



APAT
Agenzia per la protezione
dell'ambiente e per i servizi tecnici



Manuel pour la récolte l'étude, la conservation et la gestion *ex situ* du matériel végétal

Edition en français, corrigée et amendée à partir de l'original en italien:

Bacchetta, G., Fenu, G., Mattana, E., Piotto & Virevaire, M. – eds – (2006). "**Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione *ex situ* del germoplasma**". APAT, Agenzia per la Protezione dello Ambiente. Roma.

© des textes Les auteurs, 2007

© de cette édition Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles

Reproduction autorisée en citant la source

TRADUCTION ET RELECTURE

François Boillot, Catherine Chambige, Joël Mathez, Myriam Virevaire.

EDITEURS

Gianluigi Bacchetta, Álvaro Bueno Sánchez, Giuseppe Fenu, Borja Jiménez-Alfaro, Efisio Mattana, Beti Piotto, Myriam Virevaire.

AUTEURS

Gianluigi Bacchetta¹, Piero Belletti², Salvatore Brullo³, Luisa Cagelli⁴, Valentina Carasso⁵, José Luis Casas⁶, Claudio Cervelli⁷, M Carmen Escribà⁸, Giuseppe Fenu¹, Fabio Gorian⁹, Jaime Güemes¹⁰, Efisio Mattana¹, Massimo Nepi¹¹, Ettore Pacini¹¹, Pietro Pavone³, Beti Piotto¹², Cristiano Pontecorvo¹, Aranxta Prada⁸, Gianfranco Venora¹³, Lorenzo Vietto¹⁴, Myriam Virevaire¹⁵

REMERCIEMENTS:

Amparo Alonso Chicano, Rosanna Augello, Edoardo Biondi, Carlo Blasi, François Boillot, Monica Casanovas, Massimo Cason, Donato Chiatante, Rosaria Congiu, Roberto Crosti, Pep Luis Gradaille, Anna Guglielmo, Raquel Herreros, Simon Linington, Antoni Marzo, Nuria Membrives, Marian Morcillo Benlloch, Paolo Mulè, Carlo Murgia, Pietro Perrino, Francesco Maria Raimondo, Marco Rossetto, Cristina Salmeri, Mathilde Steffann, Costas Thanos, Pilar Ventimilla, Christophe Zreik.

¹ Centro Conservazione Biodiversità (CCB) – Dipartimento di Scienze Botaniche, Università degli Studi di Cagliari, v.le Sant'Ignazio da Laconi, 13 – 09123 Cagliari (Italia)

² DIVAPRA Genetica Agraria, Università degli Studi di Torino, via Leonardo da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco, Torino (Italia)

³ Dipartimento di Botanica, Università degli Studi di Catania, via A. Longo, 25 – 95123 Catania (Italia)

⁴ Regione Lombardia, Direzione Generale Agricoltura, Unità Organizzativa Sviluppo e Tutela del Territorio Rurale e Montano, via Pola, 12/14 - 20124 Milano (Italia)

⁵ Via Madonna dei boschi, 88 - 12016 Peveragno, Cuneo (Italia)

⁶ Unidad de Biotecnología Vegetal. Instituto Universitario de Investigación CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad). Universidad de Alicante. Carretera de San Vicente del Raspeig s/n. E-03 690 San Vicente del Raspeig, Alicante (España)

⁷ C.R.A. Istituto Sperimentale per la Floricoltura, corso Inglesi, 508 - 18038 Sanremo, Imperia (Italia)

⁸ CIEF – Banc de Llavors Forestals. Conselleria de Territori i Habitatge, Generalitat Valenciana. Avda. Comarques del País Valencià, 114 - 46930 Quart de Poblet (España)

⁹ Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale, Corpo Forestale dello Stato, via del Ponte, 256 - 37020 Peri (Italia)

¹⁰ Jardín Botánico, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia. C/ Quart, 80 - 46008 Valencia (España)

¹¹ Dipartimento di Scienze Ambientali, Sezione di Biologia Vegetale, Laboratorio di Ecofisiologia della Riproduzione, Università degli Studi di Siena, via Pier Andrea Mattioli, 4 - 53100 Siena (Italia)

¹² Dipartimento Difesa della Natura dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (APAT), Sezione Parchi e Risorse Naturali, via Curtatone, 3 – 00185 Roma (Italia)

¹³ Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia, via Rossini, 1 – 95041 Caltagirone (Italia)

¹⁴ CRA – Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura, strada Frassineto, 35 - 15033 Casale Monferrato, Alessandria (Italia)

¹⁵ Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles, 76 A, avenue Gambetta – 83400 Hyères (France)

PATRONAGE



Association Internationale Forêts Méditerranéennes



Centro di Ricerca Interuniversitario "Biodiversità, Fitosociologia ed Ecologia del Paesaggio", Università La Sapienza Roma



Universitat d'Alicant
Universidad de Alicante

Centro Iberoamericano de la Biodiversidad (Instituto Universitario de Investigación), Universidad de Alicante



Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale,
Corpo Forestale dello Stato, Peri (Verona)



Centro per la Salvaguardia e la Valorizzazione della Biodiversità vegetale della Sicilia centro-orientale (CEVASABI)



Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles



CRA – Istituto di Sperimentazione per la Pioppicoltura, Casale Monferrato (Alessandria)



CRA – Istituto Sperimentale per la Floricoltura, San Remo (Imperia)



Dipartimento di Botanica, Università di Catania



Dipartimento di Scienze Ambientali, Sezione di Biologia Vegetale,
Laboratorio di Ecofisiologia della Riproduzione, Università di Siena



Dipartimento di Scienze Botaniche, Università di Palermo



DIVAPRA Genetica Agraria, Università di Torino



Generalitat Valenciana, Conselleria de Territoris i Habitatge, Centre d'Investigació i Experiències Forestals (CIEF), Banc de Llavors Forestals



Gruppo interregionale per la biodiversità e la vivaistica forestale BIOFORV



Jardí Botànic, Universitat de València



Jardín Botánico Atlántico de Gijón



Orto Botanico, Università Politecnica delle Marche



Progetto Interreg IIB "Genmedoc"



Provincia di Cagliari



Società Botanica Italiana onlus



Stazione Consorziale Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia

1. INTRODUCTION	11
1.1. ETHIQUE ET PHILOSOPHIE DE LA CONSERVATION <i>EX SITU</i> ET <i>IN SITU</i>	12
1.2. INFORMATION ET PARTICIPATION.....	13
2. CADRE LEGISLATIF ET CONVENTION SUR LA PROTECTION DE LA BIODIVERSITE14	
2.1. LEGISLATION ET CONVENTIONS INTERNATIONALES	14
2.1.1. CONVENTION DE WASHINGTON – CITES	14
2.1.2. CONVENTION DE BERNE.....	15
2.1.3. PREMIERE CONFERENCE INTERMINISTERIELLE POUR LA PROTECTION DES FORETS EN EUROPE	15
2.1.4. CONVENTION SUR LA DIVERSITE BIOLOGIQUE (CDB).....	16
2.1.5. DIRECTIVE 92/43/CEE RELATIVE A LA CONSERVATION DES HABITATS NATURELS ET SEMI-NATURELS, DE LA FLORE ET DE LA FAUNE SAUVAGE.....	16
2.1.6. DIRECTIVE 1999/105/CE RELATIVE A LA COMMERCIALISATION DES MATERIELS FORESTIERS DE MULTIPLICATION	17
2.2. REGLEMENTATION ET MESURES NATIONALES	18
2.2.1. REGIME DE PROTECTION INTEGRALE	18
2.2.2. REGIME DE PROTECTION PARTIELLE.....	18
2.2.3. REGIME DE REGLEMENTATION PREFECTORALE.....	18
2.2.4. LIVRES ROUGES NATIONAUX.....	19
2.2.5. STRATEGIE NATIONALE POUR LA BIODIVERSITE	19
2.2.6. CHARTE DE L'ENVIRONNEMENT.....	19
2.3. DISPOSITIFS DE PROTECTIONS ET STRATEGIES ADOPTEES AU NIVEAU INTERNATIONAL	21
2.3.1. LISTE ROUGE ET BLEUE "INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN)" ..	21
2.3.2. GLOBAL STRATEGY FOR PLANT CONSERVATION (GSPC).....	22
2.3.3. EUROPEAN STRATEGY FOR PLANT CONSERVATION (ESPC).....	22
2.3.4. GLOBAL 200.....	23
2.4. ACCES AUX RESSOURCES GENETIQUES	23
3. RESEAUX DE BANQUES DE MATERIEL VEGETAL	24
3.1. RESEAUX NATIONAUX	24
3.1.1. RESEAU ITALIEN DE BANQUE DE GERMOPLASME POUR LA CONSERVATION <i>EX SITU</i> DE LA FLORE SPONTANEE ITALIENNE (RIBES).....	24
3.1.2. RESEAU ESPAGNOL DE BANQUES DE GERMOPLASMES DE PLANTES SYLVESTRES (REDBAG)	26
3.1.3. RESEAU DE BANQUE DE GERMOPLASME FORESTIER ESPAGNOL.....	26
3.1.4. FEDERATION CONSERVATOIRES BOTANIQUES NATIONAUX FRANÇAIS (FCBN).....	27
3.2. RESEAUX EUROPEENS.....	28
3.2.1. GENMEDOC.....	28
3.2.2. ENSCONET	30
4. RECOLTE DU MATERIEL VEGETAL.....	30
4.1. CRITERES DE SELECTION DES STATIONS.....	31
4.2. METHODE D'ECHANTILLONNAGE	32
4.2.1. ECHANTILLONNAGE GENETIQUE.....	32
4.2.2. CHOIX DES INDIVIDUS A ECHANTILLONNER.....	34

4.2.3. NOMBRE ET TYPE DE MATERIEL VEGETAL PAR PLANTE.....	34
4.2.4. CONSIDERATIONS A PRENDRE EN COMPTE PENDANT LA RECOLTE.....	35
4.3. RECOLTE SUR LE TERRAIN DU MATERIEL VEGETAL.....	36
4.3.1. DETERMINATION DU MOMENT IDEAL POUR LA RECOLTE.....	37
4.3.2. TEST DE LA COUPE.....	38
4.3.3. PROTOCOLE DE RECOLTE.....	39
4.3.4. PROCEDURE TYPE POUR LA RECOLTE DES SEMENCES.....	40
4.4. RECUEIL DES DONNEES ET DES INFORMATIONS SUR LE TERRAIN : COMPILATION DES FICHES.....	40
4.4.1. EQUIPEMENT POUR LA RECOLTE DU MATERIEL VEGETAL ET DES DONNEES.....	40
4.5. PROCEDURES A SUIVRE DANS DES CAS PARTICULIERS.....	42
4.5.1. ECHEC DE LA RECOLTE DU MATERIEL.....	42
4.5.2. POPULATIONS DE DIMENSIONS EXTREMEMENT REDUITES.....	42
4.5.3. DONNEES BIOTIQUES DU PEUPEMENT.....	42
4.5.4. CONDITIONS METEOROLOGIQUES DEFAVORABLES.....	43
4.5.5. NECESSITE DE RECOLTER UN ECHANTILLON D'HERBIER ET/OU UNE PLANTE VIVANTE..	43
4.5.6. RECOLTE D'UN ECHANTILLON DE SOL.....	44
4.6. RECOLTE DE POLLEN.....	44
4.6.1. INTRODUCTION.....	44
4.6.2. CATEGORIES DE GRAINS DE POLLENS.....	45
4.6.3. POURQUOI RECOLTER LE POLLEN.....	46
4.6.4. CONTROLE DE LA VIABILITE.....	46
4.6.5. METHODE DE RECOLTE.....	48
<u>5. TRANSFERT DU MATERIEL VEGETAL.....</u>	<u>49</u>
5.1. CONSERVATION TEMPORAIRE DU MATERIEL VEGETAL.....	49
5.1.1. CONSERVATION DES ACCESSIONS DE SEMENCES RECOLTEES SUR LE TERRAIN.....	49
5.1.2. EXTRACTION DES SEMENCES DES FRUITS.....	49
5.2. ARRIVEE A LA BANQUE.....	50
5.2.1. ACCEPTATION DES ACCESSIONS.....	50
5.2.2. DOCUMENTATION A ANNEXER A L'ACCESSION.....	50
5.2.3. ETAT PHYTOSANITAIRE DU MATERIEL RECOLTE.....	51
5.2.4. MODALITES D'EXPEDITION DES ACCESSIONS.....	51
5.2.5. GESTION DES ACCESSIONS PROVENANT D'UN AUTRE CENTRE.....	52
5.2.6. GESTION DU MATERIEL DE LA PART DE LA BANQUE.....	52
<u>6. TRAITEMENT DU MATERIEL VEGETAL AVANT CONSERVATION.....</u>	<u>52</u>
6.1. ENTREE DU MATERIEL VEGETAL DANS LA BANQUE.....	53
6.2. QUARANTAINE.....	54
6.3. TESTS INITIAUX ACCOMPLIS POUR L'EVALUATION DES LOTS A L'ENTREE.....	54
6.4. FRUITS CHARNUS.....	55
6.5. POST-MATURATION.....	55
6.6. MODALITES DE NETTOYAGE.....	56
6.6.1. EXTRACTION MANUELLE.....	56
6.6.2. EXTRACTION A FROID.....	57
6.6.3. EXTRACTION A CHAUD.....	57
6.6.4. OPERATIONS MECANIQUES.....	58
6.6.5. OPERATION MANUELLE OU MIXTE.....	59
6.7. QUANTIFICATION DE L'ACCESSION ET ANALYSE DU MATERIEL VEGETAL.....	60
6.8. TESTS QUALITATIFS.....	61
6.8.1. CAPACITE GERMINATIVE.....	62
6.8.2. VITALITE.....	62
6.8.3. TEST DE VIGUEUR.....	64

6.9. DESHYDRATATION	64
6.9.1. TOLERANCE A LA DESHYDRATATION ET TYPE DE CONSERVATION.....	64
6.9.2. CHAMBRE DE DESHYDRATATION.....	66
6.9.3. DESHYDRATANT ARTIFICIEL.....	68

7. EMBALLAGE ET CONSERVATION.....69

7.1. CONSERVATION A LONG TERME.....	71
7.1.1. CONGELATION.....	71
7.1.2. LYOPHILISATION OU ULTRA-DESSICCATION.....	72
7.1.3. CRYOCONSERVATION DANS L'AZOTE LIQUIDE.....	74
7.2. COLLECTION ACTIVE.....	79
7.2.1. SEMIS.....	79
7.2.2. INDEX SEMINUM.....	83
7.2.3. DUPLICATION DES COLLECTIONS.....	84
7.3. METHODE DE CONSERVATION DU POLLEN.....	84
7.4. CONSERVATION DU MATERIEL VEGETATIF.....	85

8. GERMINATION.....88

8.1. DEFINITION DE LA GERMINATION	88
8.2. FACTEURS EXTERNES ET GERMINATION	89
8.2.1. EAU.....	89
8.2.2. TEMPERATURE.....	89
8.2.3. OXYGENE.....	90
8.2.4. LUMIERE.....	90
8.3. OBSTACLES A LA GERMINATION: LES DORMANCES	91
8.3.1. METHODE PRATIQUE POUR DETERMINER LE TYPE DE DORMANCE DES SEMENCES NON DESHYDRATEES.....	93
8.4. LEVEE DES DORMANCES (PRETRAITEMENTS)	95
8.4.1. STRATIFICATION FROIDE, VERNALISATION OU PRECHILLING.....	96
8.4.2. STRATIFICATION CHAUDE, ESTIVATION, PREHEATING OU WARMING.....	96
8.4.3. ENFUMAGE.....	97
8.4.4. SCARIFICATION.....	97
8.4.5. ELIMINATION DES TEGUMENTS.....	98
8.4.6. ELIMINATION DES SUBSTANCES INHIBITRICES DE LA GERMINATION.....	98
8.5. CONSEILS PRATIQUES.....	99
8.5.1. EAU.....	99
8.5.2. OXYGENE.....	99
8.5.3. TEMPERATURE.....	100
8.5.4. LUMIERE.....	100
8.5.5 HORMONES ET AUTRES PRODUITS.....	100
8.6. DETERMINATION ET ELABORATION DU OU DES PROTOCOLES.....	101
8.7. ANALYSES DES RESULTATS	104
8.7.1. CATEGORIES D'EVALUATION.....	104
8.7.2. POURCENTAGE DE GERMINATION.....	104
8.7.3. VITESSE DE GERMINATION ('T50 ').....	105
8.7.4. DELAI DE GERMINATION.....	105
8.7.5. COURBE D'INTERPRETATION.....	105

9. GESTION DU MATERIEL VEGETAL.....107

9.1. GESTION DES DONNEES DE L'ECHANTILLON.....	107
---	------------

9.2. GESTION DU MATERIEL VEGETATIF.....	109
--	------------

10. APPROFONDISSEMENTS.....109

10.1. INDICATIONS POUR LA RECOLTE, LA CONSERVATION ET LE SEMIS DES SEMENCES D'ARBRES ET D'ARBUSTES INDIGENES.....	109
<i>10.1.1. INTRODUCTION.....</i>	<i>110</i>
<i>10.1.2. NOTE POUR LA CONSULTATION DE LA TABLE 4.....</i>	<i>110</i>
10.2. COMMENT DETERMINER LES EXIGENCES ECOPHYSIOLOGIQUES DE LA GERMINATION?	125
<i>10.2.1. INTERPRETATION DES RESULTATS.....</i>	<i>127</i>
10.3. RECOLTE, CONSERVATION ET GESTION DU MATERIEL VEGETAL DES SALICACEAE.....	128
<i>10.3.1. PROPAGATION AGAMIQUE.....</i>	<i>130</i>
<i>10.3.2. PROPAGATION GAMETIQUE.....</i>	<i>132</i>
<i>10.3.3. RECOLTE ET CONSERVATION DES SEMENCES.....</i>	<i>133</i>
<i>10.3.4. RECOLTE ET CONSERVATION DU POLLEN.....</i>	<i>136</i>
10.4. UN EXEMPLE D'ETUDE DEMOGRAPHIQUE : LE PROGRAMME AFA EN ESPAGNE	137
<i>10.4.1. ETUDE DES INDIVIDUS.....</i>	<i>138</i>
<i>10.4.2. DONNEES DE RECUEIL DE CHAQUE PARCELLE.....</i>	<i>140</i>
<i>10.4.3. PRODUCTION DE FRUITS PAR PLANTE.....</i>	<i>140</i>
<i>10.4.4. AUTRES DONNEES.....</i>	<i>141</i>
<i>10.4.5. AUTRES ETUDES A MENER.....</i>	<i>141</i>
10.5. ANALYSES D'IMAGES : UN OUTIL UTILE POUR LA CARACTERISATION DES PARAMETRES MORPHOMETRIQUES ET COLORIMETRIQUES DES ACCESSIONS.....	141
10.6. DISPERSION DES DIASPORES: INFLUENCE DU VECTEUR ET DE LA FORME	147
<i>10.6.1. ANEMOCHORIE.....</i>	<i>148</i>
<i>10.6.2. HYDROCHORIE.....</i>	<i>148</i>
<i>10.6.3. AUTOCHORIE.....</i>	<i>148</i>
<i>10.6.4. ZOOCHORIE.....</i>	<i>148</i>
<i>10.6.7. ELAIOSOME ET DISPERSION DES SEMENCES DES PLANTES MEDITERRANEENNES.....</i>	<i>149</i>
10.7. BANQUE DE SEMENCES DU SOL	151

11. GLOSSAIRE153

12. ADRESSES UTILES177

12.1. RESEAU ITALIEN DE BANQUE DE GERMOPLASME POUR LA CONSERVATION <i>EX SITU</i> DE LA FLORE SPONTANEE ITALIENNE (RIBES).....	177
12.2 FEDERATION CONSERVATOIRES BOTANIQUES NATIONAUX FRANÇAIS (FCBN).....	179
12.3 RESEAU ESPAGNOL DE BANQUES DE GERMOPLASME DE PLANTES SYLVESTRES (REDBAG)...	180
12.4 BANQUE DE GERMOPLASME ET CENTRE POUR LA CONSERVATION INTERNATIONALE	181
12.5. SITES WEB.....	181
12.6. REVUES SCIENTIFIQUES SPECIALISEES	186

13. FICHES ANNEXES188

13.1 RECOLTE DU MATERIEL VEGETAL.....	189
13.2 RELEVÉ PHENOLOGIQUE.....	190
13.3 RELEVÉ DEMOGRAPHIQUE.....	191
13.4 RELEVÉ FLORISTIQUE ET SOCIOLOGIQUE.....	192
13.5 ÉTUDE DE LA FAUNE ASSOCIÉE.....	193
13.6 ÉTUDE CLIMATIQUE ET METEOROLOGIQUE.....	194
13.7 RELEVÉ PEDOLOGIQUE.....	195
13.8 TEST INITIAL	196

13.9 NETTOYAGE ET CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL – A.....	197
NETTOYAGE ET CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL – B.....	198
13.10 SUIVI DE LA DESHYDRATATION.....	199
13.11 TEST DE GERMINATION - A.....	200
TEST DE GERMINATION – B.....	201
13.12 TEST COLORIMETRIQUE.....	202
13.13 GESTION DU MATERIEL VEGETATIF.....	203
13.14 GESTION DES SEMIS.....	204
<u>14. BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>205</u>

PREAMBULE

Ce manuel a été prévu pour intervenir sur le terrain et en laboratoire en suivant des indications simples et claires dans l'optique d'une conservation *in situ* et *ex situ* rigoureuse, respectueuse de la biodiversité, du territoire et de la culture qui en découle. L'objet du manuel concerne le matériel végétal de toutes les unités taxonomiques relatives à la flore autochtone des territoires méditerranéens et plus généralement européens. Les méthodologies de suivi retenues visent à faciliter le travail des collecteurs et celui des gestionnaires des banques. Elles garantissent la récolte, le traitement et la meilleure gestion possible du matériel végétal, dans le respect des procédures et des standards nationaux et internationaux. Ce travail est destiné aussi aux étudiants auxquels on veut fournir des éléments cognitifs de base et, dans une plus large mesure, à toutes les personnes intéressées par les thématiques de la conservation *ex situ*. Pour cela nous avons cherché à transférer, en utilisant un langage le plus simple et direct possible, les recherches et l'expérimentation vécue des auteurs et toutes les informations tirées de la littérature scientifique disponible. Le manuel est structuré en 14 chapitres qui décrivent les méthodologies actuellement les plus utilisées depuis la récolte sur le terrain du matériel végétal, jusqu'à sa conservation. Viennent en annexes des fiches de travail, de terrain ou de laboratoire, de pépinière ou de culture, permettant la gestion et le suivi des lots de graines pendant tout le processus de conservation ; de telles fiches permettent en outre d'archiver des données dans un logiciel spécifique actuellement en phase de test.

Enfin, il a été élaboré un glossaire de termes techniques qui sera d'une aide fondamentale pour la compréhension du texte. Pour la nomenclature systématique, il est fait référence au travail récent de Conti *et al.* (2005) réalisé au *Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Università degli Studi di Roma, La Sapienza, su incarico del Ministero dell'Ambiente e della tutela del Territorio – Direzione per la Protezione della Natura*.

Ce travail ne se veut pas être un guide définitif, mais un outil dynamique et en constante évolution qui peut constituer une référence éthique et méthodologique commune à cet objectif.

Il est prévu une édition en réseau qui permettra les modernisations nécessaires. Des versions dans différentes langues seront réalisées par d'autres structures de recherche de divers pays communautaires. Nous laissons donc ouverte la possibilité d'intégration de quiconque veut fournir des contributions à ce travail dans le but d'en améliorer la qualité et l'utilité.

Les Auteurs

1. INTRODUCTION

Dans une définition simplifiée le *gemoplasme*¹ est considéré comme étant le matériel en mesure de transmettre les caractères héréditaires d'une génération à l'autre (Witt, 1985). En entrant plus dans les détails, on peut affirmer qu'il représente la base physique de l'héritage, ou bien la somme des gènes et des facteurs cytoplasmiques qui gouvernent l'hérédité.

Lorsqu'on parle de *gemoplasme*, on doit donc penser aux spores, pollens, tissus ou parties de plantes, cellules individuelles, ADN et ARN mais, surtout, aux graines qui représentent l'organe des plantes supérieures le plus employé pour les perpétuer et le matériel le plus largement conservé. Le terme '*gemoplasme*' est un néologisme composé des segments '*germe*', début, origine, et '*plasme*': matière capable d'engendrer une autre matière vivante égale ou semblable à celle de départ (Perrino et Terzi, 2003). En bref, le mot *gemoplasme* indique n'importe quelle forme de vie et peut se référer, en vertu des différents rangs taxonomiques, à un genre (ex. : *gemoplasme* d'*Olea*), une unité taxonomique spécifique (ex. : *gemoplasme* d'*Olea europaea* L.) ou un rang variétal (ex. : *O. europaea* L. var. *sylvestris* Brot.).

L'expression 'ressources génétiques' remplace souvent le concept de '*gemoplasme*' lorsqu'il se réfère contextuellement à plusieurs espèces ou genres (ressources génétiques végétales, ressources génétiques microbiennes, etc.).

Dès que l'homme développa l'agriculture, l'agriculteur-propagateur a su conserver les graines d'une récolte pour de prochains semis. L'idée de conserver des graines de différentes espèces dans des structures capables de garantir une viabilité à long terme est née au début du siècle dernier avec le savant russe Nikolai Vavilov (Koo *et al.*, 2004). La nation immense et pauvre qu'était la Russie, demandait à Vavilov d'augmenter les capacités des espèces destinées à l'usage alimentaire et industriel par l'amélioration génétique. Pour atteindre cet objectif, d'immenses collections ont été créées et aménagées scientifiquement, en presque trente ans; ces *gemoplasmes*, ainsi conservés *ex situ*, constituèrent une ébauche des procédures de conservation de la biodiversité végétale.

Les structures qui aujourd'hui conservent la biodiversité contenue dans le *gemoplasme* sont appelées les banques de *gemoplasme* (en anglais *genebanks*), ou bien banques de semences (*seedbanks*) si le matériel conservé est principalement constitué de semences.

Les échantillons récoltés qui sont introduits dans les banques de matériel végétal pour être conservés s'appellent techniquement 'accession'. Chaque accession représente l'entrée en banque d'un lot de matériel végétal concernant une récolte individuelle, pour une entité taxonomique, d'une population déterminée et qui est identifiée de manière non équivoque.

Il est important de souligner qu'il y a encore quelques années, l'activité des banques de graines était presque totalement axée sur la conservation des variétés agronomiques et de leurs parents sauvages respectifs. En effet, 90% de toutes les accessions présentes dans les banques de graines sont des espèces alimentaires et des plantes communes qui, à l'échelle mondiale, sont reproduites de manière intensive et représentent une importance économique fondamentale. La récente expansion des banques de graines ayant vocation à conserver la flore rare et/ou menacée d'extinction est la conséquence de la réalisation d'obligations spécifiques de conservation comme celles prévues par la Convention sur la Diversité Biologique. Pour ces banques les critères de rareté, de vulnérabilité et d'endémicité sont les premiers à être considérés dans le choix du matériel à sauvegarder et à régénérer, sans cependant omettre les entités habituellement considérées comme marginales, mais importantes dans leur contribution au maintien de

¹ *Gemoplasme* est un terme qui n'existe pas dans la langue française, il est remplacé par matériel végétal, ou de façon plus précise par Banque de semences.

la biodiversité. Grâce à des accords avec la FAO, il y a aujourd'hui 15 000 espèces de végétaux conservées grâce à l'activité de 1.300 banques de semences. Ce chiffre ne représente cependant qu'une petite fraction de la biodiversité mondiale et de nombreuses régions de notre planète n'ont pas encore entrepris d'actions de ce type. L'importance de conserver la diversité a été démontrée et est aujourd'hui une valeur acquise. Il suffit de considérer que la vie de tous dépend directement ou indirectement de la diversité biologique parce que celle-ci garantit l'existence et la persistance de conditions favorables pour l'environnement et pour l'évolution de la vie même (Perrino et Terzi, *op. cit.*).

