatgut. Neuman Verlag, Berlin. 114 pp.
32. Favilli, R. 1950. The use of tetrazolium salts for the rapid determination of the germinative capacity of seeds. Ann. Univ. Pisa, Fac. Agr., 11:57-84. Abstr. in Chem. Abstr. 46:8196. 1952).
33. Fick, G. L., and R. P. Hibbard. 1925. A method for determining seed viability by electrical conductivity measurements. Mich. Acad. Sci. Arts and Letters. 5:95-103. 1925.
34. Flemion, Florence. 1948. Reliability of the excised embryo method as a rapid test for determining the germinative capacity of dormant seed. Contrib. Boyce Thompson Inst. 15:229-241.
35. Gadd, Ivar. 1950. Biochemical tests for seed germination. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 16(2):235-253.
36. _____, and A. Kjaer. 1940. Ueber die Verwendbarkeit der Selen-und Indigo Karminmethoden bei der Prufung von Frost-und Fusariumgeschadigtem Getreide. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 12:140-149.
37. Germ, H. 1955. Procedure for biochemical tests. In : Testing of Agricultural Seeds Moving in International Trade, pp. 75-78. Paris, The European Productivity Agency of the Organization for European Economic Cooperation.
38. _____, 1957. Report on the biochemical viability test committee. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 22:302-321.
39. Goodsell, S. F. 1948. Triphenyl tetrazolium chloride for viability determination of frozen seed corn. Jour. Amer. Soc. Agron. 40:432-442.
40. Grabe, D. F. 1959. Preliminary evaluation of tetrazolium derivatives for testing seed viability. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 49:122-130.
41. _____, 1959. Technique for interpretation of tetrazolium tests. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 49:131-133.
42. Grano, C. X. 1958. Tetrazolium chloride to test loblolly pine seed viability. Forest Sci. 4(1):50-53.
43. Harmond, J. E. 1962. Some new reserach activities in seed processing and testing. Proc. 7th Ann. Farm Seed Conf., pp. 43-49.
44. Hasegawa, K. 1935. On the determination of viability in seed by reagents. Proc. Int. Seed test. Assoc. 7:148-153.
45. Helmer, J. D. 1962. Evaluation of some methods for differentiating among vigor levels in seeds of crimson and red clover. M. S. Thesis. Mississippi State University Library, Etate College, Mississippi.
46. Hibbard, R. P., and E. V. Miller. 1928. Biochemical studies on seed viability. I. Measurements of conductance and reduction. Plant Physiol. 3:335-352.
47. Hoffpauer, C. L., Dorothy H. Petty, and H. D. Guthrie. 1947. Germination and free fatty acids in individual cottonseeds. Science 106:344.
48. Holmes, G. D. 1955. Biochemical tests tree seeds. In : Testing of Agricultural Seeds Moving in International Trade, pp. 79-85. Paris. The European Productivity Agency of the Organization for European Economic Cooperation.
49. Hyde, E. O. C. 1949. Methods of determining the viability of various seed by tetrazolium staining. I. Chewings fescue. New Zeal. Jour. Sci. and Tech. A. 31 (1):13-20.
50. _____, 1949. Methods for determining the viability of various seed by tetrazolium staining. II. Perennial ryegrass. New Zeal. Jour. Sci. and Tech. A. 34(2):195-201.
51. International Seed Testing Association. 1959. International Rules for Seed Testing. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 24(3):475-584.
52. Isely, Duane. 1952. Employment of tetrazolium chloride for determining viability of small grain seeds. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 42:143-153.
53. Jensen, C. O., W. Sacks, and F. A. Baldauski. 1951. The reduction of triphenyl tetrazolium chloride by dehydrogenases of corn embryos. Science 113:65-66.
54. Jensen, Louisa, A. 1960. Quick Tests for seeds. Proc. 1960 Seed Industry Conference, Davis California, pp. 30-34.
55. _____, Merle Pierpont, and Peggy Hayes. 1957. Modified techniques, equipment and results of tetrazolium tests on *Poa pratensis*. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 47:141-144.