1.1. Ethique et philosophie de la conservation *ex situ* et *in situ*

Depuis 10.000 ans et jusqu'à nos jours, le *gemoplasme*, et plus spécifiquement les graines, sont les organes de conservation utilisés par quiconque s'est occupé de conserver et de propager le matériel végétal afin qu'il ne disparaisse pas. Les banques de semences, dans un contexte moderne, sont un des meilleurs moyens de prévenir la perte de biodiversité génétique et donc de garantir un avenir aux espèces en danger d'extinction. Ces banques naissent, comme une grande partie d'autres structures, dans un but de conservation de la biodiversité, avec pour objectif de contrer la perte exponentielle des espèces due, au-delà des phénomènes naturels, aux activités anthropiques détruisant et polluant les milieux naturels.

Leur rôle n'est pas seulement de sauvegarder les graines des espèces en danger, mais aussi de préserver, avec les techniques de la conservation à long terme, les spores, les bois, les tissus et toutes autres structures qui constituent la biodiversité génétique de la planète. Dans ces centres sont aussi étudiées les meilleures stratégies à mettre en œuvre pour une future conservation *in situ* des espèces en danger d'extinction (Bacchetta, 2006).

Les premières banques, en ce sens, ont été créées au sein d'universités ou de jardins botaniques à la fin des années 50 aux Etats Unis. En particulier la première banque a été celle du laboratoire national pour la conservation des graines, installée en 1958 au sein du campus de l'Université d'Etat du Colorado (Hartmann *et* Kester, 1990).

Jusqu'à ces dernières années, les activités des banques de semences étaient orientées sur la découverte et sur la conservation, en général dans leur domaine et territoire de compétence, de la plupart des entités représentant la flore menacée et rare. Leur rôle était proportionnellement, presque exclusivement, dévolu à la conservation *ex situ*.

La création de collections très diverses et riches en espèces a généré cependant des problèmes de gestion de l'espace et de planification des activités des banques. Ceci a induit aussi une diminution des standards de conservation et, également une représentativité insuffisante des pools géniques relatifs aux unités taxonomiques récoltés, en ne prenant pas en compte la variabilité génétique inter et intra-population. Diverses familles et genres se sont, en outre, révélés difficiles à conserver et surtout à régénérer (ex. : *Orchidaceae*). Ainsi la conservation des espèces exotiques ou ornementales, souvent le résultat de récoltes effectuées pour la réalisation d'*Index Seminum* ou de collaborations avec d'autres organismes, a, dans quelques cas, modifié les objectifs de recherche des banques en pénalisant les actions de conservation de la flore autochtone.

Aujourd'hui l'expérience, mûrie par les années de travail et d'étude, permet de modifier en partie le vieux concept de conservation *ex situ*, en l'adaptant et en l'étendant aux réelles exigences du territoire et en l'orientant vers d'autres buts. La philosophie de la conservation s'est déplacée, surtout pour les *taxa* les plus en danger, vers l'activité *in situ* afin de préserver les plantes directement dans leur milieu naturel, en cherchant à limiter la récolte et en concentrant une partie des actions vers la sensibilisation et l'information. C'est pour ce motif que se sont multipliées les études sur la biologie de la conservation,

et les actions qui en découlent de la part des administrations orientées vers la conservation *in situ* (ex. : réseaux de micro-réserves pour la conservation de la flore). De cette manière, les propriétaires et les administrations locales ont été impliqués directement dans les activités de terrain, dans le suivi et dans la diffusion des connaissances.

L'activité de conservation *ex situ* d'aujourd'hui, se développe donc dans la création de collections, représentatives des différentes typologies d'habitats présents dans un territoire, à travers la détermination de la variabilité génétique existante et l'approfondissement de la recherche, même sur des entités normalement considérées d'intérêt marginal. En ce sens, la conservation *ex situ* doit s'envisager comme un moyen de grande utilité, indispensable pour coordonner les interventions *in situ* et dans les cas extrêmes, tels que l'extinction dans la nature d'une unité taxonomique, comme l'unique possibilité pour sa conservation.

Les critères de rareté, de vulnérabilité et d'endémicité sont inévitablement les premiers à être pris en compte dans le choix du matériel à sauvegarder et à régénérer, mais pas seulement. Les banques de semences agissent comme d'importants centres d'études concernant les *taxa* et leur représentativité dans l'habitat, éléments fondamentaux à prendre en compte dans la reconstitution d'aires dégradées ou fortement menacées. C'est dans ce contexte que, même les espèces pionnières, structurelles ou plus plastiques, sont prises en compte, conservées et régénérées. Le but n'est donc pas seulement celui de conserver en banque un grand nombre de graines d'entités rares, mais de connaître sous divers aspects le matériel végétal afin de garantir la conservation de la biodiversité d'un lieu.

Le matériel végétal conservé *ex situ* doit être utilisé pour développer les connaissances sur la biologie et l'écologie des entités et, plus particulièrement, sur leur cycle reproductif, pour en déterminer les points de force et de faiblesse et pour mettre au point *ex situ* toutes les stratégies à expérimenter successivement sur le terrain où il est prévu de reconstituer ou de renforcer les populations. Il est également fondamental d'élaborer des techniques de propagation, sexuées ou végétatives, pour assurer la conservation *ex situ* concrète et les régénérations suivantes.

Une précaution particulière doit donc être prise dans l'utilisation des semences pour l'exécution de tests de germination, de viabilité ou pour tous types d'études et d'analyses qui pourraient provoquer la destruction des graines.

Conserver du matériel végétal dans les banques de semences n'est pas comme conserver des livres dans les rayonnages d'une bibliothèque. Il s'agit de matériel vivant et dynamique dont la gestion ressemble plus à celle d'animaux dans un zoo ou aux précautions prises par un jardin botanique puisque les graines sont des entités vivantes et qu'elles nécessitent, pour se conserver bien et à long terme, des traitements et des techniques spécifiques (Koo *et al.*, *op. cit.*).

1.2. Information et participation

La délimitation de l'aire géographique de compétence des banques constitue un élément fondamental pour la détermination des programmes et des politiques d'intervention de celles-ci². Aux fins d'une gestion correcte du territoire et d'un travail cohérent de conservation et de défense de sa biodiversité, il est nécessaire de délimiter l'aire géographique de provenance des accessions en créant un réseau de contacts et d'échanges d'informations avec tous les organismes impliqués normalement dans la protection de la nature et dans sa valorisation (administrations locales, parcs nationaux et

² Les banques peuvent, aussi, concerner des catégories précises de matériel comme, par exemple, des espèces forestières, des spores de champignons ou de ptéridophytes.

régionaux, universités, jardins botaniques, laboratoires de recherche, associations, amateurs passionnés, etc.). Ce n'est que dans ce contexte que sont possibles la collaboration et l'échange du matériel végétal, des ressources financières ainsi que des connaissances spécifiques. Pour poursuivre cet objectif, chaque banque doit être structurée de façon à pouvoir garantir que le prélèvement de matériel se déroule dans le respect total de la réglementation en vigueur au niveau régional et national, ainsi que des principales législations et conventions internationales qui réglementent le secteur (§. 2.1 et 2.2). Pour cela, chaque banque porte son attention sur la formation et la mise à jour en continu, à travers la délivrance de permis et/ou autorisations appropriés, des connaissances culturelles et techniques de ses collaborateurs, en mettant en évidence l'objectif scientifique et conservatoire de la récolte (sauf les cas dans lesquels interviennent des conventions spécifiques).

Le rôle de la banque s'exprime également, au-delà de la diffusion de ses initiatives auprès du public, dans la création d'un réseau efficace de collaborateurs à divers niveaux, avec lesquels elle engage et alimente l'échange des connaissances et la mise à jour de l'avancement des travaux. L'implication des collecteurs suppose par conséquent l'information périodique sur les plans de gestion des entités fournies avec l'intention de les impliquer dans les objectifs des programmes et en les motivant pour une collaboration au long cours. À toutes les personnes impliquées, sont fournies les listes des entités botaniques d'intérêt local, les fiches spécifiques pour la récolte (§. 13.1) du matériel végétal et celles pour la caractérisation des populations (§. 13.3).

2. CADRE LEGISLATIF ET CONVENTION SUR LA PROTECTION DE LA BIODIVERSITE

2.1. Législation et conventions internationales

La protection de la biodiversité végétale est réglementée par des traités, des conventions internationales, des directives, des règlements communautaires et des lois nationales et régionales. Les principales réglementations à ce jour approuvées et ratifiées à divers niveaux sont chronologiquement énumérées ci-dessous.

2.1.1. Convention de Washington – CITES

La convention CITES (1973) "sur le commerce international des espèces menacées d'extinction", a été adoptée avec le Règlement (CE) n° 338/1997 de l'Union Européenne et ratifiée en France avec la loi n°77-1423 du 27 décembre 1977 ; les modalités d'application du règlement sont déterminées dans le règlement (CE) n° 1808 du 30 août 2001 (CE, 2001).

Dans l'Annexe I de la convention sont listées les espèces en danger d'extinction qui sont ou peuvent être menacées par le commerce ; l'Annexe II indique les espèces qui ne sont pas actuellement menacées d'extinction, mais qui risqueraient de le devenir si leur commerce international n'était pas réglementé ; L'Annexe III liste les espèces qu'un État réglemente sur son territoire et pour lesquelles il demande l'assistance de la communauté internationale afin d'en contrôler ses exportations.

Pour l'importation, l'exportation, la réexportation et l'introduction des espèces incluses dans les annexes susdites, il est nécessaire d'obtenir, pour chaque expédition, selon les dispositions des articles 3, 4 et 5 de la Convention, un certificat conforme aux dispositions de l'art. 6. Cette autorisation, émise d'une Autorité Administrative de l'État d'appartenance, a une validité de six mois à partir de la date de délivrance.

Avec le Règlement (CE) n°349/2003 du 25 février 2003, la Commission Européenne a suspendu l'introduction, sur le territoire de l'UE, (des exemplaires) des espèces de faune et flore sauvages inscrites dans les annexes. Ces dernières, mises à jour au 23 juin 2005, sont disponibles et téléchargeables *via* Internet à l'adresse <http://www.cites.org/>.



Figure 1 - *Gentiana lutea* L. subsp. *lutea* espèce protégée par la Convention de Washington. (photo: R. Guarino)

2.1.2. Convention de Berne

La Convention de Berne, "sur la protection de la vie sauvage et du milieu naturel en Europe", signée par les états membres en 1979 et ratifiée par la France en 1989, (Loi n°89-1004 du 31 décembre 1989), reporte dans l'annexe I la liste des espèces de flore sauvage strictement protégées, pour lesquelles la cueillette, le ramassage, la coupe et le déracinement intentionnel sont interdits (CEE, 1982). L'art. 9 de la Convention prévoit aussi que chaque partie contractante puisse concéder des dérogations à l'article 5, "(...) dans l'intérêt de la protection de la flore et de la faune ; pour prévenir des dommages importants aux cultures, bétail, zones boisées, réserves de pêche, eaux et autres formes de propriété ; dans l'intérêt de la santé et de la sécurité publique, de la sécurité aérienne, ou d'autres intérêts publics prioritaires ; pour des fins de recherche et d'éducation, de repeuplement, de réintroductions ainsi que pour l'élevage ; pour permettre, dans des conditions contrôlées, sur une base sélective et dans une certaine mesure, la prise, la détention ou autre exploitation judicieuse de certains animaux et plantes sauvages en petite quantité."

Les prescriptions de la convention de Berne ont été reprises par la Directive Habitats 92/43/CEE (§ 2.1.5).

2.1.3. Première Conférence Interministérielle pour la Protection des Forêts en

Europe

Dans le domaine des ressources génétiques forestières, la première Conférence Interministérielle pour la Protection des Forêts en Europe, qui s'est tenue à Strasbourg en 1990, a abordé la conservation de ces ressources et a incité à une prise de décisions collégiales à un niveau paneuropéen. En considérant le caractère transfrontalier des ressources génétiques, impliquant la responsabilité nécessairement partagée et l'efficacité importante de la conservation de la variabilité intra-spécifique, il a été possible de formaliser des stratégies communes envisageable avec cette philosophie. Une coopération technico-scientifique a donc été proposée à travers une série d'actions et de résolutions. En particulier la résolution n°2 concerne la conservation des ressources génétiques forestières qui se base sur les principes suivants

- application d'actions immédiates en considérant les ressources disponibles ;
- privilégier l'emploi de méthodes simples pour assurer leur application sur du long terme ;
- conserver tous les niveaux de variabilité génotypique ;
- souligner l'application de méthodes *in situ* complétées dans la gestion forestière, les compléter, si nécessaire, avec la conservation *ex situ* ;
- conserver des espèces ou des écosystèmes forestiers rares ;
- mettre en service, au niveau national, des mesures spécifiques pour la conservation des ressources génétiques sur la base des principes énoncés, en particulier en ce qui concerne les techniques de sylviculture et la gestion du matériel forestier de multiplication.

2.1.4. Convention sur la Diversité Biologique (CDB)

La Convention sur la Diversité Biologique, signée par 150 nations au cours de la Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement durable, qui s'est tenue à Rio de Janeiro du 3 au 14 juin 1992, représente la première initiative à l'échelle planétaire pour la conservation de la biodiversité. Elle définit les lignes directrices pour l'élaboration de stratégies communes orientées vers la sauvegarde d'entités animales, végétales et d'habitats, en introduisant les concepts de conservation *in situ* et *ex situ* (Williams *et al.*, 2003). Elle a été ratifiée par la France le 1^{er} juillet 1994.

2.1.5. Directive 92/43/CEE relative à la conservation des habitats naturels et semi-naturels, de la flore et de la faune sauvage

La Directive du 21 mai 1992 concernant la "conservation des habitats naturels ainsi que de la faune et de la flore sauvage, dite Directive habitats, faune, flore" a été publiée au Journal officiel des Communautés européennes du 22 juillet 1992. Elle se donne pour objet "d'assurer la conservation des habitats ainsi que de la faune et de la flore sauvage sur le territoire européen des états membres, y compris leurs territoires maritimes". Elle comporte plusieurs annexes parmi lesquelles :

- Une liste des habitats naturels (annexe 1) nécessitant la désignation de "zones spéciales de conservation" qui fait référence à une classification de l'ensemble des habitats communautaires connue sous le nom de CORINE biotopes.

- Une liste des espèces sauvages dont la conservation nécessite la désignation de "zones spéciales" de conservation (annexe 2) ; y dominent les espèces endémiques.

- Une liste des espèces d'intérêt communautaire qui nécessitent une protection stricte (annexe 4).

- Une liste d'espèces d'intérêt communautaire, dont le prélèvement dans la nature et l'exploitation sont susceptibles de faire l'objet de mesures de gestion (annexe 5).

La mise en œuvre de cette Directive fait l'objet, en France, d'une procédure particulière à laquelle la communauté scientifique française est associée par l'intermédiaire des "Comités scientifiques régionaux du patrimoine naturel", qui apportent leur appui scientifique aux Directions régionales de l'environnement chargées dans chaque région administrative de la mise en place de la directive.

Au plan national, la Direction de la nature et des paysages au Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable coordonne l'ensemble du projet avec l'appui scientifique de l'Institut d'écologie et de gestion de la biodiversité (ex Secrétariat de la faune et de la flore) du Muséum national d'histoire naturelle et de quatre comités scientifiques à compétences "biogéographiques".

Ces comités, dont les compétences territoriales concernent le domaine atlantique, le domaine méditerranéen, le domaine continental et le domaine "alpin" (en fait, l'ensemble des territoires d'altitude en France, principalement rencontrés dans les Alpes et les Pyrénées) sont chargés de veiller à la cohérence scientifique des propositions émanant des différentes régions administratives.

Ces mesures doivent aboutir à la réalisation d'un réseau écologique européen, que la Directive dénomme "Natura 2000".

Une autre convention existe, la convention alpine. Signée en novembre 1991 par les pays riverains de l'arc alpin, elle représente une déclaration d'intention pour la protection et le développement respectueux de l'arc alpin.



Figure 2 – *Brassica insularis* Moris, espèce de la DIR. 92/43/CEE. (photo: G. Bacchetta)

2.1.6. Directive 1999/105/CE relative à la commercialisation des matériels forestiers de multiplication

La Directive 105 introduit, dans le domaine de la problématique forestière, les concepts de "développement durable" et de "biodiversité" et prévoit que "(...) les États membres établissent une liste des régions de provenance précisant l'origine des matériels de base ; (...)"et que" (...) la démarcation des régions de provenance doit être indiquée par les États membres avec la rédaction et la publication de cartes appropriées (...)".

La règle, concernant plus de 70 espèces, s'applique à la production en vue de commercialisation et à la commercialisation même de matériel de propagation à des fins forestières.

2.2. Réglementation et mesures nationales

En France, au niveau national, la loi n°76-629 du 10 juillet 1976, relative à la protection de la nature, a été une étape décisive dans la définition des mesures de protection. Elle a constitué la pierre angulaire des actions des pouvoirs publics tant par son esprit que par ses normes visant :

- à la préservation de la richesse et de la diversité des habitats ;
- au maintien des équilibres biologiques, notamment en prévoyant de contrôler les introductions dans le milieu naturel ;
- à renforcer la capacité de reconstituer ou de reconquérir des écosystèmes détruits.

Dans cette finalité et pour clarifier la situation législative et réglementaire, le Code de l'Environnement a vu le jour en septembre 2000. Il rassemble tout ou partie de lois concernant

- la protection de la nature,
- la qualité de l'air et de l'eau,
- les industries et les activités polluantes,
- les déchets y compris les déchets radioactifs,
- la protection du paysage.

Il incorpore l'ancien Livre II du Code rural, réparti entre les Livres III (espaces naturels protégés) et IV (faune, flore, chasse et pêche) du Code de l'environnement. Au travers de ce Code, les espèces végétales sont protégées, directement ou indirectement, par la protection d'un territoire.

Concernant les espèces végétales sauvages, il existe 3 régimes de protection : protection intégrale, partielle, locale.

2.2.1. Régime de protection intégrale

Un Arrêté interministériel du 20 janvier 1982 (modifié le 15/09/1982 et le 31/08/1995) fixe une liste de 400 espèces végétales dans son annexe I. Cet arrêté a été complété par des Arrêtés interministériels fixant des listes régionales (22) y compris pour les départements d'Outre-mer (Réunion, Guadeloupe, Martinique).

Cette protection vise à interdire les activités qui menacent l'espèce : coupe, arrachage, cueillette, utilisation, vente, achat, destruction, transport, colportage, commercialisation. Cependant elle ne s'applique pas à l'exploitation des fonds ruraux ce qui limite son efficacité.

Des prélèvements exceptionnels à des fins scientifiques peuvent être autorisés par le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, à condition de ne pas mettre en péril les populations de ces espèces.

2.2.2. Régime de protection partielle

L'Arrêté interministériel du 20 janvier 1982 (modifié le 15/09/1982 et le 31/08/1995) fixe une liste de 27 espèces végétales dans son annexe II. La protection consiste à soumettre à une autorisation administrative certaines activités : la production, la détention, l'utilisation. Ce sont des espèces pouvant faire l'objet de récoltes soumises à autorisation.

2.2.3. Régime de réglementation préfectorale

L'interdiction ne concerne que le ramassage et la vente d'espèces menacées par une exploitation importante et visées par l'Arrêté ministériel du 13 octobre 1989 (complété par

un arrêté ministériel du 5 octobre 1992).

Le préfet du département (représentant de l'Etat au niveau du département) a la possibilité d'interdire ou de réglementer de façon permanente ou temporaire, la cueillette et la vente de ces espèces afin d'en permettre une exploitation durable.

2.2.4. Livres rouges nationaux

Ces documents administratifs ne sont pas des textes réglementaires mais permettent, dans une certaine mesure, d'optimiser les stratégies de conservation de la flore et d'évaluer les espèces patrimoniales françaises. Ils jouent un rôle primordial pour :

- l'identification, à l'aide de critères précis, des espèces particulièrement menacées pour le territoire concerné, permettant ainsi de focaliser les efforts de conservation sur ces espèces et leurs habitats ;
- l'identification des principaux facteurs de menaces, permettant de mettre en place des mesures efficaces pour endiguer ces menaces ;
- la synthèse et l'état des lieux des connaissances, à l'échelle du territoire concerné, en vue de mieux adapter les projets spécifiques de conservation, les plans de gestions et les programmes plus généraux d'aménagement du territoire, aux besoins biologiques et écologiques de ces espèces.

Le tome I du Livre Rouge de la flore menacée de France a vu le jour en 1995, il cite 486 espèces prioritaires.

Le tome II du Livre Rouge de la flore menacée de France devrait paraître prochainement, il traitera de 1332 espèces.

2.2.5. Stratégie nationale pour la biodiversité

En signant en 1992 la Convention sur la diversité biologique la France a mis en œuvre, à partir de 2004, une stratégie nationale pour la biodiversité. L'objectif étant de stopper la perte de la biodiversité d'ici 2010 en adoptant un plan d'action et de mise en œuvre opérationnelle.

Quatre orientations définissent les actions prioritaires à entreprendre :

- mobiliser tous les acteurs,
- reconnaître la valeur du vivant,
- améliorer la prise en compte par les politiques publiques,
- développer la connaissance scientifique et l'observation.

2.2.6. Charte de l'environnement

La France a engagé une action d'ensemble en faveur du développement durable entérinée par la Loi constitutionnelle n°2005-205 du 1^{er} mars 2005 relative à la Charte de l'environnement ; celle-ci a pour objectif à la fois la reconnaissance de droits mais également la proclamation de devoirs. En effet, elle porte au niveau constitutionnel des principes fondamentaux, à portée universelle, du droit à un environnement sain et à un développement durable. L'objectif pour mieux protéger et pour mieux prendre en compte l'environnement dans toute l'action publique, est de mettre à la portée du citoyen la possibilité de s'engager vers une préservation de l'environnement.

La charte de l'environnement est, en France, un texte à valeur constitutionnelle consacrant les droits de l'Homme et de la Société dans son Environnement. Ce texte a été préparé pendant quatre ans par une commission particulière qui a vu ses travaux enrichis par deux comités, l'un juridique, l'autre scientifique, pour valider ou invalider certaines hypothèses sans oublier l'apport indispensable d'une série de réunions

publiques organisées dans toute la France avec pour objet diverses thématiques liées à la Charte.

Le texte a ensuite été soumis à l'Assemblée Nationale et au Sénat en 2004, pour être finalement voté par le Congrès le 28 février 2005 et promulgué le 1er mars 2005.

Le Parlement, réuni en Congrès à Versailles le 28 février 2005, a entériné, par 531 voix contre 23, le projet de loi constitutionnelle qui introduit la Charte de l'environnement dans le préambule de la Constitution du 4 octobre 1958, installant par là même le principe de précaution au sommet de la hiérarchie des normes juridiques.

Description

La charte reprend un certain nombre de droits ou de principes déjà consacrés dans des textes à valeur législative ou le plus souvent dans des textes internationaux. Elle contient 10 articles.

Elle consacre un nouveau droit individuel, celui du droit de chacun à vivre dans un environnement équilibré et respectueux de sa santé (article 1er).

Une innovation juridique réside également dans la notion de devoir, celui de prendre part à la préservation de l'environnement.

La Charte porte au niveau constitutionnel d'autres principes, qui existaient déjà au niveau législatif, mais qui acquièrent ainsi une plus grande force. Par exemple la responsabilité écologique, qui englobe, en lui donnant une portée plus large, le « principe pollueur-payeur ».

Enfin, la Charte définit le principe de précaution. Le libellé de l'article 5 de la Charte est ainsi différent de la rédaction traditionnelle du principe de précaution, telle qu'on la trouve dans la déclaration de Rio ou en tête de notre Code de l'environnement.

Les effets de la charte dans l'ordre juridique français

Le Conseil constitutionnel s'est référé pour la première fois à cette Charte de l'environnement en jugeant que le législateur n'avait pas méconnu le principe du développement durable énoncé par l'article 6 de la Charte de l'environnement.

La Cour de Cassation examine actuellement les effets de la Charte. Elle doit définir comment les conditions d'exercice de tous ces principes doivent être définies par la loi, et apporter des recommandations sur les textes d'application de la Charte, pour mettre en cohérence les lois existantes. D'ores et déjà, les tribunaux de l'ordre judiciaire de première instance ont reconnu pleinement à la Charte ses effets, en premier lieu le droit de vivre dans un environnement respectueux de la santé conjugué au principe de précaution.

Le Conseil d'État devrait sans doute être la seconde juridiction suprême à interpréter le droit français au regard des principes constitutionnels de la Charte, sous réserve que certaines décisions des juridictions administratives lui soient soumises.

Les tribunaux administratifs ont déjà commencé à reconnaître la Charte. Ainsi, le juge des référés d'un tribunal administratif a reconnu qu'en adossant à la Constitution une Charte de l'environnement qui proclame à son article 1er que « Chacun a le droit de vivre dans un environnement équilibré et respectueux de la santé », le législateur a nécessairement entendu ériger le droit à l'environnement en « liberté fondamentale » de valeur constitutionnelle.

Les effets de la charte dans l'administration française

L'article 6 de la Charte de l'environnement donne une orientation incontournable : « Les politiques publiques doivent promouvoir le développement durable ». L'administration française doit par conséquent changer de culture et de mentalité pour passer de l'inertie institutionnelle à une dynamique concrète de changement en faveur du développement

durable sous toutes ses formes.

Comme l'indique l'action 21 du Séminaire gouvernemental du 23 mars 2005 qui visait à adapter les procédures administratives et politiques à la Charte de l'environnement, un document expliquant les notions juridiques essentielles de la charte à destination des administrations publiques a été élaboré. Un groupe de travail a été créé en vue de proposer des approches, des méthodes et les procédures nécessaires à la mise en œuvre du principe de précaution (article 5 de la Charte de l'environnement, précision de la notion de « risques graves et irréversibles ») par le Délégué interministériel au développement durable.

2.3. Dispositifs de protections et stratégies adoptées au niveau international

2.3.1. Liste Rouge et Bleue “International Union for Conservation of Nature (IUCN)”

Même si elle ne représente pas une forme de protection, la rédaction des listes rouges et bleues, selon les catégories IUCN, représente un moyen fondamental pour la protection de la flore. L'insertion d'un taxon sur ces listes permet, en effet, d'acquérir une grande quantité de données, de moyens pour entreprendre des mesures de protection appropriées. Selon les données à disposition un taxon peut être inscrit dans une des catégories suivantes (Pignatti *et al.*, *op. cit.* ; IUCN, 1994 et 2001) :

1. Eteinte (EX)
2. Eteinte à l'état sauvage (EW)
3. En danger critique d'extinction (CR)
4. En danger (EN)
5. Vulnérable (VU)
6. Quasi menacée (NT)
7. Préoccupation mineure (LC)
8. Données insuffisantes (DD)
9. Non évaluée (NE)

Les critères pour l'insertion de *taxa* dans les différentes catégories sont codifiés tant au niveau national que régional selon les standards internationaux de l'IUCN (2003a; 2003b).

Pour les îles méditerranéennes, une liste des 50 espèces les plus menacées en Méditerranée a été rédigée : "*TOP 50 Mediterranean Island Plants*" (de Montmollin et Strahm, 2005) (fig. 3).



Figure 3 – *Lamyropsis microcephala* (Moris) Dittrich et Greuter, espèce en danger critique d'extinction (CR) inscrite par l'UICN au "TOP 50 Mediterranean Island Plants". (photo: E. Mattana)

2.3.2. Global Strategy for Plant Conservation (GSPC)

Il s'agit d'un plan stratégique à un niveau global émané en 2002 (Décision VI/9), du Secrétariat de la Convention sur la Biodiversité (CDB) de l'ONU et d'*United Nations Environment Programs* (UNEP), en association avec le *Botanic Garden Conservation International* (BGCI). Parmi les divers objectifs, le plan envisage d'ici 2010, la conservation *ex situ* de 60% des espèces menacées, prioritairement dans le pays d'origine de ces entités, et l'initiation de projets de multiplication et de réintroductions pour 10% de ces espèces, pour 2010 (objectif 8).

La stratégie prévoit explicitement qu'aucune plante sauvage ne doit être mise en danger à cause du commerce ou d'une exploitation non durable et qu'au moins 30% des produits d'origine végétale proviennent de ressources gérées en mode durable. L'importance de la diversité végétale et la nécessité de sa conservation doivent être incorporées dans les programmes de communication et de sensibilisation de l'opinion publique.

Afin de poursuivre de tels objectifs, le GSPC encourage la création, ou le renforcement, de réseaux pour la conservation des plantes aux niveaux régional, national et international.

2.3.3. European Strategy for Plant Conservation (ESPC)

Adoptée par le Conseil de l'Europe en avril 2002, sur la proposition de *Planta Europa*, et comme contribution européenne aux compléments de la GSPC, l'ESPC recommande, pour l'Union Européenne toujours à l'horizon de 2010, de pouvoir à conserver *ex situ* 80% des espèces à risque de disparition. Cette stratégie prévoit en outre la conservation efficace d'au moins 10% de chacune des régions écologiques du monde et la protection d'au moins 50% des aires les plus importantes pour la diversité végétale.

En ce qui concerne les espèces exotiques, la rédaction de plans de gestion et leur mise

en place est souhaitée pour au moins 100 des principales entités envahissantes qui menacent les plantes, les communautés végétales et leurs habitats et écosystèmes.

Pour les végétaux et les champignons, il est nécessaire d'élaborer des programmes nationaux de suivi et, si besoin, d'en réglementer la récolte et le commerce, afin d'assurer leur pérennité. Même l'ESPC souligne que l'importance de la diversité végétale et la nécessité de sa conservation doivent être incorporées dans les programmes de communication et sensibilisation de l'opinion publique.

L'ESPC stimule la création ou le renforcement de réseaux pour la conservation des plantes à un niveau régional, national et international, à travers l'attribution de ressources économiques telles que les financements nationaux et internationaux pour les programmes de conservation, et un élargissement par l'utilisation des fonds structureux européens (Life, etc.).

2.3.4. Global 200

La conservation et la gestion du territoire à l'échelle du paysage ou de l'écosystème sont à la base d'une méthode connue comme une conservation écorégionale (*ERC, EcoRegional Conservation*) qui s'est rapidement affirmée comme une stratégie efficace, nécessaire pour la réalisation de résultats consistants et fonctionnels au maintien de la vie sur la Terre. La campagne dédiée à la promotion des contenus de cette méthode a été lancée par le WWF en 1996 sous le nom de "Global 200". Cette initiative a pour objectif principal la conservation du plus grand nombre d'espèces, communautés, habitats et processus écologiques caractéristiques des écorégions désignées.

En 2003 a été défini, un ensemble de 238 écorégions prioritaires aussi bien terrestres, marines et d'eaux douces, brièvement indiquées par Global 200.

Le maintien et la gestion correcte à un niveau global de ces 238 écorégions, peut garantir la sauvegarde de la plus grande aire possible en fonction de l'aire minimale nécessaire à sa conservation. L'objectif est donc celui de sauvegarder les aires de grande superficie qui conservent les meilleures conditions environnementales de conservation. En d'autres termes, chacune des écorégions de la liste de Global 200, identifie les écorégions les plus significatives de chaque type d'habitat, dans chaque dénomination biogéographique dans lequel on les trouve (Bulgarini *et al.*, 2003).

2.4. Accès aux ressources génétiques

Ces dernières années, une inquiétude particulièrement importante est soulevée quant à l'accès aux ressources génétiques, notamment à celles ayant un intérêt économique, actuel ou potentiel, ainsi qu'à la diffusion des bénéfices qui découlent de leur usage.

L'importance d'aborder ces sujets s'est manifestée lors de nombreux congrès et conférences. Dans le cas d'espèces agricoles le "Traité International sur les ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture", solution prometteuse née au sein de la FAO en 2001 (FAO, 2001), établit un système multilatéral pour faciliter l'accès aux ressources génétiques d'une série d'espèces agricoles et un mécanisme pour la distribution des bénéfices qui en dérivent.

En termes plus généraux la "Conférence sur la Diversité Biologique" de 1992, fixe comme objectif, au-delà de leur conservation et de leur utilisation durable, la participation juste et équitable des bénéfices qui proviennent de l'emploi des ressources génétiques.

Cette convention, dans son article 15, reconnaît la souveraineté des Etats sur leurs ressources génétiques. En même temps, elle recommande la création de conditions qui facilitent l'accès aux ressources aux fins d'utilisation écologiquement rationnelle, sous des conditions convenues mutuellement entre les parties contractantes, avec l'objectif d'assurer la participation aux bénéfices. En outre, chaque partie contractante est

encouragée à promouvoir et réaliser des recherches scientifiques centrées sur les ressources génétiques en collaboration avec les autres parties.

Dans le cadre de la CBD se sont élaborées les "Lignes Directrices de Bonn sur l'Accès aux Ressources Génétiques et sur la Participation Juste et Equitable aux Avantages Provenant de leur Utilisation", adoptées en 2002. Ces directives ont pour objectif la détermination de stratégies d'accès aux bénéfiques, au moyen de l'identification des étapes à suivre de cette méthode, des qualités fondamentales des termes des accords et de la participation et de la responsabilité des parties. Dans ce document il est traité, entre autres, des aspects tel que les incitations, les moyens de supervision et de vérifications des solutions aux controverses. Enfin, les directives proposent une série d'éléments prenant en considération les accords de transport du matériel, comme une liste de bénéfiques économiques possibles ou non.

Même si les Lignes Directrices de Bonn sont un moyen volontaire, il est constaté que leur mise en pratique de la part des centres qui gèrent les ressources génétiques, doit être encouragée puisqu'avec elles, s'établissent des relations transparentes et équitables, en renforçant la crédibilité des institutions et en facilitant la réalisation des objectifs de la CBD.

3. RESEAUX DE BANQUES DE MATERIEL VEGETAL

Actuellement les banques de matériel végétal dans le monde sont au nombre de 350, réparties essentiellement dans les pays industrialisés, surtout dans les pays anglo-saxons. En Europe, on en compte environ 150, quatre-vingt dans les pays nord européens et soixante-dix dans l'aire méditerranéenne ; ces dernières sont essentiellement en Italie, France, Grèce et Espagne (Bachetta, *op. cit.*).

Aujourd'hui, dans le domaine de la conservation *ex situ* de la biodiversité, chaque institution a mûri son expérience, élaborant des protocoles et des méthodologies différentes en fonction des ressources humaines et économiques et du matériel dont elle dispose. Suite à un développement toujours plus grand des thématiques relatives à la conservation et à l'exigence d'une collaboration toujours plus étroite et avec des échanges de matériel végétal, de données et de connaissances, il est devenu nécessaire de créer une coordination en réseau. En Europe, soit au niveau des pays, soit au niveau communautaire, sont présents différents réseaux nés de l'idée de coordonner les activités des banques de matériel végétal.

3.1. Réseaux nationaux

3.1.1. Réseau Italien de Banque de Germoplasme pour la conservation Ex Situ de la flore spontanée italienne (RIBES)

En Italie, on compte plus de 20 banques de *gemoplasme*, les plus importantes sont celles des jardins botaniques et universitaires de Cagliari (BG-SAR), de Catane, de Pavie (LSB), de Palerme, de Pise et de Rome, celle de la Province Autonome de Trente (TSB) et celle de l'Institut de la *Gemoplasma* de Bari, gérée par le *Centro Nazionale per le Ricerche* (CNR).

La première a été celle de *Lucca*, née il y a environ 30 ans de la collaboration avec l'Entreprise régionale pour le développement et l'innovation du secteur agricole. Dans cette banque sont conservées essentiellement des espèces d'intérêt agricole et en particulier des cultivars et de variétés horticoles et fourragères. Dans la banque de CNR de Bari a été conservé du matériel d'intérêt agricole et, seulement depuis peu, des

espèces spontanées, dans les autres banques au sein des jardins botaniques universitaires sont conservées à long terme et à basses températures, presque exclusivement, les espèces autochtones de la flore italienne. La banque de Pise est spécialisée dans la flore toscane et de l'Archipel Toscan, celle de Palerme conserve le *gemoplasme* d'espèces spontanées et cultivées de l'aire méditerranéenne, celle de Cagliari a concentré ses efforts sur la conservation des espèces de la Méditerranée occidentale insulaire (Bachetta, *op. cit.*).

Considérant le manque de lien institutionnel pour la coordination nationale de la conservation *ex situ* de plantes spontanées sur le territoire italien, quelques groupes engagés dans le secteur ont constitué un réseau national de banques de *gemoplasme*. Dans un premier temps, un protocole d'accord a été approuvé pour donner vie au "Réseau Italien de Banques de *gemoplasme* pour la conservation *Ex Situ* de la flore spontanée" dénommé RIBES ; Il s'occupe de projets, au niveau national, concernant les espèces à risque d'extinction et utiles pour les revégétalisations. Le protocole d'accord, signé à Pavie le 9 février 2005, a constitué une base à la définition formelle du réseau sous forme d'organisme ayant une personnalité juridique reconnue. Le réseau représente aujourd'hui une association scientifique, sans but lucratif, qui agit prioritairement pour la conservation *ex situ* de la biodiversité végétale autochtone italienne. Le statut de RIBES a été signé par les 18 associés fondateurs le 3 décembre 2005 à Trente (fig. 4).

Pour atteindre ses objectifs, RIBES a déjà élaboré un premier document d'action prévoyant l'amélioration de la qualité et de la sécurité des réserves de *gemoplasme* des espèces végétales spontanées d'Italie. Ce plan est réalisé par l'institution de groupes de travail dédiés à des domaines d'action bien précis tels que l'acquisition de *gemoplasme*, son traitement dans les banques, la gestion des données et les activités de formation, diffusion et vulgarisation.

Les groupes de travail se sont formellement constitués pendant la première assemblée ordinaire qui s'est tenue à Pise en Mars 2006. Ils fonctionnent en mode participatif, définissent les priorités d'actions au niveau national, déterminent les méthodologies de travail possibles, indiquent les standards de qualité minimaux pour les structures adhérentes et suggèrent les meilleures solutions à mettre en place en compatibilité avec les disponibilités en ressources humaines et matérielles (Bedini *et al.*, 2005).

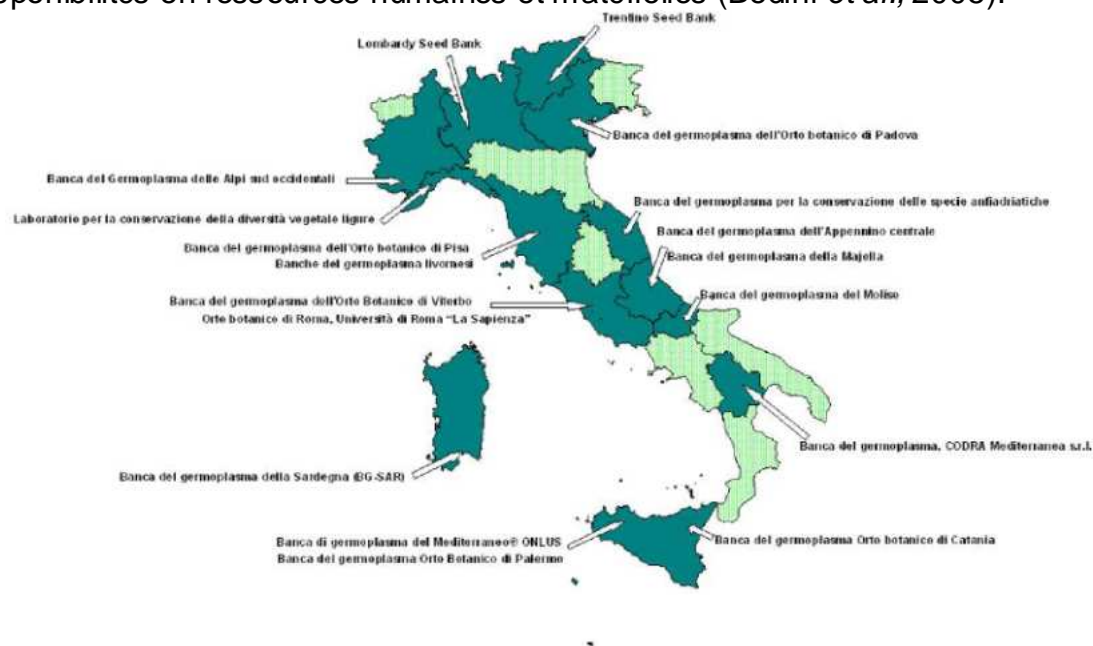


Figure 4 - RIBES: sites régionaux du réseau (la couleur foncée indique les régions pour lesquelles il existe une structure de conservation du *gemoplasme*).

3.1.2. Réseau Espagnol de Banques de Germoplasmes de Plantes Sylvestres

(REDBAG)

En novembre 1992 les membres de l'Association Ibéro- Macaronesienne des Jardins Botaniques (AIMJB) qui s'occupent de la gestion de *gemoplasme* ont créé, en collaboration avec le Département de Biologie Végétale de l'Université Polytechnique de Madrid, un "*Red Española de Bancos de Germoplasmas de Plantas Silvestres*" - REDBAG. REDBAG est ouvert à toutes les institutions qui gèrent des banques de *gemoplasme* d'espèces spontanées ou d'autres ressources génétiques végétales ; Les partenaires du réseau se divisent en trois catégories :

- Partenaires stables : institutions dont les banques conservent les graines des populations de la flore spontanée espagnole à moyen et à long terme à travers des structures et outils appropriés. Font en particulier partie de cette catégorie, les institutions suivantes: *Departamento de Biologie Vegetal UPM, BGVA de Andalucía et Jardín Botánico de Córdoba, Jardí Botànic de l'Universitat de Valencia, Real Jardín Botánico de Madrid, Jardín Botánico Viera y Clavijo, Real Jardín Botánico Juan Carlos I, Jardín Botánico le Concepcion, Jardín Botánico de Marimurtra et Jardín Botánico de Soller* (Hernández Bermejo et Herrera Molina, 2005).
- Partenaires en phase de consolidation : institutions dont les banques de *gemoplasme* sont encore en phase de développement avec l'aide d'un partenaire stable.
- Partenaires potentiels : institutions qui créent des banques de *gemoplasme* ou ont des projets bien définis en ce sens. Les institutions qui sont dotées d'une banque de *gemoplasme* mais n'appartiennent pas à AIMJB sont considérées comme partenaires invités.

Actuellement ce réseau n'est pas officiellement institué, ni reconnu au niveau national, mais œuvre activement pour la conservation *ex situ* de la diversité végétale et quelques associés participent à des projets internationaux tels "Genmedoc" (§. 3.2.1) et "Ensonet" (§. 3.2.2).

3.1.3. Réseau de Banque de germoplasme forestier espagnol

Le Ministère de l'Environnement espagnol, en synergie avec les administrations autonomes, a élaboré la "Stratégie espagnole pour la conservation et l'emploi durable des ressources génétiques forestières". Dans ce document est prévu, parmi d'autres actions et mesures, la création d'une "Banque de *gemoplasme* forestière en réseau", à laquelle peuvent adhérer volontairement les différentes institutions qui se consacrent à la conservation *ex situ*.

Le but est la conservation *ex situ* des ressources génétiques des espèces forestières, en créant des collections de base des différents matériels de reproduction, selon différentes stratégies, et en particulier : graines ou pollens, collections vivantes dans la nature ou d'autres techniques qui demandent un important support technologique, comme le maintien *in vitro* ou la cryoconservation. Dans le même temps cette banque de *gemoplasme* en réseau permettra l'approvisionnement en matériel nécessaire à d'éventuelles activités *in situ*, ainsi que la mise à disposition du matériel génétique indispensable pour les analyses génétiques et aux programmes d'amélioration, en accord avec des protocoles d'accès aux ressources génétiques qui seront déterminés.

La banque sera organisée comme un nœud virtuel, qui fera fonction de gérant du registre des accessions, de coordonnateur et diffuseur des différentes initiatives programmées. L'adhésion à cette structure se concrétisera à travers l'acceptation d'un protocole qui prévoit des standards de qualité et des obligations auxquelles les partenaires devront se conformer.

Il est en outre prévu la création d'un laboratoire virtuel pour l'évaluation des matériels forestiers de propagation destinés à un usage à court ou à long terme ; cette caractérisation concerne, entre autres, l'évaluation de la qualité extérieure des lots de graines ou la qualité des semences, la caractérisation moléculaire, etc.

3.1.4. Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français (FCBN)

Les premiers Conservatoires Botaniques Nationaux français ont été créés en 1990 ; au premier janvier 2004 leur nombre était de huit et les zones de compétence couvrent 78 départements du territoire national (fig. 5) Des projets de création de nouveaux Conservatoires sont à l'étude pour les régions Aquitaine, Poitou- Charente, Alsace-Franche- Comté- Lorraine et pour les Antilles. Le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable s'engage ainsi à compléter le réseau des Conservatoires afin de couvrir tout le territoire national. Depuis l'an 2000, ils sont réunis par une fédération qui coordonne et harmonise leurs méthodes de travail, anime les programmes nationaux de connaissance et de conservation de la flore et des habitats et apporte son soutien technique à la création de nouveaux Conservatoires.



Figure 5 – Le réseau des Conservatoires avec leurs régions de compétences.

Les articles D 416-1 et suivants du Code de l'Environnement précisent le rôle et les fonctions des Conservatoires Botaniques Nationaux, reconnus comme institutions à caractère scientifique qui poursuivent les objectifs suivants :

1. Connaissance de l'état et de l'évolution de la flore spontanée et des habitats naturels et semi-naturels. Ils effectuent des relevés et gèrent une base de données de la flore spontanée présente sur l'aire d'intervention avec l'objectif de classer ensuite par ordre hiérarchique le patrimoine naturel (au niveau régional, national et international). Ces informations sont indispensables pour la réalisation des politiques régionales et nationales de protection de la nature.
2. Identification et conservation des entités rares et menacées de la flore spontanée et des habitats naturels et semi-naturels. Ils élaborent et proposent des listes d'espèces protégées (spécialement au niveau régional), en suivant leur application

sur le terrain. Ils interviennent dans la protection *in situ* des espèces en proposant des mesures appropriées, juridiques ou contractuelles, pour protéger les plantes menacées dans leur milieu naturel. Dans le cadre de la conservation *ex situ*, ils mettent en place des techniques de conservation en pépinière et de conservation des graines (banques de graines) afin d'éviter la disparition des espèces les plus menacées et de disposer de stocks de graines dans différents buts (recherche, valorisation, réintroduction dans le milieu naturel, etc.).

3. Support technique et scientifique de l'État, de ses organismes publics, des organismes locaux et de leurs associations pour les thématiques relatives à la conservation de la flore spontanée et des habitats naturels et semi-naturels.
4. Informations et éducation dédiées à la connaissance et à la protection de la diversité végétale. Les Conservatoires publient des documents et mènent des programmes de sensibilisation et de diffusion publique sur la protection de la flore spontanée, soit vers le grand public soit vers un public spécialisé (administrations locales, catégories professionnelles, etc.).

L'agrément "Conservatoire Botanique National" est délivré par le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. Les candidatures sont examinées par la commission des Conservatoires. La qualification, accordée par décret ministériel pour une durée de 5 ans renouvelables, fait suite à l'approbation d'un cahier des charges que l'institution admise est tenue de respecter. La dénomination "Conservatoire Botanique National" est une marque déposée. L'autorisation est délivrée pour un territoire constitué d'un ensemble de départements qui présentent des caractéristiques biologiques et géographiques communes.

Cet agrément peut être révoqué si l'activité ou le fonctionnement de l'institution ne permettent pas le respect des objectifs fixés. Le contrôle s'effectue par la rédaction d'un rapport annuel d'activités et d'un document de programmation, présentés pendant la réunion d'un Conseil Scientifique. Les Conservatoires ont une connaissance détaillée et approfondie de la distribution des plantes spontanées, de leur biologie et de leurs exigences écologiques. La spécificité de leur action et la responsabilité qui découlent de leur agrément sont d'assurer, par tous les moyens possibles, le transfert de ces connaissances vers tous ceux qui interviennent dans la gestion du milieu naturel : état, communes, particuliers, services administratifs départementaux ou régionaux, organismes de gestion forestière, etc. L'objectif de leurs interventions est de mettre en évidence l'importance de la présence des plantes patrimoniales dans les opérations de gestion et la planification qui concernent le milieu naturel.

3.2. Réseaux européens

3.2.1. GENMEDOC

Le programme Genmedoc, "*Création d'un réseau de centres de conservation du matériel génétique de la flore des régions méditerranéennes de l'espace MEDOCC*", entre dans les actions communes, en matières environnementales de l'Union Européenne, pour la sauvegarde de la biodiversité et la conservation des espèces et des habitats. Ces objectifs sont atteints à travers l'échange d'informations techniques, l'adoption de stratégies et de protocoles de travail communs pour la conservation des ressources génétiques des *taxa* méditerranéens et principalement de ceux prioritaires présents dans les habitats de la directive 92/43/CEE.

Le programme Interreg IIIB "Genmedoc" se donne comme objectif prioritaire la constitution d'un réseau de centres de conservation du matériel végétal de la

Méditerranée occidentale. Au réseau "Genmedoc" se greffent différents partenaires européens permettant la couverture d'une grande partie de l'espace Medocc, y compris les plus grandes îles de la Méditerranée (Baléares, Sardaigne, Sicile et Crète) et un partenaire tunisien pour la rive méridionale. Les dix centres impliqués (fig. 6) sont : *Banc de Llavors Forestals (CIEF) della Regione Valenciana* ; *Centro Conservazione Biodiversità (CCB) del Dipartimento di Scienze Botaniche dell'Università degli Studi di Cagliari* ; Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles (Hyères) ; *Dipartimento di Botanica dell'Università degli Studi di Catania* ; *Jardí Botànic dell'Università di València* ; *Fondazione Jardí Botànic de Sóller (Iles Baléares)* ; *Mediterranean Agronomic Institute of Chania (Crète)* ; *Institut Botànic e Jardí Botànic de Barcelona* ; Institut des Régions Arides (IRA) de Médenine (Tunisie) ; *Dirección General del Medio Natural della Regione di Murcia*.

Les objectifs principaux du programme sont :

1. l'élaboration de modèles communs de gestion des *taxa* en combinant la conservation *ex situ* (récolte et conservation du matériel végétal) avec celle *in situ* (protection, récupération et compléments des populations naturelles) ;
2. l'échange des connaissances sur la conservation du matériel végétal (récolte, traitement, conservation et multiplication) ;
3. la duplication des collections entre les partenaires, pour garantir leur réelle conservation ;
4. l'étude des *taxa* dominants des habitats et de ceux endémiques rares ou menacés.

L'objectif final est de contribuer significativement au développement du réseau européen NATURA 2000 (plus de 300 espèces végétales sélectionnées et 40 habitats méditerranéens), créé pour la conservation de la biodiversité en Europe, en synergie avec les directives de la CBD.

Pour la sélection des espèces, il a été établi entre les partenaires des critères basés en particulier sur leur rôle structurel dans les biocénoses, leur singularité, et des paramètres comme la rareté et/ou l'endémicité et le niveau de protection ou le degré de menace.

Pour les espèces particulièrement intéressantes des protocoles de germination efficaces ont été élaborés, afin de garantir la possibilité de multiplication de ces espèces utilisable pour de possibles actions de renforcement des populations ou de réintroduction dans le milieu naturel. Toutes les informations relatives à ce programme, sur la biodiversité et en particulier sur la conservation *ex situ*, sont disponibles sur Internet sur le site officiel (<http://www.genmedoc.org>).

Ce projet a permis la naissance de coopérations interrégionales entre les partenaires, en favorisant la collaboration et l'échange de connaissances qui contribueront dans le futur à une réelle action de conservation de la flore menacée d'extinction.

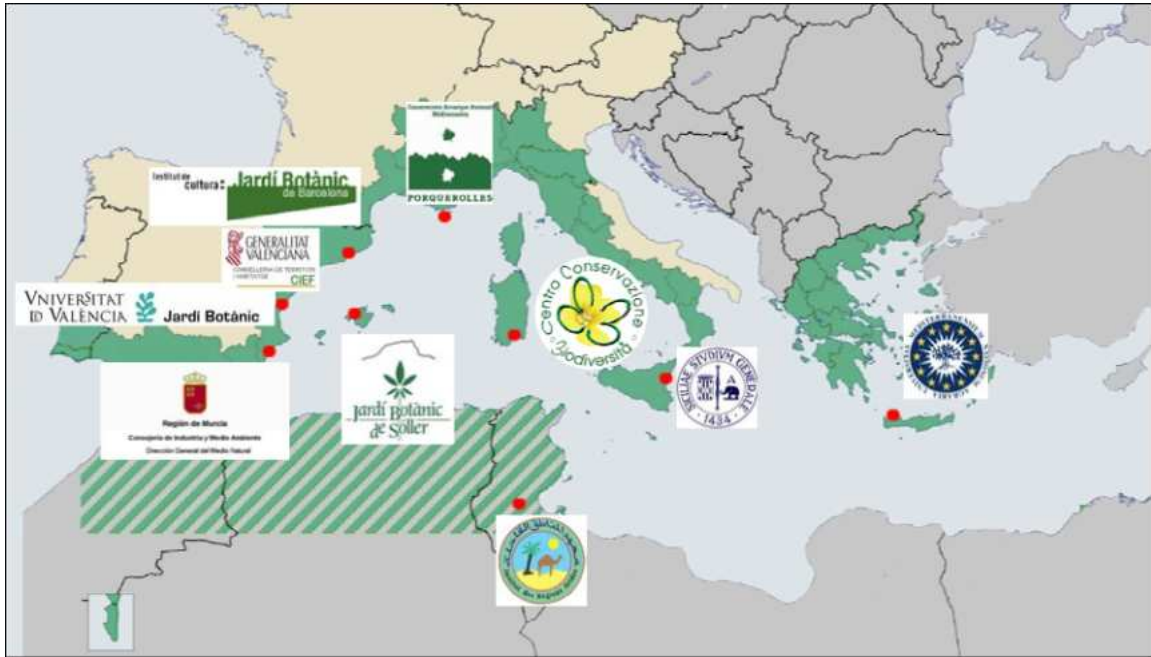


Figure 6 – Partenaires du programme Interreg IIB Genmedoc.

3.2.2. ENSCONET

Le réseau ENSCONET "*European Native Seed CO*nse^{rv}ation *NET*work" réunit quelques banques de semences européennes avec pour objectif de mettre au point des procédures opérationnelles communes, coordonner les efforts pour éviter des gaspillages et optimiser la gestion des ressources disponibles. Ensconet propose en outre d'assister la politique de conservation de l'Union Européenne dans ses obligations envers la CBD et GSPC à travers la protection des graines et en évitant l'extinction des espèces spontanées européennes.