56. Johnson, L. P. V. 1947. Embryonic reaction to sodium biselenite as a test of seed viability. *Jour. Amer. Soc. Agron.* 39:943-947.
57. Kietreiber, Maria. 1960. Über Differenzen zwischen TTC - and Keimfähigkeitswert bei *Zea Mays*. *Proc. Int. Test. Assoc.* 25:467-472.
58. Koester, Mary L. 1950. A chemical test for seed viability. U. S. Atomic Energy Commission Unclassified Document 802 (AECU-802). Technical Information Division, ORE, Oak Ridge Tennessee. Brookhaven National Library.
59. Kugler, I. 1952. Keimfähigkeit and Abgabe fluoreszierender Stoffe bei Samen. *Naturwissenschaften* 38(9):213.
60. Kuhn, R., and D. Jerchel. 1941. Über Invertseifen. VIII : Mitt. Reduktion von Tetrazolium-salzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen. *Ber. Deutsch. Chem. Ges.* 74:949-952.
61. Lakon, G. 1949. Die Anwendung meines Topographischen Tetrazolium Verfahrens zur Feststellung der Keimfähigkeit der kern and Steinobstsmen Saatgut-Wirtsch. 1:51-53.
62. ———, 1942. Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit der Getreidefruchte durch Tetrazoliumsalze. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 60:299-305.
63. ———, 1942. Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit von Mais durch Tetrazoliumsalze. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 60:434-444.
64. ———, 1940. Die topographische Selenmethode, ein neues Verfahren zur Feststellung der Keimfähigkeit der Getreidefruchte ohne Keimversuch. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 12:1-18.
65. ———, 1949. The topographical tetrazolium method for determining the germinating capacity of seeds. *Plant Physiol.* 24:389-394.
66. ———, 1950. Weitere. Forschungen über das Topographical Tetrazolium Verfahren und die Ermittlung der Triebkraft. *Proc. In. Seed Test. Assoc.* 16:154-266.
67. ———, and H. Bulat. 1955. Die Feststellung der Keimfähigkeit der Kompositen-fruchte nach dem Topgraphischen Tetrazolium-Verfahren. *Saatgut-Wirtsch.* 7:201-204.
68. Lambou, M. G. 1953. 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as a rapid indicator of viability in cottonseed. *Science* 117:690-693.
69. Leggatt, C. W. 1933. A further note on catalase activity as a measure of seed viability. *Canad. Jour. Res.* 9:571-573.
70. Lesage, P. 1922. Sur la détermination de la faculté germinative autrement que par la germination des graines. *Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris)* 174:766-767.
71. Lindenbein, W. 1959. Professor Dr. George Lakon, *Saatgut-Wirtsch.* 11(1):17-18.
72. ———, and H. Bulat. 1960. Beiträge zur topographischen Tetrazoliummethode. II. Einige Versuchsergebnisse mit künstlich getrockneten Spinatsamen. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 25:460-462.
73. ———, and H. Bulat. 1960. Grundsatzliches zum Tetrazoliumtest. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 25:449-451.
74. MacLeod, A. M. 1950. Determination of the germinative capacity of barley by means of tetrazolium salts. *Jour. Inst. Brew.* 5E:125-134.
75. McHargue, J. S. 1920. The significance of the peroxidase reaction with reference to the viability of seeds. *Jour. Amer. Chem. Soc.* 42:612-615.
76. Metzger, R. B. 1960. The vitascope - an aid for rapid determination of viable seed with tetrazolium. *Tex. Agr. Exp. Sta. MP.* 433.
77. Moore, R. P. 1959. Measuring viability with a vitascope takes practice. *Seeds-men's Digest* 10(4):14, 46-49.
78. ———, 1958. Quick-test seed tests. *In : Fifty ears of Seed Testing*, pp. 75-78. Golden Jubilee Publication. Association of Official Seed Analysts.
79. ———, 1958. Soap speeds sprouting. *Res. and Farming, N. C. Agr. Exp. Sta.* 16(4):11.
80. ———, and E. Smith. 1957. Seeds must be more than just alive. *Crops and Soils* 9(6):14-16, 41.
81. ———, and E. Smith. 1956. Tetrazolium - a useful research tool in studying causes for seed germination difficulties. *Proc. Assoc. Seed Control Off. Southern States.* 1956:15-22.