Le projet est né grâce au soutien financier de l'Union Européenne à l'intérieur du VI Programme Cadre soutenant la recherche, par l'intermédiaire d'infrastructures exerçant des actions coordonnées (N. 506109/2003). Il comprend 19 instituts européens appartenant à 12 états membres, représentant 5 régions biogéographiques européennes. Le réseau est coordonné par le *Royal Botanic Gardens* de Kew et, est organisé en quatre groupes de travail dont les tâches sont les suivantes :

- analyser les collections existantes et déterminer les espèces et les aires peu représentées où il est donc nécessaire d'effectuer de nouvelles campagnes de récolte ;
- améliorer la qualité des pratiques de conservation des graines, en mettant en commun les structures et les connaissances acquises ;
- définir les principes de l'intégration des bases de données des différentes institutions ;
- diffuser les données produites.

4. RECOLTE DU MATERIEL VEGETAL

L'identification des priorités pour les espèces à échantillonner se fait en fonction des critères éthiques, des buts scientifiques des récoltes prévues et des nécessités techniques déterminées par la gestion d'un territoire.

Pour cette raison il faut préciser que les indications suivantes se basent sur les principes

de sélection des stations et les méthodologies de travail relatives à des espèces communes et/ou utilisées dans l'alimentation. Il est évident que ce genre d'activité est difficilement applicable dans le domaine de la conservation d'espèces rares, vulnérables ou fortement menacées. De toute façon, afin de présenter un panorama complet, il est important de préciser, qu'il est possible de se référer à ces applications pratiques et inviter le collecteur à toujours prendre en compte l'expérience acquise sur le terrain et à faire appel au bon sens et aux indications des gestionnaires des banques pour lesquelles il travaille normalement *in situ*.

4.1. Critères de sélection des stations

Les méthodologies de récolte appliquées par l'opérateur se révèlent d'importance cruciale puisqu'elles sont l'interface entre la variabilité génétique présente sur le terrain et sa représentation dans le lot qui entre à la banque (Namkoong, 1988).

Pour procéder à la récolte d'une population destinée à la conservation (*Royal Botanic Gardens*, Kew) une série de conditions relatives à la population doit être satisfaite, en particulier :

- la population doit être définie comme "génétiquement distincte" sur la base de paramètres tels que le sol, le climat, l'altitude, la pollinisation, et les barrières physiques à la reproduction croisée ;
- la population doit être sauvage, auto disséminée et non plantée ou cultivée ;
- dans la population il doit être possible d'échantillonner de façon aléatoire et uniforme au moins 50 individus ; exceptionnellement, dans le cas de populations extrêmement réduites, le nombre peut être inférieur ;
- dans la population il doit être possible de récolter entre 10.000 et 20.000 graines dans les temps convenus ; Exceptionnellement, dans le cas de plantes très menacées, de populations très réduites et/ou d'individus produisant peu de graines, la récolte peut être plus limitée ;
- les graines doivent être mûres, de préférence fixées sur la plante, mais presque prêtes à la dispersion ;
- les lots de graines ne doivent pas avoir de pourcentages élevés de détérioration, de prédation ou d'avortement.

Les critères de choix des stations se fondent sur des paramètres stationnels comme la distance géographique inter-populationnelle, l'altitude, le climat et les habitats, et aussi sur des paramètres de nature génétique visant à déterminer l'éventuelle variabilité génétique existante dans la population.

Avant de commencer les opérations sur le terrain il est donc nécessaire d'évaluer la disponibilité d'informations sur les caractéristiques ambiantes présentes et sur la distribution de l'espèce. Sur la base de ces connaissances il est préférable de diviser la zone en un nombre limité d'aires, en les distinguant du point de vue de l'écologie, des caractères stationnels et de l'usage du territoire.

Le choix des stations, visant à l'échantillonnage génétique, est applicable là où le *taxon* est présent avec un polymorphisme distinct, toujours en tenant compte de la présence/absence de barrières génétiques entre les populations et entre espèces semblables. Si l'espèce a été signalée dans de nombreuses stations, l'échantillonnage peut commencer avec un nombre de populations non inférieur à 50% ; si par contre l'espèce est extrêmement rare et que l'on connaît seulement un nombre limité de station, il est recommandé de procéder à l'échantillonnage de toutes les populations, toujours en respectant les limites dans le prélèvement (§. 4.2).

Quelque soit le contexte dans lequel on se trouve, la première chose à faire doit être une visite préliminaire des stations préconisées pour confirmer l'identification des *taxons* à

récolter, pour déterminer la possibilité de récolte et la période probable de maturité des semences.

4.2. Méthode d'échantillonnage

4.2.1. Echantillonnage génétique

Les stratégies d'échantillonnage d'une population dépendent de l'étendue de la variabilité génétique à l'intérieur de la population et de la diversité existante entre les différentes populations. En règle générale les populations qui ont une haute diversité sont génétiquement plus hétérogènes et méritent par conséquent d'être échantillonnées plus largement.

Pour échantillonner les ressources génétiques d'une certaine population, il est fondamental, dès le départ, d'évaluer la richesse en allèles ou le nombre des allèles distincts dans un seul *locus*. La richesse d'allèles d'un échantillon est définissable comme la mesure directe de sa qualité (Brown *et* Marshall, 1995). Pour les nombreux usages potentiels de la collection de graines que l'on veut créer, il est donc important de maximiser le nombre des allèles présents dans un échantillon, en récoltant la plus grande proportion possible de ceux représentés dans une population. L'objectif devrait être de récolter un échantillon ayant au moins une copie de 95% de tous les allèles qui sont présents dans cette population. Ceci devrait être assuré à travers la récolte de graines ou d'autre matériel végétal de 30 génotypes choisis au hasard dans le cas d'entité à pollinisation croisée ou de 59 individus choisis au hasard pour les entités autopolinisées (Brown *et* Marshall, *op. cit.*) si l'on dispose des connaissances spécifiques sur la modalité de pollinisation de ce *taxon*.

En sachant que la biologie reproductive de nombreuses espèces n'a pas été étudiée et que la récolte des allèles implique la conservation d'un nombre important d'échantillons, il est recommandé, lorsque c'est possible, d'échantillonner au moins 50% des individus dans le cas d'une population particulière. Ce nombre peut de toute façon augmenter avec la duplication de quelques échantillons, car on peut supposer que les graines ne sont pas toutes viables ou en excellentes conditions, ceci afin d'éviter une perte possible de matériel pendant le transport ou la quarantaine (Brown *et* Marshall, *op. cit.*).

Chaque accession arrivant dans la banque devrait être représentée par un nombre d'individus d'échantillonnage au moins supérieur à 50% de la population. Pour cela, un lot de graines récolté dans une population particulière devrait posséder les potentialités au rétablissement de la population dans les stations d'origine ou dans d'autres sites compatibles avec l'amplitude écologique naturelle du *taxon* et les caractéristiques génétiques de celui-ci.

Récolte de graines d'arbres et d'arbustes : considérations sur le maintien de la variabilité génétique

Les modalités d'approvisionnement en matériel de propagation d'espèces forestières et arbustives dépendent dans une large mesure de l'utilisation prévue pour ce matériel. Dans le cas de l'arboriculture forestière, là où les aspects productifs restent prioritaires, le phénotype des individus aura la plus grande importance. Il sera donc possible d'exercer une pression sélective considérable sur les individus destinés à la production de graines ou d'autre matériel de propagation (ex. : bouture), en préparant éventuellement des installations spécialisées comme des *arboretums* de récolte de semences. Si, au contraire, l'objectif de l'intervention est la sylviculture naturelle, ou encore mieux la restauration d'habitat, il sera fondamental de disposer de matériel caractérisé par une variabilité génétique élevée. Celle-ci, est en effet, étroitement corrélée avec l'adaptation

et est donc en mesure d'améliorer considérablement les probabilités de succès de l'intervention, et de contribuer à créer des peuplements stables et de haute valeur naturelle.

Les pertes de variabilité génétique sont vérifiables pendant toutes les phases de la filière, du peuplement d'origine au matériel à employer dans les reboisements : toutefois les périodes les plus critiques apparaissent comme étant celles de la récolte des graines, du travail d'installation et des prédispositions en pépinières (Ducci, 2003).

Naturellement, la variabilité génétique doit être considérée en fonction des conditions écologiques du milieu dans lequel on intervient : l'introduction de matériel végétal d'aires lointaines, surtout caractérisées par des conditions pédo-climatiques différentes, pourrait en effet se révéler néfaste, même si de fait cela induit un élargissement de la base génétique. Celle-ci n'ayant pas été soumise au crible de la sélection naturelle, pourrait s'adapter plus difficilement à un milieu différent de celui d'origine. À ne pas sous-estimer non plus l'effet possible de pollution génétique, à savoir la modification du *pool* génique des populations naturelles, résultat d'une longue évolution et donc sûrement mieux adapté aux conditions locales. Dans le cas d'activités de foresterie visant à la conservation *in situ*, l'emploi de matériel végétal autochtone de provenance locale est impératif. Les aspects écologiques qui revêtent une importance majeure dans la définition de l'adaptation d'une population semblent être, en premier lieu, les caractéristiques climatiques, surtout les températures. Un rôle important est également joué par les aspects topographiques tels que l'altitude et la latitude, alors que le type de substrat semble avoir une importance moindre (Monteleone *et al.*, 2005a).

Actuellement la situation apparaît préoccupante : la certification sur les origines des graines forestières et arbustives n'est prévue que pour les espèces les plus importantes, dans tous les autres cas le matériel employé est d'origine inconnue, souvent même importé de l'étranger.

Dans le domaine des espèces d'intérêt forestier le problème peut être résolu en recourant aux régions de provenance, introduites par la Directive de l'Union Européenne n° 1999/105/CE du 22 décembre 1999 et ensuite reprises par le Décret n°2003-971 du 10 octobre 2003 et ses arrêtés d'application. Les régions de provenance sont "*la région ou le groupe de régions régies par des conditions écologiques suffisamment uniformes dans lesquelles des peuplements ou des sources de graines présentent des caractéristiques phénotypiques ou génétiques similaires, compte tenu, le cas échéant, des limites altitudinales*".

Il reste toutefois le problème des modalités pratiques d'approvisionnement en matériel. Aujourd'hui, il n'existe pas souvent de critère bien codifié et la récolte se base presque exclusivement sur des considérations de productivité donc avec peu d'individus (les plus productifs, ou bien ceux les plus facilement accessibles), et le matériel que l'on obtient présente par conséquent une uniformité génétique élevée. Au contraire il serait nécessaire de récolter du matériel d'un nombre d'individus convenable, de façon à conserver les plus hauts niveaux possibles de la biodiversité présente dans le peuplement originel : à titre indicatif on peut considérer comme favorables aux récoltes les aires supérieures à 10 ha et des superficies proportionnellement supérieures pour les espèces que l'on trouve habituellement à l'état sporadique, tel noyer, cerisier, alisier, tilleul, etc. (Ducci *et al.*, 2001).

Les études scientifiques sur ce thème sont peu nombreuses. Il en ressort que le nombre de génotypes non apparentés, à utiliser pour la production de graines, ne devrait pas être inférieur à 30, bien que, lorsqu'il y a aussi des exigences de sauvegarde *in situ* de la biodiversité, ce nombre devrait être augmenté. Donc, l'échantillonnage devrait concerner des plantes suffisamment éloignées les unes des autres et ne devrait généralement pas s'effectuer sur des nouveaux individus que l'on trouve à une distance inférieure à 100-

200 m (FAO, 1995). Il est en effet évident que les procédés de dissémination tendent à faire naître à proximité de la plante de nouveaux individus issus des mêmes graines. Pour beaucoup espèces, en outre, les mécanismes naturels de propagation végétative (ex. : stolons) déterminent la présence d'un génotype unique (clone) entre des individus apparemment différents (Graudal *et al.*, 1995 ; Wilson *et Samuel*, 2003). Des résultats analogues proviennent de l'étude de l'*Università di Torino e del Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale* (Corps Forestier de l'État), qui a analysé les caractéristiques génétiques d'un arboretum de pin sylvestre constitué à partir de graines récoltées sur 19 plantes mères, mettant en évidence une réduction de la biodiversité sur la base de marqueurs biochimiques et moléculaires, que ce soit lors du passage de la forêt à l'arboretum ou lors de l'étape suivante de l'arboretum au matériel végétatif obtenu (Monteleone *et al.*, 2005b). Des conclusions semblables ont été obtenues dans le cadre d'une recherche analogue, dans laquelle était analysée l'installation d'un arboretum de *Farnia* en Lombardie pour en évaluer l'intérêt comme verger à graines. Des deux provenances utilisées, une a montré des pertes de variabilité génétique considérables par rapport au bois d'origine, tandis que la deuxième en a conservé des niveaux suffisamment élevés : il est concevable qu'une telle différence soit imputable au nombre différent de plantes porte-graines utilisées pour la mise en place du verger. (Castagna *et al.*, 2005). L'importance d'une récolte du matériel de multiplication destiné à des boisements et à des reboisements exécutée avec des bons critères (maintien de la variabilité et structure géographique de la diversité génétique), trouve confirmation dans l'étude menée par Burgarella *et al.* (2004) sur *Quercus ilex* L. en Andalousie, employant des marqueurs moléculaires dont les résultats mettent en évidence la réduction marquée de la variabilité dans les vergers par rapport à la population d'origine.

4.2.2. Choix des individus à échantillonner

La récolte au hasard est habituellement la plus valable. Il peut cependant arriver, surtout dans le cas d'entités autochtones, que la population naturelle développe des sous-populations ou de véritables métapopulations. Celles-ci seront à leur tour délimitées et récoltées au hasard et traitées comme des accessions séparées.

La récolte aléatoire implique, en outre, que chaque plante présente dans la population ait la même probabilité d'être incluse dans l'échantillon que toutes les autres (Marshall *et Brown*, 1983). Habituellement les collecteurs prélèvent en mode aléatoire ou en suivant des lignes de transect. Le point de départ et la direction des transects dans l'aire d'étude doivent être effectués avec attention afin d'éviter de concentrer le prélèvement dans un espace trop restreint avec des individus proches les uns des autres (Brown *et Marshall*, *op. cit.*). La distance entre les individus à échantillonner est fonction de la forme biologique de l'espèce et ne peut donc être utilisée comme un critère ou une méthode unique, mais comme un protocole spécifique à chaque espèce.

4.2.3. Nombre et type de matériel végétal par plante

Un autre point important consiste à déterminer la méthode de récolte et la quantité de matériel à prélever sur chaque individu.

La récolte des graines et des spores, contrairement à celle d'autres matériels végétaux, se distingue par son étroite dépendance au facteur temps. Elle peut se révéler parfois contraignante, surtout dans le cas d'entités encore peu connues et impliquer plusieurs sorties sur le terrain avant de procéder au prélèvement des fruits et/ou des graines ou spores au meilleur stade de maturité (Brown *et Marshall*, *op. cit.*).

La récolte d'autre matériel végétal est moins étroitement liée au facteur temps. La récolte

de bulbes, rhizomes ou de parties aériennes peut être conduite sans de strictes limites temporelles en opérant sur le terrain de préférence pendant les mois de repos végétatif. La quantité de matériel végétal à prélever est toujours fonction du degré de menace à laquelle est soumise l'entité ou sa vulnérabilité et sa rareté. Dans le cas de récolte de graines ou spores, le prélèvement doit être adapté à la disponibilité de matériel végétal produit par le peuplement dans les stations récoltées. La pression exercée par la récolte doit être calibrée au fur et à mesure et adaptée à l'évolution du peuplement. Pour cela la récolte doit se conformer à un protocole indicatif et il faut considérer, parmi les différentes options, la possibilité du non échantillonnage ou, au contraire, la récolte de tout le matériel végétal disponible.

Même la récolte du matériel végétal à d'autres fins, par exemple pour des analyses de biologie moléculaire, doit être effectuée dans les limites indiquées par le protocole utilisé et être acceptable pour la conservation *in situ* et les activités de recherche *ex situ*.

Normalement dans les récoltes de graines destinées à la production de semences, ou bien à la conservation *ex situ*, on ne constitue pas de lots séparés par individu, donc pour éviter de favoriser la présence de génotypes déterminants (ex. : les plus productifs, ceux placés dans des lieux particuliers, etc.), on devrait récolter une quantité équivalente de graines pour chaque individu.

4.2.4. Considérations à prendre en compte pendant la récolte

- En règle générale ne jamais récolter plus de 20% des graines disponibles le jour de la récolte, Afin de ne pas endommager la population par une récolte excessive. L'unique exception à cette règle est réservée à des situations particulières, par exemple la destruction certaine et imminente de la population.
- Pour les *taxa* particulièrement rares et/ou menacés, dans le cas où le matériel *ex situ* est disponible, de première génération (F 1) et exempt de phénomènes d'hybridation, il est possible de l'employer pour l'exécution des tests de germination nécessaires à la détermination de protocoles efficaces (germination et propagation) et de conserver, par contre, tout le matériel végétal récolté *in situ*, en le multipliant en suivant les protocoles établis.
- Une espèce trouvée seulement dans un domaine géographique très localisé, mérite d'être échantillonnée plus précisément, avec une augmentation du nombre d'individus pour chaque situation et un accroissement du nombre de propagules pour chaque individu. Idem pour les *taxa* très rares dont il est impossible d'échantillonner un nombre élevé d'individus ; dans ce cas on procède à une récolte dans plus de localités, en prélevant une grande quantité de matériel végétal de chaque plante.
- Les espèces qui croissent dans une large gamme de situations écologiques divergent plus facilement du point de vue génétique. Dans ce cas il est bien d'augmenter le nombre de populations ou des sous-populations à échantillonner, en les stockant séparément les unes des autres.
- Les populations d'espèces pérennes peuvent être constituées d'individus d'âges différents et posséder une structure dépendant précisément de l'âge du peuplement. Dans ce cas les individus devraient être échantillonnés de façon aléatoire sans tenir compte de la taille ou de l'âge pour augmenter la diversité génétique récoltée.
- Si l'espèce est régénérable végétativement il peut être utile de récolter, outre les graines, les autres parties nécessaires à sa propagation. Un tel type de régénération devrait être privilégié lorsque le *taxon* est en grand danger d'extinction.
- Les espèces synchrones du point de vue phénologique peuvent faire l'objet de récoltes simultanées, grâce à une planification précise des missions sur le terrain. D'autre part, lorsque l'époque de floraison est échelonnée sur une longue période,

tous les individus, à l'instant de la récolte, ne peuvent avoir leurs graines au même stade de maturité. La variabilité génétique de la population peut donc être influencée par des facteurs stationnels différents, par conséquent il est important de récolter des échantillons de nombreuses plantes dans diverses conditions de milieu et d'écologie.

- Il est nécessaire d'augmenter la récolte pour les espèces qui manifestent un polymorphisme élevé. Des populations d'espèces autogames peuvent avoir des sous-populations qui justifient une récolte au hasard.
- Dans le cas de pollinisation anémophile tenir compte de ce que les plantes portant plusieurs fleurs peuvent être pollinisées par des pollens de provenances différentes. Dans le cas de pollinisation zoophile la source du pollen peut, par contre, être la même pour des fleurs différentes (Brown *et* Marshall, *op. cit.*).

Une attention particulière doit être portée aux populations isolées et à celles des marges, parce qu'elles peuvent présenter des variations alléliques rares. Dans les zones de contact entre sous-espèces on peut relever d'importantes variations génétiques et morphologiques qui sont le résultat évident de l'hybridation et de la ségrégation. Les différents morphotypes doivent, autant que possible, être tenus séparés. Les collecteurs doivent par conséquent prêter attention aux aires et aux sites où il peut y avoir des transitions de *taxa*. Il est fondamental que les collecteurs indiquent tous les changements possibles dans la fréquence et dans l'étendue géographique des entités et proposent des explications aux changements survenus. (Von Bothmer *et* Seberg, 1995).

En résumé:

- Echantillonner, lorsque c'est possible, au moins 10 populations par zone éco-géographique homogène.
- Echantillonner, si possible, environ 50% des individus pour chaque population.
- Echantillonner de manière aléatoire, mais en séparant les métapopulations si l'habitat est hétérogène.
- Echantillonner suffisamment de graines ou de matériel végétal pour chaque plante afin d'en assurer une représentativité satisfaisante
- Randomiser la récolte sur la superficie en question et indiquer sur la fiche de terrain la méthodologie suivie (récolte au centre, en suivant une ligne diagonale, sur les bords, etc.).
- Tenir compte des différents paramètres stationnels (altitude, exposition, sol, pente, ombrage) pour diversifier, autant que possible, l'échantillon.
- Déterminer les phases phénologiques coïncidant avec les visites préalables aux stations de récolte au moment du prélèvement, en les indiquant sur la fiche appropriée. Ces informations permettront de réaliser un calendrier phénologique, suivant les variations dans le cycle végétatif année après année, et de gagner du temps lors des prochaines campagnes de récolte.
- Spécifier sur la fiche les questions et les doutes survenus pendant l'échantillonnage.

4.3. Récolte sur le terrain du matériel végétal

Pendant les opérations de récolte il est important de prendre en compte le stade de maturité des fruits et des graines, ainsi que leur position sur la plante. L'emplacement dans l'inflorescence peut, en effet, induire une maturité échelonnée des graines.

Par exemple pour *Pastinaca sativa* L. l'ombelle primaire mûrit environ 10-14 jours avant l'ombelle secondaire, qui mûrit 10-14 jours avant la tertiaire. Pour la population entière les graines sont dispersées naturellement dans une période de temps comprise entre août et

octobre (Hendrix, 1984).

L'observation des pollinisations peut également fournir des informations importantes sur la manière de récolter : différents pollinisateurs peuvent induire une maturité différente des fruits, de fait les graines se développent plus facilement sur des plantes dont les ovules ont été fécondés plus tôt que sur des plantes fertilisées tardivement (Lee, 1988).

Pour réduire le risque de perte de graines mûres la récolte devrait se dérouler pendant toute la période de dispersion des graines en enregistrant chaque récolte comme accession différente. La longévité d'un échantillon de graines qui parvient à la banque de semences est fortement déterminée par leur qualité au moment de la récolte, surtout pour les graines dites "orthodoxes" (§. 6.9.1).

L'idéal serait de prélever le même nombre de graines (ou de fruits) de chaque plante échantillonnée, au même degré de maturité, immédiatement avant la dissémination.

Les modalités de récolte des graines peuvent influencer les résultats des tests de germination menés en laboratoire et influencer sur la capacité de lever d'éventuelles dormances. Il a été montré que pour certaines espèces de telles variations peuvent dépendre de la position des graines à l'intérieur des fruits (ex. : graines basales plus dormante que les apicales) ou de leur distribution sur la plante (Toole *et al.*, 1964). Même le poids et les dimensions des graines peuvent influencer sur la qualité du lot et sur sa réponse aux tests de viabilité. Quelques *Poaceae* développent deux types morphologiques de graines : les grosses donnent des plantes plus vigoureuses et avec une capacité geminative importante par rapport aux plus petites (Lahiri *et* Kharabanda, 1961).

4.3.1. Détermination du moment idéal pour la récolte

Dans beaucoup de cas les graines ne peuvent pas être récoltées séparément et doivent être prélevées avec les fruits (fig. 7-9) qui les contiennent. De cette manière on évite d'interrompre le procédé de maturation physiologique encore en cours et on favorise l'acquisition, par les graines, de la tolérance à la déshydratation. En sachant que les graines produites par des fruits charnus indéhiscents et déhiscents sont, dans les premiers stades de leur développement, intolérantes à la déshydratation, la récolte doit être effectuée dans une phase ultérieure, lorsque la graine est devenue hygroscopique et donc tolérante à la déshydratation. La détermination de cet instant n'est pas facile. Lorsque l'expérience ne suffit pas, quelques indices sur le fruit (chamu ou non chamu) peuvent aider et fournir des indications sur la manière de procéder :

- Le changement de couleur peut être un bon indicateur, mais pas toujours fiable. Pour la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), par exemple, des baies de couleur différentes (du vert au rouge) peuvent contenir des graines au même degré de maturité (Ellis *et* Roberts, 1981).
- La taille du fruit dans la drupe est corrélée au complet développement de ses graines (Smith, 1995).
- Le durcissement du péricarpe de certains fruits se manifeste seulement après le développement complet de l'embryon.



Figure 7 – Fruits d'*Astragalus verrucosus* Moris en phase de maturation. (photo: E. Mattana)

Figure 8 – Semences d'*Helicodicerus muscivorus* (L. f.) Engl. (photo: L. Podda)

Les fruits chamus doivent être ramassés au stade de mûrissement optimal. La récolte anticipée, peut en effet, fournir du matériel de faible germination. La récolte tardive, par contre, peut causer des pertes dues à la dispersion naturelle, à la prédation de la part d'animaux et phénomènes météorologiques tels que la grêle ou des pluies intenses.



Figure 9 – Galbules de *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. et Sm.) Neilr. Pour une conservation correcte les semences doivent être extraites des galbules à leur arrivée à la banque. (photo: G. Bacchetta)

4.3.2. Test de la coupe

Après avoir déterminé la population à échantillonner, le collecteur devra examiner attentivement un premier échantillon de graines en employant l'épreuve de la coupe (fig. 10) et, pour les graines très petites, une loupe. Ces simples analyses préliminaires permettent d'estimer avec une bonne approximation la qualité du matériel, la fréquence des graines vides ou endommagées et l'opportunité de la récolte.

L'épreuve de la coupe est une méthode rapide qui peut être effectuée directement au moment de la récolte. Le test consiste, en se servant d'une lame ou d'un bistouri, à couper la graine à moitié : les graines de qualité élevée montrent des tissus gonflés, sains, avec une couleur typique pour chaque espèce (généralement blanc ou ivoire) et sans dommages de pathogènes ou d'insectes. Dans le cas de lots de qualité médiocre, on a souvent tendance à surestimer le nombre de graines saines (Suszka *et al.*, 1994).



Figure 10 – Test de la coupe pour une semence de *Pancratium maritimum* L (photo: E. Mattana)

Les difficultés liées à ces analyses préliminaires peuvent survenir dans le cas d'une expérience insuffisante de l'opérateur, ou bien lorsqu'on travaille avec des graines très petites (Piotto *et al.*, 2001). Dans cette situation, et même si la loupe ne représente pas une aide adéquate, on peut procéder à la récolte en utilisant des sachets respirants et en déléguant l'enquête de la qualité de la graine à la banque, où le test peut être exécuté avec par exemple trois répliques de 30 graines chacune (Crosti *et al.*, 2006).

4.3.3. Protocole de récolte

S'il y a suffisamment de graines aptes à la récolte, le protocole suivant peut être appliqué:

- Conserver les graines mûres et sèches en sachets de papier ou de coton.
- Conserver les graines entières, contenues encore dans les fruits, dans des enveloppes en papier.
- Conserver les fruits charnus directement en sachets plastique en favorisant l'aération : ils peuvent se décomposer rapidement et une mauvaise conservation peut être préjudiciable à la viabilité de leurs graines. En général le nettoyage des graines devrait être laissé au personnel de la banque.
- Prélever un échantillon d'herbier pour une détermination certaine.
- Pour les entités très rares et/ou menacées, répéter la récolte pendant deux ans, pour avoir l'assurance de récolter du matériel valable, ou bien réaliser plus d'échantillonnages une seule année, sans prendre l'échantillon d'herbier.
- La quantité idéale de graines viables à récolter devrait permettre que :
 - o un échantillon représentatif puisse être conservé dans la banque à long terme, pour éviter l'éventuelle disparition de la population et comme source d'études sur la génétique et la biologie de l'espèce, au moyen d'analyses quantitatives et qualitatives non destructives ;
 - o suffisamment de graines soient disponibles pour réaliser des tests de germination et de viabilité ;
 - o le suivi de la viabilité puisse être effectué périodiquement par la banque pendant la conservation ;
 - o une partie de la collection puisse être destinée à la production de lots pour la duplication des collections et pour les validations des protocoles de germination de la part d'autres banques et/ou de centres de recherche.
- Dans le cas où il est prévisible que la récolte puisse influencer négativement l'évolution démographique d'une espèce ou d'une population, déjà gravement menacée, celle-ci ne doit pas être effectuée. En conséquence, d'autres méthodes de multiplication doivent être privilégiées, compatible avec la forme biologique du *taxon* (ex. : multiplication *in vitro*, réalisation de boutures ou régénération au

moyen de la multiplication de matériel déjà présent dans d'autres banques).

4.3.4. Procédure type pour la récolte des semences

Ci dessous, sont énumérées les procédures relatives à la compilation de la fiche de récolte de matériel, ainsi mises en évidence dans les annexes (§. 13.1) :

- Identification du *taxon*;
- Dans le cas d'une confirmation d'identification à l'aide d'une flore de terrain, indiquer dans la fiche de récolte laquelle a été utilisée ; dans le cas où il n'est pas possible de déterminer avec certitude le *taxon*, cocher sur la fiche, la case "nécessité d'une régénération pour détermination" ;
- Délimitation des stations ;
- Dans le cas où les stations ont des dimensions mesurables, en vérifier les limites, l'étendue et la présence d'éventuelles micro-stations, en rapportant toutes les données stationnelles sur la fiche de récolte ; il est important de mettre en évidence, outre les informations à caractère géographique, la propriété et les éventuelles typologies de protection présentes ;
- Récolte du matériel ;
- Indiquer dans la fiche le nombre d'individus sur lesquels la récolte a été effectuée et le quantitatif de matériel prélevé par individu, ainsi que la typologie d'échantillonnage ;
- Terminer la compilation de la fiche en annotant tous les détails utiles à la banque ;
- Enregistrer le prélèvement de l'échantillon d'herbier.

4.4. Recueil des données et des informations sur le terrain : compilation des fiches

La caractérisation des populations est un moyen fondamental pour le diagnostic de leur état, et pour l'estimation de leur variabilité future (García, 2002) ainsi que pour la programmation et la gestion de la conservation *in situ*. En ce qui concerne la conservation *ex situ*, les résultats provenant d'études de la structure et de la dynamique des populations, associés à la connaissance de la distribution actualisée d'un *taxon* (comprenant sa modélisation de la variabilité génétique et de la biologie reproductive), permettent des échantillonnages plus efficaces et plus représentatifs du *pool* génétique du *taxon* que l'on veut conserver.

L'étude des populations sur le terrain prévoit l'acquisition d'une série d'informations et de données spécifiques qui permettent la connaissance de l'autoécologie d'un *taxon*. Pour garantir la comparabilité et l'homogénéité des données recueillies par les différentes banques, il a été prévu des fiches de terrain dont la compilation permet de recueillir et d'élaborer les données relatives aux stations des *taxa* concernés (§. 13). A chaque fois qu'une enquête spécifique est réalisée, la fiche correspondante doit être complétée.

Chaque fiche a une première partie relative aux données stationnelles et une seconde partie pour chaque type d'étude. La répétition des données stationnelles pour les accessions individuelles permet d'obtenir une meilleure précision avec la possibilité d'observer, dans le temps, l'éventuelle variation des paramètres physiques (ex. : altitude, superficie, etc.).

La disponibilité de ces données est fondamentale à l'élaboration de protocoles de germination de *taxa* endémiques ou pour lesquels il n'existe pas de données ou d'algorithmes publiés.

4.4.1. Equipement pour la récolte du matériel végétal et des données

Les équipements et les matériels nécessaires pour les activités de terrain (fig. 11) sont en grande partie assimilables à ceux normalement utilisés dans d'autres recherches de type expérimental et pour toutes les pratiques sportives extérieures à caractère naturaliste.

Ci-dessous est spécifiée la liste des équipements utiles pour la récolte du matériel, des données et de n'importe quel autre élément rendu nécessaire :

- carnet de terrain
- enregistreur vocal
- fiches de terrain
- *PC palm - Notebook*
- sachets de coton ou enveloppes en papier de différentes dimensions
- sachets en polyéthylène de différentes dimensions
- flacons en plastique (pour capturer éventuellement les parasites, pollinisateurs et butineurs)
- enveloppes de philatélie transparentes et respirantes
- ruban adhésif, élastiques
- étiquettes et petites cartes à insérer dans chaque enveloppe
- alcool dénaturé à 95° et glycérine
- formaldéhyde à 30% pour la récolte de matériel
- flore (ex. : Flora d'Italia, Pignatti 1982) et manuel de terrain (ex. : Flora dels Països Catalans, Bolòs 1984-1997)
- altimètre/baromètre
- thermomètre
- hygromètre
- inclinomètre
- pH-mètre
- GPS ou dGPS
- gants de jardinier en latex ou en cuir
- loupes avec agrandissement 10x ou 20x
- lames de rasoir/bistouri
- lames porte-objet
- couteau/paire de ciseaux
- tarière/piolet/pelle/pioche
- équipement d'escalade (casques, cordes, pitons, mousquetons, etc.)
- crayons/stylos/gommes
- appareil photo reflex ou compact
- jumelles
- feuilles de journal/buvards/presse de terrain
- récipients en plastique
- gel de silice pour conserver le matériel pour les études de biologie moléculaire



Figure 11 – Récolte des fruits d'*Anchusa formosa* Selvi, Bigazzi et Bacch. (photo: C. Pontecorvo)

4.5. Procédures à suivre dans des cas particuliers

4.5.1. Echec de la récolte du matériel

Dans tous les cas, remplir les champs fondamentaux de la fiche de récolte, en indiquant les raisons de l'échec du prélèvement et la façon d'y remédier (définir de nouvelles données de récolte, choisir d'autres stations, récolter un autre type de matériel végétal, etc.). Au cas où il serait nécessaire d'effectuer d'autres types de relevés, remplir les fiches appropriées (fiche phénologique, démographique, relevé floristico- sociologique, relevé pédologique, etc.) et les annexer à la fiche de récolte délivrée à la banque.

En cas d'échecs répétés de la récolte (conditions météorologiques défavorables, conditions phytosanitaires précaires, manque de matériel, etc.), on pourra procéder au prélèvement d'un échantillon de sol près d'un des exemplaires, (§. 4.5.6) ou, en cas d'infestation par un agent pathogène, d'un échantillon complet de la plante. Ce matériel doit être conservé dans des sachets en nylon avec une étiquette de reconnaissance.

4.5.2. Populations de dimensions extrêmement réduites

Lorsqu'une population est très petite (moins de 100 individus), si le matériel est suffisant et que la récolte ne met pas en danger cette espèce, il faut individualiser la récolte à chaque plante, en utilisant une enveloppe différente pour chacune. Le nombre de lots et l'indication de traiter séparément le matériel contenu dans chaque enveloppe doivent être inscrits sur la fiche de récolte. Ceci contribue à la conservation de la diversité génétique de la population.

Cette situation est fréquente lorsqu'on travaille avec des *taxa* endémiques ou à risque d'extinction, et que la distribution est limitée à une station ponctuelle, comme dans le cas, par exemple, de *Centranthus amazonum* Fridlender et A. Raynal et *Ribes sardoum* Martelli, présents exclusivement à *Oliena* (NU), dans la localité de *Sos Prados* ou dans le cas d'*Ameria belgenciensis* Donadille ex Kerguelen présente uniquement dans la localité de la Tourne-Morière sur la commune de Solliès-Toucas.

4.5.3. Données biotiques du peuplement

L'esprit d'observation du collecteur est un élément important dans la détermination des facteurs de dérangement ou des menaces pour l'espèce en question. Il devrait à chaque

occasion vérifier les conditions générales de l'espèce et des individus sur lesquels le matériel sera prélevé. En cas d'infestation d'insectes, de champignons ou d'autres agents pathogènes, il est nécessaire de prélever un échantillon de l'hôte et du pathogène, en ayant soin de le conserver en enveloppe fermée bien cachetée, tenue séparée du matériel sain qui pourrait subir des contaminations. Ce matériel peut aussi être conservé en éprouvettes en verre avec du formaldéhyde à 30% ou dans de l'alcool dénaturé et de la glycérine en proportion de 1:1.

4.5.4. Conditions météorologiques défavorables

Lorsque les conditions météorologiques sont défavorables (ex. : pluie, grêle, neige) on ne devrait pas procéder à la récolte ; en cas de pluie dans les jours précédant la sortie, on peut procéder à l'échantillonnage en évaluant attentivement l'état des graines et en particulier si celles-ci ont déjà été dispersées, très humides ou endommagées. Si c'est le cas, pour le matériel issu de la récolte, il sera utile de faire sécher les semences à l'air et non au soleil, et de le donner au plus vite à la banque.

4.5.5. Nécessité de récolter un échantillon d'herbier et/ou une plante vivante

Au cas où un échantillon de la population n'est pas présent en herbier, il est nécessaire de pourvoir à sa récolte. Les échantillons d'herbier devraient porter le numéro de référence correspondant à la collection de graines et, dans l'idéal, ils devraient être complets (fig. 12) et contenir des fleurs, des fruits, des parties végétatives et des racines (pour les plantes annuelles). Pour la réalisation d'un bon échantillon d'herbier il est suggéré, pendant des excursions longues, de traiter l'exiccata de la plante le plus rapidement possible, en utilisant du papier absorbant (papier journal) ou des feuilles de mousse (caoutchouc) et des presses portables. Lorsque cela n'est pas possible, les échantillons doivent être tenus dans des lieux secs, en changeant fréquemment le papier. Dans l'impossibilité de procéder au séchage, il est conseillé de presser le matériel d'herbier, de le conserver dans des sacs en plastique, en ayant soin d'asperger les échantillons avec de l'alcool dénaturé avant de sceller les paquets. Cette procédure est communément adoptée pendant les expéditions et les campagnes de récolte dans des lieux chauds et humides, spécialement en zone tropicale où les procédés de fermentation risqueraient d'en compromettre la conservation. Les échantillons d'herbier ne seront pas récoltés pour des espèces très rares ou menacées, surtout si elles sont bien connues au point de vue taxonomique.

Un autre procédé pour l'étude, la conservation et la multiplication du matériel d'un *taxon* consiste à récolter des plantes vivantes conservées en pots et en pépinière. Une telle collecte ne doit être effectuée que par du personnel spécialisé et uniquement si le prélèvement ne détruit pas ou ne réduit pas le potentiel biotique du *taxon* à l'intérieur du peuplement ; le procédé est très utile lorsqu'on ne connaît pas la biologie reproductive et la phénologie de l'espèce, ou lorsque l'échantillon permet la multiplication par voie végétative.

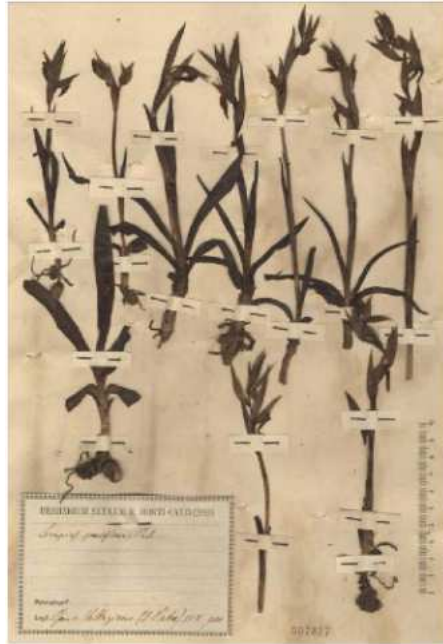


Figure 12 – Part d'un échantillon d'herbier de *Serapias parviflora* Parl. (collection Tornabene) disponible sur internet sur la page web du *Dipartimento di Botanica di Catania*.

4.5.6. Récolte d'un échantillon de sol

Parfois il est important de prélever, parallèlement à la compilation des fiches appropriées, un ou plusieurs échantillons de sol. Sur cet échantillon pourront être réalisées toutes les analyses physico-chimiques nécessaires à sa caractérisation. Les informations sur le sol contribuent à une meilleure définition de l'écologie d'une unité taxonomique déterminée. Pour obtenir une caractérisation complète il conviendra de déterminer la texture, le pH en eau, le pH en chlorure de potassium (KCl), les carbonates, la substance organique, le carbone organique, l'azote total, le phosphore assimilable, le pF (4.2 et 2,5), l'acidité globale, les bases échangeables, la saturation en bases et la capacité d'échange cationique.

Une fois ces données obtenues, il sera possible de procéder au classement des sols avec le *Soil Taxonomy* (Soil Survey Staff, 1998).

Les analyses permettant de déterminer la banque de graines du sol pour connaître l'abondance et la persistance des graines dans le terrain sont d'une grande importance pour les études à caractère écologique (§. 10.7).

4.6. Récolte de pollen

4.6.1. Introduction

Le pollen est un organe haploïde, se développant dans les cavités de l'anthere appelées locules. Ces locules sont recouverts d'un tissu éphémère, le tapis, dont la fonction est de nourrir et de régler le développement des grains (Pacini, 1997). Lorsque les grains sont physiologiquement mûrs, l'anthere s'ouvre pour exposer le pollen aux agents dispersants. Ce procédé d'ouverture est précédé d'une perte partielle d'eau de la part de l'anthere, les grains peuvent perdre également de l'eau avant, pendant ou après l'ouverture, (Pacini, 2000).

À l'instant de l'ouverture de l'anthere le pollen peut être :

- expulsé de l'anthere, c'est le cas pour quelques plantes anémophiles (ex. : *Morus*,

- Parietaria*) et quelques entomophiles dont certaines espèces du genre *Genista* ;
- dispersé dès l'ouverture de l'anthere, parce qu'il n'y a pas de mécanisme qui le retienne, comme cela se produit chez beaucoup de plantes anémophiles (ex. : *Poaceae*) ;
 - retenu dans l'anthere, par une substance visqueuse dérivée de la dégénérescence du tapis de l'anthere (Pacini *et Hesse* 2005), tant que la force d'adhésion du pollen à l'anthere n'est pas vaincue par le vent, ou qu'il n'est pas chargé incidemment par les animaux qui visitent les fleurs.

Dans ces trois cas le pollen, à l'instant de l'ouverture de l'anthere, est toujours subordonné à des variations de température et d'humidité relative. Si les grains n'ont pas de mécanismes de survie à ces stress ils peuvent perdre ou acquérir de l'eau, être envahis de moisissures et de bactéries, surtout lorsque l'humidité relative est élevée, et éventuellement mourir, plus ou moins rapidement.

Le temps et la distance entre l'ouverture de l'anthere et l'arrivée du pollen sur les sites d'atterrissage, sur le stigmate chez les Angiospermes ou sur la zone du micropyle chez les Gymnospermes, peuvent varier dans de larges proportions. Ils peuvent être de quelques secondes et de quelques centimètres pour des plantes sociales annuelles comme les *Poaceae* ; de quelques jours et de quelques kilomètres, dans le cas de nombreux arbres anémophiles comme les conifères ; de quelques jours mais sans grands déplacements, comme chez quelques plantes entomophiles peu nombreuses par unité de surface (ex. : *Orchidaceae*).

4.6.2. Catégories de grains de pollens

À l'instant de l'ouverture de l'anthere, il est possible de distinguer les grains de pollen selon diverses caractéristiques telles que : dimension, forme, structure, stade de développement, contenu en eau, mode d'agrégation.

Les dimensions des grains peuvent osciller entre 30 et 200 microns, avec de nombreuses espèces ayant des grains de 60-80 microns.

La forme des grains est communément ovale, quelquefois sphérique, il n'y a que rarement d'autres formes, comme chez beaucoup de monocotylédones marines ; chez *Posidonia oceanica* (L.) Delile ils sont en forme d'aiguille, longs de quelques millimètres et larges de quelques dizaines de microns.

La structure externe et interne du grain de pollen est importante pour sa reconnaissance. Deux parois de composition différente, l'exine et l'intine, déterminent la géométrie du grain et sont d'importants critères de distinction. En outre, la présence ou l'absence d'amidon à l'intérieur est souvent un caractère systématique (Franchi *et al.*, 1996). En effet pendant le développement il y a accumulation d'amidon, mais dans le pollen mûr cet amidon peut être totalement ou partiellement hydrolysé (Pacini, 1996). S'il est absent cela ne signifie pas qu'il n'existe pas d'hydrates de carbone de réserve, ceux-ci étant localisés à l'intérieur de vésicules cytoplasmiques et non d'amyloplastés (Franchi *et al.*, 1996). Dans les grains mûrs, il existe aussi des réserves solubles d'hydrates de carbone, surtout du glucose, du fructose et du saccharose (Speranza *et al.*, 1997). Le grain de pollen, selon le groupe systématique auquel il appartient, peut avoir terminé son développement avant la dispersion, ou bien celle-ci se produit pendant la croissance du tube pollinique. Les grains peuvent être trinudés ou binudés ; les premiers ont un développement complet et sont composés de deux gamètes mâles et une cellule du tube, les binudés, par contre, doivent encore diversifier les gamètes mâles par une division mitotique. Récemment il a été déterminé que, en analogie avec ce qui se produit chez les graines, il existe deux catégories de grains de pollen : ceux partiellement déshydratés, analogues aux graines orthodoxes, et ceux partiellement hydratés, analogues aux graines récalcitrantes (Franchi *et al.*, 2002 ; Nepi *et al.*, 2001 ; Pacini *et*

Hesse, 2004 ; Pacini *et al.*, 2006). Là aussi, comme pour les graines, c'est le 30% d'eau dans le pollen qui fait la différence entre les deux catégories. Les grains qui dans la nature deviennent partiellement déshydratés, avec un contenu d'eau inférieur à 30% résistent bien aux stress de température, d'humidité relative et se conservent facilement ; cependant ils germent plus lentement sur le stigmate, c'est-à-dire qu'il leur faudra toujours un temps supérieur au temps T. Les grains avec un contenu d'eau supérieur à 30%, ne supportent pas la déshydratation, cependant ils germent rapidement, même après quelques minutes, parce que la phase de réhydratation est très brève.

Lorsque l'anthere s'ouvre les grains peuvent se présenter pour la dispersion de différentes manières qui dépendent du type de mécanisme leur permettant de former une petite masse. Le terme "unité dispersante du pollen" désigne la configuration selon laquelle le pollen est dispersé. En effet les grains peuvent être dispersés individuellement, comme cela se produit chez beaucoup de plantes anémophiles, ou bien regroupés. Les quatre grains de pollen qui découlent des méioses peuvent se séparer, ou bien rester ensemble, formant une tétrade avec des parois en commun.

Treize types différents d'unités dispersantes du pollen ont été déterminés par Pacini *et Franchi* (1998). Les grains de pollen en monade ou en tétrade peuvent être dispersés en unités dispersantes plus complexes parce que tenus ensemble par des substances visqueuses comme les pollinies ou filaments adhésifs. Les grains de pollen peuvent, de ce fait, arriver sur le stigmate, seuls, en petits groupes ou en masses de quelques centaines de milliers, comme chez les *Orchidaceae*.

D'un point de vue génétique, plus le nombre de grains qui compose une unité dispersante arrivant sur le stigmate est élevé, plus important sera le nombre de graines à avoir le même père. A l'inverse, si le pollen est dispersé individuellement, il est plus probable que des grains proviennent de plantes différentes, donc de pères différents, arrivent sur le stigmate ; dans ce cas il y aura une forte compétition masculine (sélection gamétophytique).

Toutes ces caractéristiques directement ou indirectement sont importantes, pour les modalités de récolte du pollen et même, par la suite, pour sa conservation.

4.6.3. Pourquoi récolter le pollen

Le pollen est récolté dans un but de recherche ou d'applications (Hoekstra, 1995 ; Dafni *et al.*, 2004) ; les modalités de récolte et la quantité de pollen peuvent varier selon que ce soit :

- pour connaître la forme et le type de l'unité de dispersion ;
- pour vérifier son état d'hydratation, c'est-à-dire pour établir s'il est partiellement hydraté ou déshydraté et donc évaluer la possibilité et les méthodes de conservation ;
- pour contrôler s'il est viable, c'est-à-dire pour examiner son activité fécondante ;
- pour savoir s'il est formé de deux ou trois cellules, donc pour en évaluer le stade de développement ;
- pour le conserver et l'employer ensuite pour des recherches en biologie végétale ;
- pour l'expérimentation et la thérapie dans le domaine des allergies au pollen ;
- pour le conserver et ensuite polliniser des plantes d'intérêt économique, comme cela se fait pour les kiwis dont les fruits pollinisés abondamment sont plus gros et vendus à des prix plus élevés ;
- pour conserver le pollen d'une espèce déterminée.

4.6.4. Contrôle de la viabilité

Quelle que soit la raison pour laquelle le pollen est récolté, comme pour la graine il est bien de connaître sa viabilité, c'est-à-dire sa capacité à féconder. Cette caractéristique

est importante à l'ouverture de l'anthere, mais aussi au moment de la récolte et dans les éventuelles phases suivantes.

S'il s'agit d'un pollen partiellement hydraté, donc particulièrement vulnérable, il est bien de savoir combien de temps il reste viable lorsqu'il est soumis à des conditions de faible humidité. Il existe essentiellement cinq approches pour évaluer la viabilité du pollen ; pour cela des méthodologies différentes sont employées et fournissent des résultats indirects ou directs. Les résultats indirects sont ceux pour lesquels les données nous donnent à penser que le pollen est plus ou moins viable. Les résultats directs sont ceux qui résultent de la mesure de l'activité fécondante.

Ces approches/modalités sont rapportées ci-dessous :

- le pollen est analysé pour vérifier la présence et l'abondance de molécules qui sont impliquées dans le processus respiratoire, leur présence prouve que le pollen est vivant ;
- la coloration du cytoplasme ou de quelques molécules génériques indique leur présence ou leur activité métabolique ; ces caractéristiques n'assurent cependant pas que le pollen soit effectivement vivant ;
- le pollen est mis à germer *in vitro*, sur des supports solides ou liquides. Si les grains sont capables d'émettre des tubes, cela signifie qu'ils sont vivants ;
- le pollen est employé pour polliniser, la formation des fruits et le nombre de graines qui arrivent à maturité sont observés.

Cette dernière méthode est la plus fiable cependant elle demande des semaines, parfois même des mois. Les autres méthodes, par contre, permettent d'avoir des résultats en quelques heures, et quelquefois en quelques minutes. La méthode indirecte la plus employée est celle de la réaction fluoro-chromatique (Heslop-Harrison *et al.*, 1984). Cette méthode prévoit l'utilisation d'un colorant le "di-acétate de fluorescéine" capable de pénétrer à l'intérieur des grains de pollen. Dans leur cytoplasme la présence de certaines activités enzymatiques (estérases) permet la libération de la fluorescéine, le mélange fluorescent ne reste à l'intérieur du grain que si la membrane plasmique est intacte. Cette méthode met en évidence la présence d'enzymes actives et l'intégrité de la membrane plasmique. L'observation est faite au moyen d'un microscope équipé de lumière UV, les grains viables ayant accumulé la fluorescéine, apparaissent intensément fluorescents, alors que ceux qui sont morts ont une fluorescence faible ou nulle. Pour avoir des données incontestables et pour procéder à une analyse statistique, il est toujours bien d'observer au moins une centaine de grains et de faire au moins trois répliques.

Avec cette méthode on peut rapidement évaluer la viabilité d'un échantillon, pourvu que l'on ait à disposition un microscope à fluorescence. Dans le cas contraire, en disposant seulement d'un simple microscope optique à lumière visible, il est possible d'utiliser d'autres méthodes indirectes mettant en évidence l'activité enzymatique, comme les déshydrogénases et les peroxydases qui sont aussi simples et rapides, mais qui peuvent donner des faux positifs (Dafni *et al.*, 2004). Une autre méthode indirecte qui utilise le microscope à lumière visible est celle de Pàlfi *et Mihalik* (1985) qui, au moyen de colorant spécifique, met en évidence la proline, un aminoacide toujours présent dans les cellules vivantes.

Tous les grains de pollen ne conservent pas leur viabilité dans le temps, cela dépend beaucoup du contenu en eau et en hydrates de carbone (Pacini *et al.*, 2006). Ceux partiellement déshydratés se conservent normalement plus longtemps car ils sont capables de faire varier leur turgescence interne selon les conditions extérieures. Les mécanismes impliqués dans ce type d'homéostasie sont la polymérisation et la dépolymérisation de saccharose, de glucose, de fructose et d'amidon. Lorsque la température s'élève, il y a dépolymérisation du saccharose et de l'amidon, cela augmente la turgescence, et l'eau des colloïdes du cytoplasme ne s'évapore pas. Lorsque la température s'approche de zéro il y a également une augmentation de la turgescence,

dans ce cas pour empêcher la formation de cristaux de glace. La même augmentation de turgescence a lieu lorsque l'humidité relative diminue beaucoup et on évite ainsi l'évaporation. A l'inverse lorsque l'humidité relative est très élevée, même supérieure à 90%, la turgescence diminue par la polymérisation de glucose et de fructose en saccharose, ainsi que par la formation d'amidon à partir du glucose (Vesprini *et al.*, 2002 ; Pacini *et Hesse*, 2005).

Les grains de pollen partiellement hydratés sont normalement dépourvus de mécanismes homéostatiques pour lesquels une perte en eau entraîne une diminution de volume et meurent rapidement après l'ouverture de l'anthere, surtout s'ils sont conservés en milieux secs. Ceci a été mis en évidence avec des méthodes différentes sur *Cucurbita pepo* L., pour lequel la présentation du pollen aux agents dispersant dure seulement six heures (Nepi *et Pacini* 1993). Les *Poaceae* ont des grains de pollen partiellement hydratés et sont très difficiles à conserver longtemps. Naturellement leur viabilité se prolonge un peu s'ils sont conservés sous une forte humidité relative (Pacini *et al.*, 1997). Barnabas *et Rajki* (1981) ont mis au point une méthode pour conserver à long terme des grains de pollen de maïs en faisant diminuer très lentement leur contenu en eau. Toutefois cette méthode n'est pas communément employée.

4.6.5. Méthode de récolte

Selon que le pollen sorte de l'anthere dès son ouverture, ou bien qu'il y reste, les modalités de récolte sont différentes. Il faut savoir combien de temps après l'ouverture de l'anthere on doit effectuer la récolte des grains. Il faut donc déterminer le temps 0, après lequel quelques caractéristiques des grains peuvent changer, selon les conditions extérieures, surtout pour les grains de pollen qui sont partiellement hydratés (Pacini, 2000).

Le pollen, lorsqu'il tombe des anthères, est récolté sur des feuilles de papier paraffiné. S'il s'agit de plantes qui expulsent le pollen de l'anthere, ou s'il ne sort pas dès l'ouverture de l'anthere, il faut récolter des plantes ou des parties de plante avec des fleurs ou des inflorescences mâles, proches de la déhiscence de l'anthere, et les placer dans un vase centré sur une feuille de papier paraffiné, en cherchant à les orienter toutes à l'extérieur du vase. Cette opération est à faire le soir. Le matin suivant, si le papier ne se trouve pas dans un lieu où la lumière pénètre, il est préférable d'édairer le vase et les fleurs au moyen d'une lampe de façon à faciliter l'augmentation de la température et l'ouverture de l'anthere. Il est recommandé de récolter le pollen jour après jour et de répéter l'opération chaque soir. La récolte doit être faite dans une atmosphère dépourvue de courants d'air et de contaminants aéro-dispersants.