82. _____, and E. Smith. 1957. Tetrazolium testing. News Letter Assoc. Off. Seed Anal. 31(2):33-38.
83. Munn, M. T. 1951. Cucurbit seed germination. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 41:133-139.
84. Neljubow, N. 1925. Vital farbung von samen. Schriften fur samenkunde, 1925.
85. _____, and B. Issatschen o. 1929. Ueber die Anwendung der « Vitalfarbung » zur Bestimmung der Keimfahigkeit der Samen. Actes V. Congr. Int. D'Essais de Semences, Rome, pp. 400-404.
86. Niles, J. J. 1954. I. The use of triphenyl tetrazolium bromide in viability tests of rice seed. Trop. Agriculturist 110:13-20.
87. _____, 1955. II. The use of triphényl tetrazolium bromide in viability tests of rice seed. Trop. Agriculturist 111:279-285.
88. On, Danny. 1952. 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as a viability indicator of certain coniferous seeds. Jour. For. 50:868.
89. Parker, Johnson. 1953. New methods for the determination of forest tree seed germination. Jour. For. 51:34-35.
90. _____, 1953. Some applications and limitations of tetrazolium chloride. Science 118:77-79.
91. Plaut, M. M., and A. Halfon. 1954. The viability test of pea, bean and cucumber seeds by resazurin staining. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 19:14-23.
92. Poe, S. E., Jean D. Thatcher, L. U. Wiles, H. F. Goatcher, and Martha Hicks. 1950. Quick tests for cottonseed germination. Arkansas State Plant Board Cir. 7.
93. Porter, R. H., Mary Durrel, and H. J. Romm. 1947. The use of 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as a measure of seed germinability. Plant Physiol. 22:149-159.
94. Presley, J. T. 1958. Relation of protoplast permeability to cottonseed viability and predisposition to seedling disease. Plant. Dis. Repr. 42:852.
95. Roberts, L. W. 1951. Survey of factors responsible for reduction of 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride in plant meristems. Science 113:692-693.
96. Sakata, T. 1933. The use of chemicals to determine viability of seeds. Seed World 33(13):64.
97. Sarvella, Patricia, and Georganne Johnson. 1960. Vital staining in cotton pollen. Jour. Miss. Acad. Sci. 6:379.
98. Schenk, R. U., M. M. MacMasters and F. R. Senti. 1957. A note on improved interpretation of the 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride color test for viability as an indication of the processing value of corn. Cereal Chem. 34:69-70.
99. Schmidt, W. 1937. Die Prufung des Kräftezustandes beim Saatgut. Ber. Deutsch. Forstwirt, 1937. No. 37-38, 1938. No. 11-13.
100. Schubert, J. 1961. TTC - Reduktionsaktivitat and Keimvermogen Temperatur - beschadigen Samen von *Robinia Pseudoacacia* L. Proc. Int. Seed Test. Assoc. 26(3):472-503.
101. Shuel, R. W. 1948. Seed germinability tests with 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride. Sci. Agr. 28:34-38.
102. Smith, F. E. 1951. Tetrazolium salt. Science 113:751-754.
103. Smith, F. G. 1952. The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. Plant Physiol. 27:445-456.
104. _____, and G. O. Throneberry. 1951. The tetrazolium test and seed viability. Proc. Assoc. Off. Seed Anal. 41:105-108.
105. Svenson, J. 1952. Neuere Erfahrungen mit der Schnellmethods zur Bistimmung der Keimfahigkeit des Getreides. Brauwelt, 19:421-422. (Abstr. in Biol. Abstr. 26:36032, 1952.)
106. Tatum, L. A. 1954. Seed permeability and « cold test » reaction in *Zea mays*. Agron. Jour. 46:8-10.
107. Thomas, C. A. 1960. Permeability measurements of castor bean seed indicative of cold test performances. Science 131:1045-1046.
108. Throneberry, G. O. 1952. Some aspects of the tetrazolium reaction in seeds and the enzymes involved. M. S. Thesis. Iowa State University Library, Ames, Iowa.

109. _____, and F. G. Smith. 1953. The effect of triphenyl tetrazolium chloride on oat embryo respiration. *Science* 117:13-15.
110. Turesson, G. 1922. Ueber den Zusammenhang zwischen Oxydationsezymen und Keimfähigkeit in verschiedenen Samenarten. *Bot. Notiser*, pp. 323-335.
111. Tyszkiewics, S. 1938. Ueber die Prufung des Forstsaatgutes. *Forstw. Zentr. bl.* 60:725-738.
112. Vaughan, C. E. 1962. Physical and physiological properties of seed associated with viability in small seeded legumes. M. S. Thesis. Mississippi State University Library, State College, Mississippi.
113. _____, and J. C. Delouche. 1960. Relation of rate of seed swelling to viability in small seeded legumes. *Proc. Assoc. Off. Seed Anal.* 50:109-111.
114. Verhey, C. 1957. Die Unbrauchbarkeit des Tetrazolium-Verfahrens zur Prufung vom durch Trocknung verletzten Saatgut. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 22:321-329.
115. Walter, A. D. 1901. An attempt to estimate the viability of the seed by an electrical method. *Proc. Roy. Soc.* 68:79-92.
116. Wharton, M. 1955. The use of the tetrazolium test for determining the viability of grass seeds. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 20(1):71-80.
117. _____, 1955. The use of the tetrazolium test for determining the viability of seeds of the genus *Brassica*. *Proc. Int. Seed Test. Assoc.* 20(1):81-88.

X. APPENDICE

A - Fournisseurs de chlorure de triphényle-tétrazolum-2,3,5 et autres dérivés du tétrazolum :

- Fisher Scientific Company, etc.

B - Formule de la solution de clarification au lactophénol :

- 20 ml de phénol ;

- 20 ml d'acide lactique ;

- 20 ml d'eau ;

- 40 ml de glycérine.

Cette formule permet d'obtenir 100 ml de solution clarifiante. On peut en obtenir des quantités plus importantes ou plus faibles en multipliant ou divisant les proportions des ingrédients par le même nombre.