La même méthode peut être employée quand les anthères retiennent le pollen, par exemple par la présence de substance visqueuse. Les résultats sont bons si des fleurs coupées, comme pour les *Asteraceae*, sont renversées sur le papier. Egalement dans ce cas il est souhaitable de ne pas laisser plus d'un jour les fleurs dont on récolte le pollen, car on peut provoquer la libération de pollen encore immature.

Dans quelques cas on peut aussi récolter les anthères en coupant les filaments, spécialement s'ils sont longs, les laisser un peu de temps dans une atmosphère sèche qui facilite leur ouverture, et ensuite les passer au tamis avec des mailles à peine plus grandes que le diamètre du pollen. Dans ce cas le rendement est très bas, surtout si les grains sont entourés de substance visqueuse, en outre si les mailles sont trop grandes des filaments et des restes de l'anthere peuvent aussi passer.

Une méthode qui donne de bons résultats est celle qui consiste à employer une petite pompe aspirante pour récolter les grains en les absorbant directement de l'anthere à peine ouverte. Dans ce cas les grains sont récoltés dans une éprouvette qui servira par la suite à sa conservation.

Quelle que soit la méthode de récolte du pollen il est bien de contrôler sa pureté : c'est-à-

dire vérifier s'il y a des particules étrangères provenant de la plante même ou d'autres origines, ou du pollen étranger. Ceci est très important si par la suite les grains sont employés pour faire des sérums utilisés en allergologie (Cour et Loublier, 1980). Si le pollen est employé à des fins de recherche, il est nécessaire de tester aussi sa viabilité.

5. TRANSFERT DU MATERIEL VEGETAL

5.1. Conservation temporaire du matériel végétal

5.1.1. Conservation des accessions de semences récoltées sur le terrain

Les accessions de matériel végétal, ou bien les lots ou les échantillons récoltés sur le terrain doivent être conservés dans un lieu frais, sec et ombragé avant leur arrivée à la banque. Voici quelques recommandations à suivre pour une conservation correcte des accessions récoltées sur le terrain :

- Éviter absolument de laisser le matériel végétal dans la voiture ou dans n'importe quel autre lieu où les températures sont élevées. L'exposition à de fortes températures et au rayonnement solaire direct peut, en effet, endommager ou compromettre l'accession.
- Toujours maintenir une ventilation élevée autour du matériel végétal ; se servir exclusivement d'enveloppes de papier ou de sachets en coton (ou toile), en mesure de garantir une transpiration correcte.
- Toujours vérifier la fermeture correcte des enveloppes et des sachets afin d'éviter la perte et/ou la contamination du matériel végétal récolté.
- Fermer les enveloppes de préférence avec des épingles ou des agrafes ; si du ruban adhésif est utilisé, il faut avoir soin de l'appliquer seulement à l'extérieur de l'enveloppe. Dans le cas de graines très petites il peut arriver qu'à l'ouverture de l'enveloppe beaucoup adhère à la colle, devenant ainsi inutilisables.
- En aucun cas surgeler le matériel végétal avant de l'avoir délivré à la banque.
- Dans le cas de récolte de fruits charnus au juste degré de mûrissement, il est recommandé de bien les dépulper le plus rapidement possible après la récolte pour éviter des fermentations nuisibles à la germination. Cette opération devrait être accomplie à la banque, mais lorsqu'il n'est pas possible d'y livrer le lot immédiatement ou de procéder au nettoyage des fruits charnus, ceux-ci devraient être déposés au réfrigérateur à température basse (0-5°C).

5.1.2. Extraction des semences des fruits

Dans la plupart des cas, il est souhaitable de confier l'opération de nettoyage à la banque ou à du personnel expérimenté. Si les graines sont récoltées à maturité complète et sont contenues dans des fruits ou des capsules sèches, il est possible de procéder de manière rapide et soignée à l'ouverture des fruits et à l'extraction manuelle des graines, alors prêtes pour l'expédition.

Dans les fruits charnus la tolérance au séchage se manifeste tardivement dans le développement de la graine. Les indicateurs morphologiques de la maturité des fruits ne reflètent pas toujours celle des graines et celles-ci peuvent avoir des teneurs élevées en humidité interne. Il est recommandé, si l'arrivée à la banque est décalée de quelques jours, de disposer les graines en une couche fine sur du papier absorbant pour optimiser l'aération et leur permettre de se déshydrater et d'atteindre un équilibre avec les

conditions ambiantes environnantes. Ces dernières doivent être maintenues le plus stable possible, au moins en ce qui concerne l'humidité relative et la température, et être surveillées quotidiennement.

5.2. Arrivée à la banque

5.2.1. Acceptation des accessions

S'agissant de *taxons* spontanés, les échantillons fournis par les collecteurs sont la plupart du temps plutôt modestes et irréguliers quant à qualité. La banque accepte de toute façon le lot, même s'il est petit et pourvoit dans les années suivantes à développer le matériel de ces mêmes stations par la récolte ultérieure de nouvelles accessions. En revanche, lorsque les fiches de récolte et les éventuelles autres fiches de terrain ne sont pas annexées aux accessions, ou bien lorsqu'il n'est pas possible d'avoir la certitude de la détermination (ex. : absence d'échantillon d'herbier de référence, de données bibliographiques certaines, etc.), l'accession ne peut pas être acceptée.

5.2.2. Documentation à annexer à l'accession

Aux fins de recueil et de suivi des informations, une fiche de terrain spécifique a été réalisée pour la récolte du matériel végétal (§. 13.1). Elle doit être entièrement complétée et utilisée à chaque fois que l'on procède à un prélèvement de matériel référencé pour une seule entité, dans une seule station (ou micro-stations) et pour une date unique. À cette fiche la banque attribuera un code d'identification unique du lot, appelé "numéro d'accession".

Par conséquent, lors de la réalisation de la récolte du matériel, il est fondamental d'avoir soin d'indiquer, sur des étiquettes ou des vignettes, les données fondamentales pour pouvoir faciliter la reconnaissance de l'échantillon et limiter les doutes d'identification. La même procédure doit être suivie dans le cas de prélèvement d'un échantillon de banque de semence du sol.

Si le matériel provient d'autres relevés conduits *in situ* (des relevés floristiques, de végétation, démographiques, phénologiques et/ou de signalisations) il est nécessaire, outre la fiche de récolte du matériel végétal, d'annexer aussi une copie des autres fiches complétées sur le terrain.

En outre, l'échantillon sera toujours accompagné d'une liste récapitulative du contenu du colis, avec l'indication de tout le matériel récolté et une adresse complète du collecteur de façon à pouvoir le contacter facilement au cas où il serait nécessaire de lever des doutes de quelque nature que ce soit sur le matériel produit et au cas où un certificat phytosanitaire serait demandé (§. 5.2.3). Il est du devoir du gestionnaire de la banque de contrôler le contenu des enveloppes et d'en vérifier la correspondance avec la documentation annexée.

Lors de la compilation des fiches, des étiquettes et de la liste récapitulative suivre ces indications :

- ne pas employer d'abréviations dans les noms communs et les binômes scientifiques qui peuvent induire des erreurs d'interprétations ;
- écrire en clair et si possible en majuscule ;
- employer des crayons ou des stylos indélébiles ;
- éviter les ratures ou corrections qui peuvent rendre difficiles la lecture et la compréhension.

5.2.3. Etat phytosanitaire du matériel récolté

Le transfert de matériel végétal peut disséminer des pathologies ou des agents pathogènes. En conséquence, de nombreux pays ont élaboré une législation qui régit l'entrée et dans quelques cas la circulation interne des plantes.

La diffusion d'agents pathogènes peut compromettre sérieusement l'état de viabilité des graines récoltées et le matériel, en cas de multiplication, peut répandre l'infection à d'autres espèces ou d'autres territoires. Devant les risques encourus, il faut s'assurer de l'absence de pathologies et de l'état sanitaire de la population où le prélèvement est effectué, ainsi que des éventuels traitements auxquels a été soumis le matériel végétal (ex. : fumigations ou prétraitements fongicides ou insecticides). Il peut donc être nécessaire d'avoir recours à l'expertise d'un phytopathologiste ou d'un entomologiste (Frison *et* Jackson, 1995).

En général le risque de diffusion de maladies est plus important si elles sont véhiculées par les racines des plantes. Beaucoup d'agents pathogènes se nichent, en effet, dans le sol et peuvent être ainsi transportés avec l'échantillon prélevé. Pour les entités régénérables végétativement le transfert du matériel végétal *in vitro* réduit considérablement ce genre d'inconvénient. Les pathologies présentes dans le matériel végétal circulant doivent toujours être annotées, ainsi que les maladies présentes dans la région d'échantillonnage. Il est très important d'indiquer si les plantes sont saines dans une aire notoirement ou historiquement connue comme sujette à des infestations. Avant une éventuelle expédition du matériel à des fins scientifiques et conservatoires, il faut vérifier qu'il n'est pas nécessaire d'annexer un certificat phytosanitaire ; en effet, actuellement, les réglementations communautaires permettent la libre circulation du matériel végétal à l'intérieur de tous les territoires de l'Union Européenne, alors qu'il est prévu des certifications de provenance et un document phytosanitaire pour les pays tiers. En particulier l'Arrêté du 29 novembre 2005, (NOR : AGRG0502647A ; JO n°245 du 30 novembre 2005) applique la directive de la Commission du 15 octobre 2004, qui détermine les modèles de certificats phytosanitaires officiels ou de certificats phytosanitaires de réexportation qui accompagnent les végétaux, produits végétaux ou autres types de matériel biotiques provenant des pays tiers et énumérés dans la directive 2000/29/CE.

5.2.4. Modalités d'expédition des accessions

Ci-dessous, sont énumérées les règles générales, pour n'importe quelle destination de matériel végétal, utilisées par la banque de semences du *Royal Botanic Gardens* de Kew, prises à cet effet comme référence.

Les contenants des graines doivent être étiquetés à l'intérieur et à l'extérieur et doivent être fermés avec soin. Les emballages suivants sont recommandés :

- sachets en coton ou en toile;
- sachets en nylon transpirant ou en tissu de PVC;
- boîtes en carton résistantes, à l'intérieur desquelles sont déposés les sachets contenant le matériel.

Il est déconseillé d'emballer les graines dans des enveloppes ou des contenants non transpirants, en plastique ou PVC. Pour l'expédition des accessions il faut par conséquent procéder ainsi :

- emballer les graines seulement au moment de l'expédition ;
- annexer les détails inhérents à l'accession et le nombre de sachets contenus dans la boîte, en ayant soin de conserver une copie de ces informations ;

- employer du polystyrène ou autre matériel pour remplir les vides et limiter la mobilité du matériel végétal à l'intérieur de la boîte ;
- annexer le coupon d'expédition et en conserver une copie ;
- sceller les boîtes et les étiqueter avec l'adresse du destinataire et de l'expéditeur ;
- mesurer et peser les boîtes.

Les photos, les échantillons d'herbier et autre matériel utile peuvent ensuite être envoyés dans un second courrier.

5.2.5. Gestion des accessions provenant d'un autre centre

Les modalités de conservation et d'expédition des accessions dont il a été question jusqu'à présent, sont aussi valides pour le matériel qui n'arrive pas directement de la récolte *in situ* mais qui provient d'autres organismes qui agissent *ex situ*, par exemple une autre banque de semences, un jardin botanique ou une pépinière.

Il est important, pour la gestion correcte des accessions provenant d'autres centres, de recueillir toutes les informations concernant la gestion et les traitements que les graines ont subi avant l'expédition. La fourniture au gestionnaire de la banque, de l'historique du matériel reçu, de la photocopie de la fiche originale de récolte et des données pour pouvoir contacter les collecteurs et les gestionnaires est toujours de bonne règle. Même dans le cas où plusieurs lots ou entités sont expédiés il est préférable de dresser une liste du matériel contenu dans le colis. Ce sera le rôle du personnel de la banque de conserver et de gérer le lot en suivant les modalités les plus adaptées à chaque cas. Il faut annexer au lot arrivant à la banque les éventuelles fiches de récolte sur le terrain, les informations sur les traitements antiparasitaires, les modalités de conservation, l'existence de protocoles de germination ou de multiplication en pépinière. Dans le cas où l'on ne dispose pas de ces informations, il faut fournir une référence téléphonique, le courriel ou l'adresse de la personne qui a eu l'accession en charge avant son arrivée à la banque.

5.2.6. Gestion du matériel de la part de la banque

Une fois terminées les vérifications sur le matériel déposé et sur la documentation d'accompagnement produite, la banque devient responsable de la gestion correcte du matériel, en déterminant les temps et les modalités les plus appropriés pour le nettoyage, la conservation et la multiplication du matériel végétal, les actions de préservation dans le cas où il existe des conventions spécifiques.

Pour ce matériel, les gestionnaires de la banque vont évaluer l'opportunité de travailler sur le lot entier ou sur une partie du lot, en considérant les priorités déterminées par l'importance du matériel et la quantité disponible.

6. TRAITEMENT DU MATERIEL VEGETAL AVANT CONSERVATION

Dans ce chapitre, une procédure standard est restituée, issue des synthèses des protocoles de travail en usage dans les principales banques européennes de matériel végétal. Elle tient compte de l'expérience acquise par les banques de Sardaigne (BG-SAR, *Centro Conservazione Biodiversità* - CCB), Porquerolles (Conservatoire Botanique National Méditerranéen), Cordoue (*Banco de Semillas - Jardín Botánico de Córdoba*), Kew (*Royal Botanic Gardens, Millennium Seed Bank Project*) et Valence (*CIEF Centre d'Investigació i Experiències Forestals - Generalitat Valenciana*).

6.1. Entrée du matériel végétal dans la banque

Lors de l'introduction du matériel dans la banque de semences, et après avoir pourvu aux contrôles phytosanitaires nécessaires, on enregistre les informations dans la base de données et on vérifie la nécessité d'adopter des précautions éventuelles de manipulation, en l'indiquant dans la fiche de nettoyage et de conservation, dans la fiche annexée (§. 13.9). Dans les locaux affectés au stockage, il faut ensuite vérifier l'intégrité et la validité des semences récoltées, avec l'épreuve de la coupe dans le cas où ce test n'aurait pas déjà été exécuté sur le terrain.

L'enregistrement des accessions est une opération de routine fondamentale pour la gestion correcte du matériel végétal et pour la mise en route de toutes les procédures inhérentes au lot à son entrée. La banque contrôle la correspondance entre la liste des accessions fournies par le collecteur et les enveloppes annexées, en annotant les doutes et l'éventuelle absence d'envoi des informations.

Lors de l'enregistrement il est donc d'une importance fondamentale d'indiquer :

- Le nom du taxon ;
- le numéro d'accession du lot ;
- la date d'entrée dans la banque ;
- la qualité du nettoyage des graines ou le type de traitement auxquelles elles ont été soumises ;
- la provenance du lot, avec le nom de la station de collecte et le code/ nom du collecteur ou de l'organisme qui a fourni le matériel ;
- l'objectif ou bien le programme de référence pour lequel a été prévue et effectuée la récolte.

Le numéro de l'accession peut être un code alphanumérique. Par exemple, la Banque de semences des Alpes Sud-Occidentales, *Chiusa Pesio* (CN), a adopté un code ainsi composé : "NA/06/89" où NA est le Numéro d'Accession de la banque, 06 indique l'année de référence (2006), 89 est un nombre séquentiel qui s'incrémente à chaque fois qu'on ajoute une nouvelle accession. L'année suivante le code de l'année changera (07) et le nombre final continuera à croître. De cette manière le gestionnaire aura une indication intuitive de la provenance du matériel, de son ancienneté et de son numéro d'identification parmi les autres lots.

Pour le programme GENMEDOC (§. 3.2.1) le code d'accession se compose ainsi :

GM1234 SA01 00/00A

GM = deux lettres qui identifient le programme pour lequel la récolte a été faite ;

1234 = quatre chiffres qui correspondent au code de l'unité taxonomique sur laquelle a été effectuée la récolte ;

SA = deux lettres pour identifier le partenaire du programme ;

01 = deux chiffres pour le code de la population sur laquelle a été effectuée la récolte ;

00 = deux chiffres (année)/deux chiffres (nombre successif de récolte) pour identifier la récolte ;

A = pour identifier individuellement l'échantillon produit au moment du stockage après toutes les phases du traitement.

Ainsi le code GM0245SA010502 – A (voir fig. 13) identifie l'échantillon A de la deuxième récolte de 2005 réalisée dans la population 01 "Monte Lattias - Uta (CA)" du partenaire de SARDAIGNE pour le taxon *Anchusa formosa* Selvi, Bigazzi et Bacch. du programme

Genmedoc.



Figure 13 – Exemple d'étiquette automatique générée par la base de données Genmedoc.

Le numéro d'accèsion accompagne toujours le matériel végétal auquel il se réfère et permet d'en reconstruire l'historique, même après les tests de germination, la déshydratation, la congélation, l'envoi à d'autres instituts et l'éventuelle régénération en pépinière ou auprès des laboratoires de recherche. Toutes les fiches, les étiquettes, les relations, les analyses et les fenêtres des bases de données devront toujours porter ce code. À plus forte raison le code apparaîtra dans les documents en format électronique puisque sa présence facilite les tris et la manipulation des données. Il existe d'autres systèmes, tel le code barre, communément utilisé dans le domaine commercial, et actuellement employé par la *Banca di Germoplasma Onlus* de Palerme.

6.2. Quarantaine

Avant que le matériel récolté ne soit introduit dans les locaux de la banque, il est opportun de respecter une période de quarantaine, variable dans la durée, pendant laquelle le matériel végétal est stocké dans un lieu extérieur et isolé des structures de la banque. Une telle procédure permet d'évaluer l'état phytosanitaire du matériel récolté et en particulier de vérifier l'éventuelle présence de mycètes et de parasites phytophages ou nuisibles. En effet, il n'est pas rare de trouver dans des accessions parfaitement propres et traitées, une partie du matériel présentant des détériorations ou des organismes nuisibles en mesure de compromettre le matériel végétal (fig. 14).



Figure 14 – Semences d'*Astragalus nitidiflorus* Jimenez Mun. et Pau parasitées. (photo: E. Mattana)

6.3. Tests initiaux accomplis pour l'évaluation des lots à l'entrée

Si le lot le permet, on peut exécuter une série de test (germination, vitalité, calcul de l'humidité interne, calcul du nombre et du poids initial des graines, etc.) sur le matériel frais (fruits, graines fraîches, etc.) pour disposer de données utiles afin de prévoir la destination de l'accèsion, le nombre de répliques des tests et le nombre de graines par réplique, ainsi que le suivi de la productivité de la population. Les résultats de chaque

test sont enregistrés dans la fiche spécifique (§. 13.8) et annexés à la fiche de nettoyage (§. 13.9) et à toute la documentation relative à l'accession.

6.4. Fruits charnus

Les fruits charnus sont dépulvés manuellement et/ou mécaniquement (premier nettoyage), de préférence dans les 48 heures qui suivent la récolte, sous l'eau courante, dans le but de limiter l'apparition de mycètes et de procédés de fermentations qui pourraient réduire la capacité geminative des graines et en compromettre la vitalité. Dans le cas où il n'est pas possible d'effectuer rapidement le dépulpage, le matériel doit être conservé temporairement en chambre frigorifique à des températures comprises entre 0° et 5°C. Si, au moment de la récolte, les fruits sont trop déshydratés pour être dépulvés, ils doivent être plongés dans l'eau pour une période qui varie de quelques heures à quelques jours, afin de rendre plus faciles le nettoyage et la séparation des graines. Après le dépulpage les graines ne doivent avoir que seulement des impuretés de petites dimensions, sinon, il est nécessaire de recourir à un second dépulpage manuel (plus sélectif que le précédent) dans un récipient plein d'eau, là où il sera possible d'ôter les minuscules restes charnus. Les graines extraites des fruits sont épongées et mises à sécher pour une période variable d'un à sept jours selon la graine et les conditions ambiantes. On procède ensuite à l'élimination manuelle des restes inertes présents et à la déshydratation. Les méthodes utilisées pour les fruits non charnus sont spécifiées plus loin (§. 6.9).

Lorsque les quantités à traiter sont importantes, on peut utiliser des dénoyauteurs mécaniques.

6.5. Post-maturation

Par post-maturation on entend le procédé de mûrissement physiologique qui se déroule dans les graines et dans les fruits après leur récolte. La post-maturation est nécessaire aux graines immatures pour acquérir une capacité de germination (Schmidt *et* Jøker, 2001).

En effet, au moment de la récolte, malgré les observations attentives, il est fréquent de recueillir des graines à divers degrés de maturité. Afin d'obtenir un échantillon homogène la période de post-maturation permet d'amener à maturité les graines aptes à se développer. Pour ceci, le matériel est conservé temporairement dans des récipients en plastique, carton, aluminium ou acier (fig. 15) pour une période variant habituellement de quelques semaines à un mois maximum en fonction du taxon (en ayant soin de dépulper les fruits charnus). La température ambiante doit être maintenue en dessous de 20°C et l'humidité relative inférieure à 40%. Pour des périodes de stockage supérieures à un mois il est opportun d'abaisser ultérieurement la température. Le risque encouru est celui d'accélérer le procédé de vieillissement de l'échantillon, ceci peut induire une difficulté d'interprétation des tests de germination et une conservation réduite dans le temps.

Pendant cette étape le matériel stocké, précédemment débarrassé des impuretés (brindilles sèches, feuilles et détritrus de sol), n'est pas manipulé. De cette manière les graines ne se déshydratent pas rapidement. D'après les données des conditions de récolte et du type de fruit une indication approximative sur la date à laquelle les semences pourront être manipulées est indiquée. Le matériel, réparti de façon homogène sur le fond des récipients précédemment cités, est remué tout les 2-3 jours pour assurer une uniformité de traitement et favoriser une meilleure aération et une déshydratation conséquente, les récipients étant couverts d'une toile à mailles très fines de façon à éviter la contamination avec des graines provenant d'autres accessions.



Figure 15 – Lots de semences en post-maturation dans les locaux de la *Banca del Germoplasma della Sardegna* (BG-SAR). (photo: L. Podda)

6.6. Modalités de nettoyage

Pour avoir des graines avec les qualités requises, une petite quantité est nettoyée pour être testée afin d'estimer le pourcentage de germination et la valeur du matériel récolté. La procédure de travail sera considérée valide et les graines pourront continuer à être manipulées, si le pourcentage de germination est supérieur à 50%, excluant les cas pour lesquels l'entité présente une difficulté d'obtention de semences dans des quantités suffisantes, ou que la population soit en risque d'extinction ou bien que la germination naturelle de l'espèce soit très basse.

Les résultats du test de germination à l'arrivée ne sont toutefois pas facilement comparables avec les tests exécutés sur du matériel déshydraté et/ou conservé, lorsqu'au moment de la récolte les graines ne présentent pas toutes le même degré de maturité (ex. : *Fabaceae*) et nécessitent une période de post-maturation.

La qualité du lot à l'arrivée peut être estimée soit des observations directes (couleur, dimensions, présence de parasites), ou par l'exécution de test de vitalité comme l'épreuve de la coupe dans le cas où celle-ci n'a pas été effectuée sur le terrain au moment de la récolte. Les impuretés restantes comme la poussière, les restes résineux, les graines vides ou avortées, les graines parasitées par les insectes et/ou attaquées et que l'on ne peut conserver sont éliminées. Les opérations nécessaires à cette phase de travail peuvent être exécutées mécaniquement, manuellement ou en combinant les deux.

6.6.1. Extraction manuelle

Dans de nombreux cas l'usage de techniques mécaniques provoque des dommages aux graines, en les exposant à des infections fongiques et à la détérioration des téguments. L'intervention manuelle, bien qu'elle soit particulièrement dispendieuse en temps de travail, est presque toujours nécessaire pour désarticuler les fruits ou l'infrutescence. La technique manuelle utilise généralement un soubassement de plastique souple sur lequel sont posées de petites quantités de fruits ou d'inflorescences. Un opérateur, à l'aide de tampons de bois (revêtus du même matériel plastique utilisé pour le soubassement), exerce une force plus ou moins perpendiculaire au plan de travail, permettant d'émietter et de fractionner les graines des organes floraux ou fructifères, qui peuvent être séparés à l'aide de tamis d'ouvertures variables (fig. 16).



**Figure 16 – Batterie de tamis utilisés par la *Banca del Germoplasma della Sardegna* (BG-SAR).
(photo: E. Mattana)**

Dans les cas où cette technique n'est pas applicable, le travail peut être exécuté manuellement avec l'emploi d'outils et/ou de moyens de laboratoire (ex. : pincettes, pointes, etc.). Lorsque par contre la dimension des graines est très petite ou même microscopique (ex. *Plumbaginaceae*, *Scrophulariaceae*, *Orchidaceae*) l'utilisation d'outillage ne permet pas de séparer les graines des très petites inflorescences et cela rend nécessaire l'emploi de moyens optiques comme le stéréoscope et les lentilles d'agrandissement.

6.6.2. Extraction à froid

Cette technique est utilisée pour les genres *Abies*, *Cedrus* et pour certaines espèces du genre *Pinus*, avec des procédures caractéristiques pour chaque espèce. Au terme de la post-maturation, les bractées des cônes s'ouvrent de façon prononcée et la graine peut être extraite avec de simples pincettes. Puisqu'il s'agit d'espèces riches en résine, il est nécessaire d'attendre que celle-ci sèche avant le criblage. Le passage au crible produit un mélange composé de graines ailées, poussières, bractées fragmentées, graines vides, pièces d'aiguilles, pédoncules, rameaux, etc. Il faut ensuite sélectionner la graine propre. La réussite de cette opération est assurée lorsque les cônes sont ramassés sur la plante au moment où les bractées commencent à se détacher les unes des autres (Gorian, 2001). Des opérations manuelles sont parfois nécessaires, avant ou après le passage au crible.

6.6.3. Extraction à chaud

Cette procédure s'applique aux genres *Cupressus* et *Pinus*, avec peu d'exceptions. Elle peut être employée aussi pour l'extraction des graines de *Fagus* et d'*Alnus*. Les cônes, bien fermés et peu résineux, sont nettoyés avec des appareillages mécaniques puis étalés sur des surfaces dures pour la post-maturation. Des courants d'air et des agitations sporadiques pendant cette dernière phase, facilitent la déshydratation. Après une période variable selon l'espèce, les cônes commencent à s'ouvrir et permettent le travail à chaud. Le traitement est effectué dans des fours appropriés, les températures et les temps d'exercice varient en fonction de l'espèce et du contenu d'humidité des cônes. Pour ne pas compromettre la vitalité de la graine, la température ne doit en aucun cas dépasser les + 50°C (Gorian, *op. cit.*).

À la phase d'extraction, fait suite la phase de tri et de nettoyage des graines qui éliminera les impuretés restantes, les poussières, les restes résineux, les graines vides, avortées ou endommagées par les insectes et qu'on ne peut conserver. Les opérations nécessaires à cette phase de travail peuvent être exécutées mécaniquement,

manuellement ou en combinant les deux.

6.6.4. Opérations mécaniques

Le travail sur des petites quantités de graines est normalement exécuté avec des petites machines de laboratoire (Gorian, *op. cit.*). Pour la plupart, il s'agit de tris de type gravimétrique (fig. 17), exploitant un flux d'air qui sépare en même temps les impuretés des semences et les graines pleines des vides, normalisant ainsi les graines selon leur dimension et leur poids.



**Figure 17 – Machine pour le tri gravimétrique des semences en usage à la BG-SAR.
(photo: E. Mattana)**

Chaque lot de graines nécessitera un nombre de cycles directement proportionnel à l'homogénéité du matériel et au type de semences à nettoyer. Grâce aux différentes régulations des flux d'air, dans les premiers cycles les impuretés et les poussières sont éliminées, les graines sont ensuite triées. Il faut toutefois considérer que de telles opérations, si elles ne sont pas correctement exécutées, peuvent amener à un appauvrissement génétique de l'accession par rapport à la population de provenance, puisqu'on pourrait perdre toutes ces graines qui même si elles sont viables, ont un poids peu différent de celui des déchets. À la fin du travail il est possible d'évaluer, en mode approximatif, l'écart entre le pourcentage des graines et le rendement de la campagne de récolte relative à chaque accession. Dans le cas où on doit travailler de grosses quantités de graines et qu'il ne soit pas demandé un degré de pureté élevé, par exemple dans le cas de lots destinés au semis courant, il est possible de recourir à des outillages de type industriel (fig. 18 et 19).



Figure 18 - Machine à flux d'air avec cylindre denté pour le tri des semences. (photo: A. Prada)



Figure 19 – Machine à flux d'air pour le tri des gros lots de semences. (photo: A. Prada)

6.6.5. Opération manuelle ou mixte

Dans quelques cas, les techniques automatisées ne sont pas en mesure d'effectuer parfaitement le travail, lorsque la dimension réduite des graines est semblable à la dimension des poussières ou des tissus finement hachés ou réduits en poussière. Dans ce cas on utilise une batterie de tamis (fig. 16) avec des diamètres d'ouverture variables de 1 cm à 0.1 mm, pour favoriser l'élimination sélective d'impuretés. Dans les cas plus complexes les graines sont séparées manuellement à l'aide de pincettes et d'outils de laboratoire. L'emploi combiné de techniques manuelles et mécaniques concerne ces cas dans lesquels un premier nettoyage manuel grossier est suivi d'un nettoyage mécanique puis d'un autre, manuel et précis.

6.7. Quantification de l'accession et analyse du matériel végétal

Pour vérifier le degré de pureté et l'état de propreté du matériel, les graines sont comptées en rapportant au poids total des graines propres le poids moyen d'une graine. Il existe divers systèmes d'analyse d'image (§. 10.5) qui permettent la mesure du poids et du nombre de graines d'un échantillon sans que celui-ci soit compté préalablement, cependant pour se faire, le lot ne doit pas présenter d'impuretés.

Parallèlement une série d'observations sont réalisées sur les semences (téguments, endospeme, cotylédons, embryon, etc.) au microscope, au stéréoscope ou au négatoscope de façon à pouvoir déterminer des anomalies ou mettre en évidence des caractères particuliers de l'unité taxonomique analysée.

La quantité d'humidité interne des graines est aussi déterminée (*moisture content* ou mc%), indispensable pour déterminer les temps et les modalités de la déshydratation pour la conservation. La teneur en humidité détermine dans une large mesure l'intensité de la respiration, en influant sur la vitesse des procédés métaboliques et, par conséquent, sur la longévité des graines. En général, cette donnée (mc%) s'obtient en se conformant aux standards ISTA et en particulier en suivant les règles de suivi spécifiées (IBPGR, 1982) :

- Minimiser le temps durant lequel les semences sont exposées aux conditions ambiantes du laboratoire.
- La détermination est réalisée sur deux répliques provenant d'échantillons préalablement homogénéisés.
- Pour les accessions de graines très humides, un pré séchage est nécessaire.
- Pour certaines catégories de graines un broyage est nécessaire (ex: *Poaceae* et *Fabaceae*).
- Les contenants pour le séchage doivent être en verre ou en métal et munis d'un couvercle hermétique pour empêcher les variations d'humidité. Avant d'être utilisés, ils doivent être séchés dans un four à 130°C pendant une heure et ensuite placés dans un dessiccateur lors du refroidissement.
- Le poids des graines par réplique doit être compris entre 4,5 – 5g dans les contenants préalablement pesés. Dans le cas d'accession à faible quantité de graines, même si le résultat est moins convenable, utiliser deux répliques de 0,5 g chacune.
- Les graines avec un fort contenu en huile et les graines d'arbres doivent être desséchées à des températures plus basses afin d'éviter la volatilisation des essences : 103° ± 2°C pour 17 ± 1 heure (traitement à basse température). Les graines des autres espèces à 130°-133°C pour 1 heure (traitement à haute température), à l'exception du maïs et autres céréales pour lesquels la période d'exposition est respectivement de 4 et de 2 heures. Le séchage doit être exécuté dans une étuve à ventilation forcée. Après le séchage, les contenants doivent être fermés, refroidis dans un dessiccateur 30-45 minutes et ensuite repesés.

Le contenu d'humidité sur base humide est calculé comme la perte en poids et exprimé en pourcentage à un chiffre décimal. Si M_1 est le poids du contenant (avec couvercle), M_2 le poids du contenant et des graines avant le séchage, et M_3 le poids du contenant et des graines après le séchage, le mc% est donné par la formule :

$$mc\% = 100 \times (M_2 - M_3) / (M_2 - M_1)$$

La signification de ce paramètre varie selon le stade physiologique de la graine au

moment des analyses et nous aide à comprendre si la graine est prête à être conservée ou doit être déshydratée ultérieurement.

Le calcul de l'humidité présente dans la graine peut aussi être exécuté avec des appareils électroniques particuliers, appelés des analyseurs d'humidité ou des thermo-balances (fig. 20), qui, en même temps pèsent et déshydratent l'échantillon grâce à une régulation informatisée (Suszka *et al.*, *op. cit.* ; ISTA, 2006). Les répliques sont broyées pour favoriser la perte d'eau à travers les téguments et insérées à l'intérieur de l'appareil. La température d'exercice, qui peut être sélectionnée par l'opérateur, est habituellement de 105°C pour éviter la vaporisation de substances organiques comme les huiles. L'appareil pèse et en même temps chauffe l'échantillon, généralement au moyen de rayons infrarouges, si le temps d'exécution n'a pas été préétabli il s'éteindra automatiquement une fois la baisse pondérale devenue stable.



Figura 20 – Exemple d'analyseurs électroniques de l'humidité ou thermo-balances, en usage à la Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR) et la Banc de Llavors Forestals (CIEF). (photo: E. Mattana)

6.8. Tests qualitatifs

Parmi les facteurs qui conditionnent la qualité de la graine, il faut rappeler : le bagage génétique, l'âge et le type de gestion à laquelle est soumise la plante mère, les conditions climatiques et physiologiques de la plante mère pendant la formation de la graine, le degré de maturité au moment de la récolte, la technique de récolte, le travail et les méthodes de conservation (Piotto *et al.*, 2001). La qualité peut s'exprimer à travers des paramètres utiles mis en relation avec le comportement de la graine *in situ* et *ex situ*. Avant d'être conservées, les graines devraient être soumises à différents tests qualitatifs, dont la détermination de la capacité germinative et de la vitalité ; il y a, en outre, d'autres tests qui caractérisent génétiquement la graine et d'autres aspects importants de la physiologie non mis en évidence par l'essai de germination. Dans le présent chapitre on évite la description approfondie des tests largement utilisés et qui sont bien illustrés dans les "Méthodes officielles d'analyse des semences" (*Ministero Agricoltura e Foreste*, 1993 ; §. 2.2.1) ainsi que dans l'*International Rules for Seed Testing* de l'*International Seed Testing Association* (ISTA, 2006), cependant, sont mis en évidence les aspects critiques et les motivations des différents tests. Ensuite, sont rapportés les paramètres les plus étudiés et les tests les plus employés pour évaluer les caractéristiques qualitatives des graines.

6.8.1. Capacité germinative

La capacité germinative indique le pourcentage de graines germées (normales et anormales). Elle représente le paramètre le plus utilisé pour évaluer un lot de graines, mais elle n'est pas suffisante pour exprimer d'autres paramètres de la qualité de celles-ci. L'ISTA définit la germination comme étant l'émergence et le développement qui amènent la graine au stade auquel son aspect indiquera si elle pourra se développer ensuite en une plante normale, toujours si les conditions ambiantes le permettent (ISTA, 2004). Quelques auteurs considèrent la germination comme l'émergence et le développement de la plantule à travers l'émission de la radicule d'1 mm, limite minimale d'observation macroscopique pour l'observateur. La vitesse de germination est considérée comme un aspect important dans le domaine de la germination. Elle peut fournir des informations importantes sur la qualité de la graine mais n'exprime pas souvent l'indication de la présence d'éventuels défauts génétiques déterminés, par exemple, par les phénomènes d'introggression (ex. : *Orchidaceae*).

6.8.2. Vitalité

Une graine est considérée viable lorsqu'elle présente les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques essentielles à sa germination. La baisse de vitalité est habituellement accompagnée d'une réduction de la capacité respiratoire, de la teneur en acides gras insaturés, des lipides des membranes, de l'activité enzymatique et de la teneur en mARN. Les tests qui déterminent la vitalité fournissent seulement une estimation de la qualité de la graine et sont très rapides (24/48 heures) par rapport aux essais de germination classiques, qui demandent souvent des temps plus longs. La vitalité ne doit pas être confondue avec la capacité germinative, en effet, les graines vitales mais dormantes, ne gèrent pas nécessairement. Ci-dessous, sont énumérés quelques tests pour déterminer la vitalité des graines.

Test au tétrazolium

Le test au tétrazolium est un test colorimétrique qui utilise une solution à 1%, de 2,3,5-triphényl-tétrazolium chlorure ou bromure à un pH 6.5-7.5 (ISTA, 2006), photosensible, transparent et soluble dans l'eau. Cette solution imbibe les cellules des tissus, se déshydrogène par l'action d'enzymes, et se modifie en un mélange insoluble rouge, appelé chimiquement "fomazan". Ce test colorimétrique est utilisé lorsqu'on a la nécessité de déterminer rapidement la vitalité du lot, ou bien lorsqu'on doit vérifier la vitalité des graines suite à un test de germination qui n'a pas donné de résultats satisfaisants. Il s'emploie aussi lorsqu'on travaille avec des graines de *taxa* qui présentent une profonde dormance ou une période de germination très longue. La coloration résultant du test colorimétrique peut être d'une tonalité de rouge plus ou moins marquée pour les tissus sains et vitaux, alors que les parties mortes ou endommagées ne se colorent pas. Ce test tend à surestimer la viabilité d'environ 10% par rapport à la valeur que l'on obtient avec les essais de germination (Piotto *et al.*, 2001).

Indigo-camin

L'indigo-camin est un test colorimétrique utilisé dans quelques pays en alternative au tétrazolium en raison du coût de mise en œuvre et d'une procédure relativement simple. Il s'agit d'une méthode qui utilise une solution de dextrose et d'hydroxyde de sodium. Les graines sont débarrassées des téguments, puis mises à imbiber pendant 24 heures dans de l'eau distillée. Ensuite les embryons sont extraits et plongés, selon l'espèce de 1 à 2 heures, dans une solution d'indigo-camin diluée à 1/2000, à 20°C et à l'obscurité ; puis

ils sont rincés et examinés. Les tissus morts se coloreront en bleu, alors que les tissus vivants ne se colorent pas (Suszka *et al.*, *op. cit.*).

Solution de Lugol

Solution à base d'iodure de potassium et d'iode. Ce colorant réagit à l'amidon en provoquant la coloration en bleu des tissus de l'embryon qui contiennent de l'amidon et que l'on présume ainsi être, vivants.

Test de conductibilité

Épreuve qui évalue l'intégrité des tissus et des membranes cellulaires, donc indirectement leur qualité. La graine ayant des membranes endommagées qui est soumise à une imbibition, subit une perte de contenu cellulaire (ions, hydrates de carbone, etc.) qui modifie les caractéristiques de la solution dans laquelle elle est plongée et fournit une mesure de conductibilité électrique. L'avantage de ce test, mis au point pour un nombre limité d'espèces, est la rapidité et la simplicité d'exécution (Piotto *et al.*, 2001).

Test avec le di-acétate de fluorescéine

Essai colorimétrique pour l'estimation rapide de la vitalité des graines. Il est aussi employé pour déterminer la vitalité du pollen, des racines d'arbres, des cultures méristématiques et des graines d'*Orchidaceae*. Le di-acétate de fluorescéine pénètre rapidement à l'intérieur des cellules vivantes ayant des membranes intactes ; l'enzyme estérase le transforme en un produit fluorescent qui se répand dans les cellules. Avec des microscopes à fluorescence, équipés de sources de lumière et de filtres spéciaux, il est possible de différencier les embryons et tissus vivants, de ceux endommagés (Piotto *et al.*, 2001).

Analyse radiographique

Méthode qui fournit des indications assez précises sur le développement de l'embryon et sur le degré de maturité de la graine, ainsi que sur l'éventuelle présence de larves ou d'autres pathogènes. La radiographie est une méthode d'étude non destructive, qui se révèle très utile pour le matériel végétal d'une entité dont on dispose de peu de matériel ou pour celles en danger d'extinction. Cette méthode est communément utilisée pour les graines des conifères. Compte tenu des coûts relativement élevés, des instruments nécessaires et des précautions qui doivent être prises, son emploi est actuellement très limité (Suszka *et al.*, *op. cit.* ; Martin *et al.*, 1998 ; Gudin *et al.*, 1992).

Résonance magnétique

Dans quelques cas, les résultats obtenus avec la radiographie ne reflètent pas avec précision la qualité des tissus, surtout lorsque l'évaluation porte sur des graines complètement imbibées. Les tissus vivants imbibés peuvent être confondus avec les endommagés, alors qu'il est plus facile de les distinguer lorsque la teneur en humidité des graines est réduite. La résonance magnétique est une technique non destructive qui fournit des images de protons (H^+) liés à l'eau des tissus et aux chaînes des acides gras. Ainsi, il est possible de suivre les mouvements des métabolites et cette technique devient particulièrement utile pour des évaluations relatives à la physiologie des graines. Par des élaborations informatisées on peut obtenir des images à haute résolution, utilisées pour étudier la structure et la distribution des lipides dans les graines (Piotto *et al.*, 2001).

6.8.3. Test de vigueur

La vigueur des graines est définie par la somme totale de ces propriétés qui déterminent le niveau d'activité et le comportement des lots pendant la germination dans une vaste gamme de milieux (ISTA, 2004). La vigueur ne peut pas se mesurer à travers un paramètre unique parce que c'est un concept qui comprend différents aspects du comportement des graines, parmi lesquels la vitesse et l'uniformité de la germination et le développement de la plantule ; la capacité d'émergence de la plantule en conditions défavorables ; le comportement suite à la conservation (en particulier la capacité de maintenir la germination initiale). Des graines vigoureuses sont potentiellement capables d'avoir un comportement optimal dans des conditions qui ne sont pas considérées comme idéales pour l'espèce à laquelle appartient l'échantillon.

Les différences de vigueur peuvent se manifester dans les processus biochimiques et dans les réactions actives pendant la germination (réactions enzymatiques, activité respiratoire, etc.), dans la vitesse et l'uniformité d'émergence des semences, dans la croissance pendant l'élevage et après la mise en place, et dans la capacité de germination en conditions ambiantes défavorables. Le degré de vigueur peut conditionner la croissance des plantes adultes, ainsi que leurs fructifications et leurs rendements. La définition de vigueur concerne les graines et l'enracinement initial des semences, mais il ne considère pas l'éventuelle dormance et la composition génétique. Les tests qui se basent sur des aspects spécifiques du comportement de la graine pendant la germination, par exemple l'épreuve du vieillissement accéléré, le test (Piotto *et al.*, 2001) et l'essai de conductibilité, sont généralement utilisés pour la détermination et l'évaluation des composantes spécifiques de la vigueur (Piotto *et al.*, 2001).

6.9. Déshydratation

6.9.1. Tolérance à la déshydratation et type de conservation

Les graines peuvent être classées en deux catégories principales sur la base de leur réponse à la déshydratation et à leur comportement pendant la conservation. Le premier groupe, les "graines orthodoxes", comprend celles pour lesquelles la conservation est substantiellement fonction de leur teneur en humidité et de la température. Ce type de graines peut être amené sans dommages à de basses valeurs d'humidité (même à des niveaux très inférieurs à ceux atteints en conditions naturelles) ; leur longévité augmente avec la diminution de la température et de la teneur en humidité et peut être calculée au moyen de l'équation de viabilité des graines (Roberts, 1973 ; Ellis *et Roberts*, 1980 ; Ellis, 1988 ; Pritchard *et Dickie*, 2003). Aujourd'hui les graines orthodoxes sont aussi appelées "tolérantes à la déshydratation". Appartiennent à ce groupe, la plupart des graines des espèces qui poussent sous nos latitudes (Hong *et al.*, 1998). Les altérations possibles (tab. 1) que les graines orthodoxes peuvent subir pendant la conservation, par rapport à leur teneur hydrique, peuvent être ainsi synthétisées :

Teneur hydrique des semences de type orthodoxes (%)	Possibilités d'altération pendant la conservation à basse température
Inférieure à 1,5	Oxydation des lipides

Entre 5 et 6	Pratiquement aucune (niveau idéal pour la conservation de nombreuses espèces)
Entre 10 et 18	Début de développement de l'activité des cryptogames
Supérieure à 18	Augmentation de l'activité respiratoire
Supérieure à 30	Germination des semences non dormantes

Tableau 1 – Altération des semences de type orthodoxe pendant la conservation à basses températures en fonction de la teneur hydrique.

La tolérance au séchage est principalement liée aux propriétés des protoplasmes cellulaires. Pour pouvoir affronter la déshydratation, les tissus cellulaires doivent être capables de limiter ou de réparer les dommages subis, en maintenant leur intégrité physiologique pendant la période où le tissu est sec, et pourvoir, pendant la phase de réhydratation, à la mobilisation des mécanismes nécessaires à l'éventuelle réparation des tissus (Black *et* Pritchard, 2002). Spécifiquement, quelques uns des mécanismes qui permettent le séchage concernent la capacité à simplifier les structures intracellulaires (en particulier les mitochondries) ; l'habileté à interdire l'activité métabolique ; l'efficacité des systèmes antioxydants ; la faculté d'élaborer des protéines protectrices des membranes cellulaires (dites des protéines LEA) ; l'existence de protéines hydrophobes qui entourent les corps gras et les empêchent de s'agglomérer pendant la déshydratation, ainsi que la capacité à vitrifier pendant le séchage quelques substances comme les sucres (Berjak *et* Pammenter, 2002).

Le second groupe, des "graines récalcitrantes", appelées aussi "sensibles à la déshydratation", comprend ces graines qui ne tolèrent pas une déshydratation significative par rapport à leur teneur en humidité présente à l'instant de la dissémination (en général variable entre 20 et 70%, mais plus fréquemment entre 30 et 50%). De telles graines ne peuvent pas être conservées avec de forts niveaux d'humidité parce qu'elles tendent à germer rapidement et elles ne peuvent être maintenues à des températures inférieures à zéro, puisque les tissus subirait des dommages en raison de la congélation de l'eau qu'elles contiennent. Pour la conservation de ce type de graines on développe une technique alternative qui prévoit la cryoconservation dans l'azote liquide des embryons (§. 7.1.3), structures très petites, beaucoup plus résistantes à la dessiccation et relativement uniformes par leur dimension et leur teneur en humidité et par conséquent en mesure d'être soumises à une déshydratation cryoprotectrice contrôlée. Des expériences positives dans ce sens ont été réalisées avec diverses espèces des genres *Quercus*, *Arthocarpus*, *Calamus*, *Elaeis*, *Hevea*, *Nephelium* et *Shorea*.

Avec une teneur élevée en humidité, ces graines présentent généralement un poids élevé et de grandes dimensions, plus évidentes chez les graines des espèces forestières. Le pourcentage d'eau au moment de la dispersion est un bon indice de l'aptitude à la conservation ; une valeur élevée caractérise les graines de conservation difficile.

7% des graines de presque 7.000 espèces étudiées jusqu'à nos jours, appartenant à 65 familles, se sont révélées récalcitrantes (Hong *et al.*, 1998), mais en raison du manque d'information approfondie sur les différentes flores du monde, il est probable que ce chiffre soit appelé à changer et à augmenter considérablement.

Appartiennent à ce groupe les graines de nombreuses plantes tropicales (coco, mangue, avocat, cacao, etc.) mais aussi des espèces importantes d'arbres de nos latitudes (ex. : *Quercus*, *Aesculus*, *Castanea*). Parmi les graines les plus sensibles à la déshydratation on compte les soi-disant "vivipares" (ex. : agave) parce que commence leur germination lorsqu'elles sont encore sur la plante mère (ou bien simultanément à la dispersion), comme cela se produit pour quelques plantes aquatiques de grande importance écologique (ex. : Palétuviers). Les *Fagaceae*, *Moraceae*, *Sapotaceae* et *Lauraceae* sont des familles avec un nombre élevé d'espèces ayant des graines sensibles à la déshydratation.

De cet exposé, découle le fait que les graines récalcitrantes ne forment pas de banques de graines du sol alors que cette aptitude est plus fréquente chez les graines orthodoxes. Une troisième catégorie est celle des "graines intermédiaires" (Dickie *et* Pritchard, 2002) qui comprend les graines qui supportent mieux la déshydratation que les graines récalcitrantes, mais moins bien que les orthodoxes. Une fois partiellement déshydratées elles ne tolèrent pas le stress provoqué par les basses températures (inférieures au 0°C), mais elles se comportent mieux si elles sont exposées à des températures plus douces (autour de 15°C). En général ce type de graines tolère une déshydratation jusqu'à des teneurs d'humidité comprises entre 10 et 20% (Hong *et al.*, *op. cit.*).

L'identification des catégories décrites aide dans la gestion des semences mais ces catégories ne sont pas formelles, il y a de ce fait un *continuum* de conditions entre la graine la plus orthodoxe et la graine la plus récalcitrante. A titre d'exemple on cite la longévité des graines de tomates qui peuvent être conservées plus de 25 ans (à -18°C et 5% de teneur d'humidité) alors que celles de la plante de thé (*Camellia sinensis* Kuntze) ne restent viables que de 2 à 8 semaines (Walters, 2004). Bien qu'il y ait une tendance générale des banques de semences à unifier leurs critères de travail, les protocoles appliqués pour définir la catégorie des graines ne sont pas encore assez homogènes. Cela peut induire qu'une même espèce soit considérée récalcitrante par certains et orthodoxe ou intermédiaire par d'autres. Il est par contre fréquent que, pour une espèce donnée avec des graines récalcitrantes, la tolérance au séchage soit plus élevée dans les populations des zones moins humides de l'aire de distribution. Dans quelques cas, des techniques adéquates appliquées au processus de déshydratation ont permis une longue conservation de graines réputées récalcitrantes (ex. : *Fagus sylvatica* L.).

À un niveau global, la gestion des ressources génétiques des espèces vivant en zones tropicales humides est un des problèmes les plus complexes. Dans ce contexte la conservation difficile et la longévité limitée des graines de certaines espèces sont une préoccupation majeure. Le dépérissement rapide des graines est documenté depuis le VI^e siècle après J.-C. Un savant chinois relate la meilleure méthode pour conserver les châtaignes (probablement *Castanea mollissima* Blume). Dans les années 1970 des recherches très approfondies ont porté sur la conservation des graines récalcitrantes de quelques *Fagaceae* d'importance écologique et économique en Europe, suivies ensuite de nombreuses études sur d'autres graines intolérantes au séchage (Suszka *et al.*, 1994 ; Piotto *et* Amadei, 2004 ; Black *et* Pritchard, *op. cit.*). Toutefois, les connaissances et la technologie à l'heure actuelle ne permettent pas de programmer soigneusement la conservation et la gestion des ressources génétiques liées aux espèces ayant des graines hautement périssables.

6.9.2. Chambre de déshydratation

La baisse d'humidité des échantillons de semences peut être obtenue de diverses manières, notamment par l'exposition à l'air en milieux secs, ventilés et ombragés. Les banques de semences cependant, utilisent généralement des chambres de déshydratation qui, même si elles sont assez coûteuses, fournissent des résultats optimaux.

Le matériel destiné à la déshydratation est, en effet, stocké en chambre (fig. 22) dans laquelle des déshumidificateurs et des climatiseurs garantissent des valeurs d'humidité relative de 10-15% et des températures comprises entre 10 et 25°C (FAO/IPGRI, 1994), pour éviter que les téguments des semences ne subissent de brusques cassures et/ou rétractions. Ce traitement, de durée variable selon les caractéristiques des graines, peut varier de 30 à 180 jours. Il est important que les locaux dans lesquels se déroule la déshydratation permettent une bonne circulation d'air, en garantissant 10 renouvellements d'air par heure (IPGRI, 1982). Dans ces conditions les lots en traitement sont placés à l'intérieur d'enveloppes de papier, sachets de tissu transpirant ou de cuvettes (fig. 22) et pesés régulièrement pour contrôler la baisse de poids ; si W_f est le poids qui correspond à $5\pm 1\%$ du contenu d'humidité interne (ou *moisture content*) final (mc_f), et W_o le poids de l'accession au début de la déshydratation, on peut déterminer le poids final (poids visé) que doit atteindre l'accession au terme du processus, au moyen de la formule :

$$W_f = W_o \times (100 - mc_o) / (100 - mc_f)$$

avec $mc_o = mc\%$ à l'origine

et $mc_f = 5\pm 1\%$

À tout instant il est possible de vérifier le contenu en humidité de l'accession (mc_f) avec la formule inverse :

$$mc_f = 100 - [(W_o / W_f) \times (100 - mc_o)]$$

avec mc_f et $W_f = mc\%$ et le poids de l'accession au moment de la pesée.

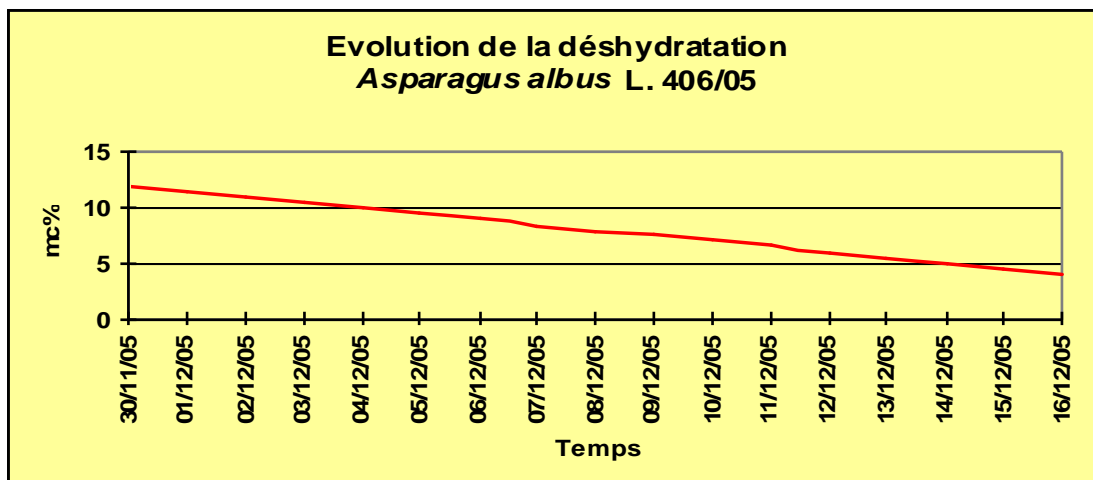


Figure 21 – Suivi de la déshydratation d'une accession d'*Asparagus albus* L.
(données: BG-SAR)

Une fois vérifié que la teneur en humidité est comprise entre 3,5% (pour les graines ayant une forte teneur en huile) et 6,5% (pour les graines à faible teneur en huile), les valeurs du mc% correspondent à une humidité relative à l'équilibre (ERH) de 15% à 15°C (Linington, 2003), les graines sont considérées prêtes pour la conservation à long terme à basse température (Roberts, 1973 ; Ellis *et* Roberts, 1980) (fig. 21), généralement, dans des congélateurs à des températures inférieures à -18°C (FAO/IPGRI, *op. cit.*). Les graines, toutefois, peuvent aussi être conservées dans des chambres frigorifiques à des températures généralement comprises entre -5°C et 5°C.



Figure 22 - Structure pour la déshydratation au BG-SAR: humidimètre avec valeur ambiante de l'humidité relative et température, déshumidificateur avec absorption chimique et matériel stocké. (photo: E. Mattana)

Dernièrement, une méthode alternative s'est développée (fig. 23) pour l'évaluation et le suivi de l'humidité interne des graines pendant leur déshydratation. Une telle méthode présente l'énorme avantage, contrairement au calcul du mc%, de ne pas être destructive. Elle se base sur la détermination d'un paramètre défini comme "activité de l'eau" (a_w , *activity water*) qui, dans une échelle de 0 à 1, représente l'humidité relative mesurée aux conditions d'équilibre (ERH) entre la teneur en eau à l'intérieur de la graine et celle du milieu environnant.

Les valeurs d' a_w et du mc% peuvent être corrélées à l'aide d'une courbe de l'isotherme (Probert, 2003) qui, toutefois, varie selon la composition de la graine, et la température. C'est pourquoi, l'exacte corrélation entre les deux paramètres ne peut être déterminée que de manière empirique en extrapolant les deux valeurs pour chaque type de graine. La détermination de l' a_w et donc de ERH, représente néanmoins une mesure suffisamment précise pour évaluer, indirectement, la teneur en eau des graines.



Figure 23 – Instrument pour la mesure de l'activité de l'eau (a_w) en usage au M.A.I.Ch. (Crête). (photo: G. Bacchetta)

6.9.3. Déshydratant artificiel

La déshydratation des accessions peut être effectuée en utilisant des déshydratants artificiels tels le gel de silice (fig. 24) qui est mis en contact avec les graines en contenants hermétiques. Grâce à son pouvoir d'absorption, ce produit abaisse la teneur en humidité interne des lots de graines jusqu'à des valeurs qui garantissent sa conservation à moyen et long terme (Probert, *op. cit.*). La quantité de déshydratant à utiliser varie selon la composition des graines, la quantité de matériel et surtout leur teneur en huiles. En règle générale le rapport graines/gel doit être de 1:1.



Figure 24 – Exemple de diverses sortes de gel de silice auto-indicateur présent sur le marché.
(photo: E. Mattana)

7. EMBALLAGE ET CONSERVATION

Afin de garantir un stockage de longue durée il est important de contrôler l'humidité des semences. Ce facteur représente le paramètre le plus délicat pour leur bonne conservation. En effet, un stockage à long terme ne doit pas nécessiter une manipulation fréquente des lots de graines ; pour ceci il est nécessaire d'utiliser des contenants parfaitement hermétiques, mais aussi transparents, de façon à pouvoir apprécier le taux d'humidité présent à l'intérieur. Le contrôle de l'humidité dans le contenant est habituellement effectué grâce à un indicateur coloré (ex. : gel de silice). Il est donc fondamental de garantir la parfaite étanchéité et l'intégrité des contenants utilisés pour la conservation à long terme. Ainsi, de nombreux types de récipients ont été testés (tab. 2) afin d'évaluer leur efficacité en comparant leurs avantages et leurs inconvénients au cours du stockage (Gómez- Campo, 2001). Sur la base de ces études, il en a conclut que les contenants utilisables sont fondamentalement de trois types :

TYPE DE RECIPIENT	AVANTAGES	INCONVENIENTS
Enveloppes tri-couches en aluminium	Plusieurs formats, légères, refermables, hermétiques et occupant peu de place.	Non visibilité de l'échantillon. Possibilité de dommages par pression ou compression externe.
Sachets en polyéthylène	Formats adaptables, transparents, légers, refermables et occupant peu de place.	Brève durée de vie (devenant poreux), peuvent se perforer avec les structures externes des graines. Possibilité de dommages par pression ou compression externe.
Flacons en verre	Plusieurs formats, refermables (se ferment sous pression), transparents et hermétiques.	Lourds, fragiles et occupant beaucoup de place.

Tableau 2 – Avantages et inconvénients de divers type de récipients employés pour la conservation.

Pour une conservation sûre à long terme il est préférable d'utiliser des flacons en verre transparent contenant un indicateur d'humidité qui change de couleur lorsque l'humidité relative dépasse les 15%. Pour les très petites graines, il est recommandé, avant de les placer dans le contenant en verre et pour ne pas qu'elles s'y dispersent, de les mettre dans des sachets en polyéthylène perméables à l'air.

La fermeture des flacons en verre peut se réaliser selon différentes modalités ; on utilise entre autres la fermeture à la flamme (fig. 25) avec une soudure à l'oxygène- propane (Gómez- Campo, *op. cit.*).



Figure 25 – Flacons en verre fermés à la flamme. (photo: G. Bacchetta)

Dans le tube de verre, on introduit souvent une doison de liège (fig. 25) de façon à confiner les semences dans un volume réduit, et éviter un endommagement dû à la manipulation pendant les opérations de fermeture et de mise en cellule pour la conservation à long terme. À l'intérieur du tube on rajoute une plaquette plastifiée qui indique les données relatives à l'accession et les données de la confection. Ceci peut aussi se faire à l'aide d'un code barres adhésif placé à l'extérieur de l'éprouvette.

Afin d'évaluer la parfaite tenue, les éprouvettes fermées hermétiquement sont successivement introduites dans un contenant en verre à fermeture pneumatique, à l'intérieur duquel une solution saturée en NaCl favorise à température ambiante une humidité relative élevée. Après quatre semaines il sera possible de vérifier que le gel de silice n'a pas viré, garantissant ainsi la fermeture parfaite des éprouvettes et une conservation correcte des graines.

D'autres méthodes prévoient l'emploi de flacons en verre avec fermeture sous pression (joint en gomme et gaine en aluminium) ou à vis. Beaucoup utilisent aussi les bocaux en verre avec fermeture sous pression et joint en gomme (fig. 26).

Si la fermeture à la flamme peut garantir une condition hermétique sûre, elle représente néanmoins une méthode très coûteuse, puisque sa mise en œuvre demande un temps considérable et qu'en outre les éprouvettes ne peuvent pas être réutilisées.

La fermeture imparfaitement hermétique des contenants peut être mise en évidence en effectuant le test de tenue avant et pendant le stockage, en utilisant le système du double contenant. Les graines sont insérées à l'intérieur de flacons (de volume variable, selon la quantité et la taille des graines, de 10 à 50 ml) fermés hermétiquement sous pression avec un joint en gomme et une capsule en aluminium.

Les flacons sont à leur tour placés à l'intérieur de bocaux en verre de 500 ou 1000 ml fermés sous pression. À l'intérieur du bocal, il peut être inséré, un indicateur qui montre l'éventuelle variation d'humidité (fig. 26).



Figure 26 – Flacons en verre avec fermeture sous pression en usage au BG-SAR avec à l'intérieur, pour suivre la teneur en humidité, deux gélules transparentes en gélatine avec gel de silice en micro-granule et un bocal en verre fermé sous pression avec une étiquette en papier pour le suivi de l'humidité. (photo: E. Mattana)

Les opérations de fermeture doivent être exécutées dans la chambre de déshydratation, où il est nécessaire de conserver les divers contenants (pourvus des gaines et des garnitures), ainsi que l'indicateur d'humidité, de sorte que tout soit en équilibre avec les paramètres de température et d'humidité optimaux pour la conservation à long terme.

L'indicateur d'humidité le plus couramment utilisé est le gel de silice granulaire auto-indiquant (fig. 24). Ce gel est en mesure d'adsorber l'eau disponible à l'intérieur des contenants en virant de couleur. Le gel de silice est disponible dans le commerce sous différentes granulométries et dans des sachets préconfectionnés. Une alternative à l'emploi du gel de silice comme indicateur est possible avec des étiquettes cartonnées ayant des zones imprégnées d'une solution de gel de silice qui changent de couleur à des pourcentages d'humidités connus.

7.1. Conservation à long terme

Après avoir été conditionnés hermétiquement, les lots de graines peuvent être stockés pour garantir la conservation avec une viabilité estimée pour plusieurs dizaines d'années. Tout ceci concerne les graines qui supportent la déshydratation (graines orthodoxes), alors qu'il n'est pas encore possible de conserver à long terme, de manière sûre et garantie, les graines sensibles à la déshydratation (graines récalcitrantes). De nombreuses techniques ont été expérimentées et testées mais, la transposition de méthodes et de résultats scientifiques des procédures normales adoptées par les banques n'a pas encore été faite.

7.1.1. Congélation

La congélation, selon les standards de l'*International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI), à une température de stockage de -18°C ou inférieure (IBPGR, 1985a), est une méthode efficace pour allonger la viabilité des graines qui doivent être conservées pour de longues périodes. Malgré cela, il faut considérer que, même à de telles températures, les processus enzymatiques à l'intérieur de la graine ne sont pas complètement arrêtés et par conséquent, une dégradation de celle-ci, même si elle est toutefois lente, reste inévitable.

Afin d'éviter des dommages dus à la congélation de l'eau à l'intérieur des tissus, (ex. : *Pancratium maritimum* L.) il est nécessaire pour les graines volumineuses d'attendre de nombreux mois avant d'obtenir le niveau minimal d'humidité autorisant l'étape suivante

de congélation.

La congélation est réalisée au moyen d'armoires frigorifiques de type commercial ou grâce à des chambres frigorifiques conçues spécialement. Dans le premier cas, les coûts sont moins élevés, et les armoires peuvent être placées à l'intérieur des chambres de déshydratation (ex. : *Lombardy Seed Bank*, *Trentino Seed Bank*). Cette solution est habituellement la préférée des banques de petites dimensions, parce qu'elle permet une plus grande sûreté à de faibles coûts, avec comme unique limite la capacité de stockage du matériel végétal.

Les banques de moyennes et de grandes dimensions, tendent par contre à privilégier la réalisation de chambres frigorifiques sur mesure avec des systèmes de refroidissement et de contrôle plus sophistiqués, donc dispendieux, qui permettent cependant de pouvoir résoudre facilement les problèmes d'espace et par conséquent d'affronter avec une plus grande tranquillité l'expansion naturelle des collections dans le moyen et le long terme (fig. 27).



Figure 27 – Intérieur de la chambre frigorifique à -25°C de la *Banca del Germoplasma della Sardegna* (BG-SAR). (photo: C. Pontecorvo)

7.1.2. Lyophilisation ou *ultra-dessiccation*

La lyophilisation permet de déshydrater fortement les graines, jusqu'à des valeurs comprises entre 1 et 3%. A partir des années 80, cette technique a été étudiée pour la conservation à long terme du pollen afin d'en réduire la perte de viabilité (Schoenike et Bey, 1981 ; Cerceau et Challe, 1986).

En France cette technique a été développée au Laboratoire de Palynologie du Centre National de la Recherche Scientifique du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Au Conservatoire botanique national méditerranéen de Porquerolles (CBNMP), à partir de 1987, les lots de graines ont été périodiquement envoyés auprès de cette structure pour être lyophilisés ; depuis 1992 l'achat d'un lyophilisateur a permis d'utiliser cette technique directement sur site (fig. 28).



Figure 28 – Lyophilisateur en usage au CBNMP. (photo: G. Bacchetta)

Dans tous les tissus vivants l'eau existe sous différentes formes. Seule nous intéresse l'eau libre répartie dans les espaces intercellulaires et les vacuoles cytoplasmiques. La température et la vitesse de congélation dépendent dans une large mesure du but recherché par la lyophilisation. Les tissus conservés étant destinés à la reviviscence, la dimension des cristaux de glace joue un rôle important, puisqu'avec une vitesse de congélation extrêmement rapide, il peut y avoir simplement vitrification de l'eau et le tissu cellulaire n'est pas détérioré. Lorsque la congélation est totale, le matériel à déshydrater est soumis à 10^{-2} atmosphère, afin d'assurer le passage de l'état de glace à l'état de vapeur. Au vu de la diversité des semences au niveau des types de téguments, des dimensions et de leur quantité en eau à la récolte, il faut adapter au plus juste la méthode et les temps de lyophilisation.

L'objectif de l'expérimentation de cette technique sur les graines orthodoxes est l'évaluation du maintien de la viabilité, en comparaison d'autres techniques de conservation tel le stockage à basses températures.

Ci-dessous est illustrée, la procédure de lyophilisation et le protocole utilisé au Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles.

En premier lieu les semences récoltées sont déshydratées selon les procédés classiques à l'aide de silica gel afin de favoriser leur post-maturation.

Après cette première déshydratation classique, et pour évaluer au plus juste le pourcentage en eau libre des semences, deux méthodes différentes ont été appliquées :

- Pesée, avant et après la dessiccation dans une étuve 104°C pendant 24h, d'un échantillon défini de graines. La quantité d'eau perdue est exprimée en pourcentage du poids des semences.
- Pesée avant et après la lyophilisation des graines pendant un laps de temps déterminé (de 30 minutes à 90h). Lorsque la variation de poids devient constante, on peut estimer que la perte en eau ainsi mesurée correspond à la teneur en eau libre des graines. Le temps de lyophilisation retenu est le temps minimum qui favorise cette perte en eau maximale. Conjointement un test de germination est effectué avec les semences lyophilisées afin de vérifier la continuité de la viabilité du lot. Actuellement le temps moyen retenu pour la lyophilisation est de 24h.

Les études effectuées au CBNMP ont porté sur environ 140 espèces appartenant à une vingtaine de famille (*Solanaceae*, *Saxifragaceae*, *Leguminosae*, *Liliaceae*, *Cruciferae*, *Apiaceae*, *Labiatae*, *Euphorbiaceae*, *Compositae*, *Cyperaceae*, *Poaceae*...) représentatives des espèces de la flore méditerranéenne française.

Sur la base de ces expériences, il est possible de faire les remarques suivantes :

- Une déshydratation très poussée peut entraîner un léger retard dans le processus de germination sans affecter la croissance ultérieure.
- Pour certaines espèces, on constate une meilleure germination des graines lyophilisées et stockées à température ambiante par rapport aux témoins non

lyophilisés conservés à +5°C ou – 20°C. Ce sont sou vent des semences à téguments durs et imperméables.

- La lyophilisation des graines dites « dormantes », avant la vernalisation, ne perturbe en rien la germination.
- Le stockage à température ambiante des lots lyophilisés (fig. 29) permet de diminuer les dépenses de fonctionnement liées à l'énergie électrique sans observer de différence de viabilité par rapport aux lots lyophilisés maintenus à +5°C.



Figure 29 – Collection de lots lyophilisés au CBNMP. (photo: G. Bacchetta)

Cette technique ouvre des perspectives intéressantes pour la conservation à long terme des graines orthodoxes. Actuellement au CBNM de Porquerolles ce sont 1750 lots de semences représentant près de 500 espèces différentes qui ont été lyophilisés. Les études comparatives de viabilité entre les lots lyophilisés et ceux conservés à – 20°C, montrent de légères différences en faveur des lots lyophilisés après 10 années de conservation.

Cependant cette technique n'est pas adaptée à la conservation de certaines espèces. L'un des avantages est la rapidité de mise en œuvre de ce procédé permettant de réaliser 48h après, un essai de viabilité ou de germination. Cet essai comparé à un test initial permet d'observer immédiatement les effets éventuellement néfastes de cette technique, et ainsi d'envisager ou non l'utilisation de ce procédé de conservation pour l'espèce testée.

7.1.3. Cryoconservation dans l'azote liquide

La conservation à long terme des graines a été privilégiée par l'application de techniques de cryoconservation, c'est-à-dire le stockage du matériel végétal à la température de l'azote liquide (-196°C). Dans ces conditions les processus métaboliques, et en particulier enzymatiques de la graine, s'arrêtent totalement à cause du manque d'eau à l'état liquide. De cette manière la viabilité du matériel végétal peut-être préservée pour une période potentiellement infinie. L'efficacité de cette technique, démontrée par des essais en laboratoire sur de nombreuses espèces, a conduit différents chercheurs à considérer la cryoconservation comme l'unique technique actuellement disponible en mesure d'assurer une réelle conservation à long terme, et fiable, pour chaque situation. Cette technique est indiquée dans les cas de graines récalcitrantes, d'espèces qui se propagent végétativement, d'espèces rares, menacées ou en danger d'extinction, mais aussi pour des produits biotechnologiques de haute valeur comme ceux constitués de lignées cellulaires, d'extractions pharmacologiques, de clones sélectionnés ou de

matériel génétiquement modifié (Engelmann, 2004 ; González- Benito, 1998 ; Harvengt *et al.*, 2004, Hirano *et al.*, 2005 ; Panis *et al.*, 2001).

Base théorique de la cryoconservation

Un principe de base de la cryoconservation est la possibilité de dommages pendant la congélation, liés à la quantité d'eau libre dans le système biologique et à sa capacité à cristalliser pendant le processus. La cryoconservation de tissus peut avoir lieu, si on évite la formation de cristaux de glace intracellulaires qui pourraient facilement endommager le caractère et l'intégrité des membranes et des organites cellulaires. En nature, certaines espèces de plantes ont adopté des systèmes qui minimisent la formation de cristaux de glace à des températures inférieures à 0°C par la synthèse de substances spécifiques (sucres, proline ou protéines) qui abaissent le point de congélation des liquides intracellulaires en obtenant de cette manière ce qui est défini comme la capacité de "super-refroidissement" (Atici *et Nalbantoglu*, 2003 ; Griffith *et Yaish*, 2004).

Sans aucun doute, lorsqu'on descend à la température de l'azote liquide la formation de glace peut être évitée par la déshydratation intracellulaire intense et contrôlée des structures cellulaires qu'on va surgeler au moyen de différents mécanismes, le principal étant la vitrification. Celle-ci se réfère au processus physique de solidification non cristalline de l'eau au cours duquel on passe d'une solution aqueuse à un état amorphe et vitreux (Panis *et al.*, *op. cit.*).

La cryoconservation en pratique

Le déroulement d'un protocole caractéristique de cryoconservation implique de respecter les étapes suivantes :

- a. prétraitement;
- b. cryoconservation;
- c. récupération post- congélation.

Considérant que la cryoconservation peut être appliquée à chaque type de matériel biologique, des graines jusqu'aux pointes méristématiques, en passant par des cellules, cals, pollen, embryons somatiques, etc., la nécessité des protocoles spécifiques présentés dans toutes les phases antérieures, dépendra du type de matériel à conserver.

- a. **Prétraitements.** Ce sont les manipulations faites sur le matériel végétal avant de procéder à la cryoconservation. Même s'ils n'améliorent pas la récupération post-congélation, ils maintiennent toutefois la survie du matériel lorsqu'ils sont faits en combinaison avec d'autres stratégies cryoprotectrices. Les prétraitements les plus communs sont : l'exposition de tissus de plantes de climats tempérés à un régime d'acclimatation au froid ; l'application d'agents osmotiques qui réduisent le contenu en eau avant la congélation ; les pré-cultures de tissus sur des substrats qui contiennent des composés anti-stress comme, par exemple, la proline ou l'acide abscissique (Benson, 1999).
- b. **Cryoconservation.** Comme il a été dit précédemment, la présence d'eau, est aussi préjudiciable à la conservation traditionnelle qu'à la cryoconservation. Pour cette raison, il a été prévu différentes stratégies de cryoconservation qui cherchent à réduire au minimum l'humidité relative des tissus ou à rendre l'eau moins disponible à la formation de cristaux, avant de procéder à l'immersion en azote liquide. Le choix déterminant d'une stratégie sera fondamentalement conditionné par le type de matériel que l'on doit cryoconserver (cellules, cals, pointes méristématiques, embryons somatiques ou zygotiques ou graines).

- Protocole standard de cryoconservation. Celui-ci a été le premier protocole développé pour des tissus végétaux hydratés (Withers *et King*, 1980) et il est basé sur un lent refroidissement initial des échantillons (à un taux de $0,5-2^{\circ}\text{C min}^{-1}$) en présence d'une solution cryoprotectrice, qui en général, contient du diméthyl-sulfoxyde (DMSO) à une concentration comprise entre 5 et 15%. Lorsque le matériel atteint la température de -40°C il faut que la solution intracellulaire soit suffisamment concentrée pour se vitrifier avant l'immersion dans l'azote liquide. Aujourd'hui cette méthode a été en grande partie remplacée par d'autres techniques alternatives essentiellement à cause du coût élevé des instruments nécessaires à un refroidissement programmé. Elle est surtout utilisée actuellement pour cryoconserver du matériel indifférencié, tels des suspensions cellulaires ou des cals.
- Déshydratation à l'air. C'est la méthode la plus facilement réalisable pour réduire le contenu en eau de tissus hydratés. Les échantillons sont généralement séchés sous un flux d'air stérile, sous hotte à flux laminaire ; même lorsqu'on utilise une méthode plus simple on recourt à l'introduction du matériel végétal en flacons fermés contenant une quantité déterminée de gel de silice (Uragami *et al.*, 1990). Cette méthode est directement applicable aux graines orthodoxes, embryons zygotiques et au pollen de nombreuses espèces. Une méthodologie de déshydratation ultra rapide a été expérimentée avec un résultat positif pour des embryons zygotiques récalcitrants de certaines espèces parmi lesquelles *Quercus robur* L. (Berjak *et al.*, 2000)
- Capsulage/déshydratation. Cette méthode fut développée par Fabré et Dereuddre (1990) et représente une variante de la méthode de la déshydratation à l'air prévue principalement pour être réalisée sur des pointes méristématiques ou des embryons zygotiques ou somatiques. La technique consiste en premier lieu dans la fabrication d'une "graine artificielle" (tant avec un embryon zygotique ou somatique qu'avec un méristème) au moyen d'une encapsulation en sphères d'alginate de calcium. Celle-ci est obtenue en plongeant le matériel végétal dans une solution d'alginate libre de calcium ; le matériel et la solution sont successivement aspirés à l'aide d'une pipette et répartis dans une solution de Ca^{2+} 100 mM. Le calcium détermine la polymérisation d'alginate autour du matériel végétal et la formation de la capsule d'alginate. On procède ensuite à une déshydratation osmotique consistant à immerger des capsules d'alginate dans une solution de saccharose 0.75 M pour 16-72 heures puis au transfert de celles-ci sous le courant d'air stérile d'une hotte à flux laminaire, ou dans un gel de silice pour 3-8 heures afin de réduire leur contenu en humidité (Benson, *op. cit.*).
- Vitrification. C'est une technique utilisée pour la première fois sur des plantes par Uragami *et al.* (1989) qui, comme précédemment, consiste dans la substitution de l'eau intracellulaire par une solution vitrifiante qui évitera la formation de glace pendant sa transition à l'état vitreux. Le processus débute généralement par la préparation du matériel végétal dans un substrat enrichi d'un agent cryoprotectant comme par exemple le sorbitol 1.2 M pour 1-2 jours. Le matériel est plongé dans la solution vitrifiante (PSV2, composée de glycérol à 30% (v/v), éthylène-glycol à 15% (v/v), DMSO à 15% (v/v) et saccharose 0.4 M) puis maintenu sous de la glace de 20 à 120 minutes. Après le traitement de vitrification le matériel végétal est

directement plongé dans de l'azote liquide. Ce schéma de travail provoque les vitrifications aussi bien intra qu'extra-cellulaire (Benson, *op. cit.* ; Engelman, *op. cit.*). Quinze ans après sa publication la méthode de vitrification est de loin le protocole de cryoconservation le plus utilisé. La réussite de cette procédure peut probablement être attribuée à sa simplicité, sa reproductibilité et au fait qu'elle puisse être appliquée, avec de bons résultats, à une grande variété de tissus et d'espèces végétales (Engelman, *op. cit.*).

- c. Récupération post- congélation. Au moment où l'on place le matériel végétal à température ambiante pour réactiver son développement, peu de précautions sont à prendre. Généralement le matériel végétal est extrait des contenants cryogéniques dans lesquels il a été conservé dans de l'azote liquide et il est placé dans un bain à 25-30°C ou alors simplement laissé à température ambiante (Benson, *op. cit.*). Uniquement dans le cas où le protocole de cryoconservation utilisé inclue une vitrification, le matériel végétal une fois décongelé, passera par une période préalable d'élimination de la solution vitrifiante, en étant maintenu, par exemple, dans du saccharose 1.2 M pendant une heure, puis transféré dans une ambiance fraîche pour sa réactivation.

Application de la cryoconservation au matériel végétal

La cryoconservation peut être appliquée à n'importe quel type de matériel biologique. Ci-dessous sont expliqués quelques uns des progrès réalisés dans le domaine de la cryoconservation de graines orthodoxes et récalcitrantes, ou de plantes rares, endémiques ou menacées.

Les graines orthodoxes (§. 6.9.1) se caractérisent par le fait qu'elles peuvent subir un processus de déshydratation qui réduit considérablement leur contenu en humidité. La conservation de ces graines dans des banques de semences traditionnelles ne présente pas de difficulté, toutefois la cryoconservation a été appliquée aux graines ayant une longévité limitée et/ou aux graines de plantes rares ou menacées. Dans ce cas la technique de cryoconservation est simple et ne nécessite pas beaucoup de temps, vu que les graines sont introduites dans les cryovials (fig. 30) en polypropylène et plongées directement dans l'azote liquide sans traitement préalable. Cette technique a été testée avec des espèces des familles *Asteraceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Cistaceae* et *Scrophulariaceae* (González- Benito, *op. cit.*).



Figure 30 – Tubes de polypropylène pour cryoconservation (*cryovials*). On peut voir le matériel végétal (dans ce cas des bourgeons végétatifs) immergés dans une solution cryoprotectrice avant d'être immergés dans l'azote liquide. (photo: J. Ramírez Luna)

Les graines récalcitrantes (§. 6.9.1) sont caractérisées par un pourcentage élevé d'humidité dans leurs tissus, une sensibilité à la déshydratation (perte de viabilité si elle descend en dessous de certains niveaux) ainsi qu'une conservation difficile. À tout cela on rajoute une considérable sensibilité aux basses températures. La cryoconservation a récemment défié le problème important de la conservation des graines récalcitrantes et quelques possibilités ont été mises au point pour dépasser ces limites. Dans ce cas la stratégie qui a montré les résultats les plus prometteurs consiste à agir sur des embryons, ou des axes embryonnaires isolés. Ceci parce qu'il a été vérifié que si la graine est directement plongée dans de l'azote liquide sa survie après la congélation est pratiquement nulle (Marzalina et Khrisnapillay, 1999). Les embryons sont des structures très petites, très résistantes à la dessiccation et relativement uniformes en dimensions et contenu en humidité (Fu *et al.*, 1993) ; par conséquent ils peuvent être exposés à une déshydratation cryoprotectrice contrôlée (réalisée, par exemple, en condition stérile sous hotte à flux laminaire) avant d'être introduits dans de l'azote liquide, soit directement, soit après un refroidissement progressif. Des expériences positives ont été réalisées avec, par exemple, diverses espèces de *Quercus*, ou des genres ayant des espèces aux graines récalcitrantes et qui sont de grande importance dans les écosystèmes tempérés méditerranéens (González- Benito, *op. cit.*), *Arthocarpus*, *Calamus*, *Elaeis*, *Hevea*, *Nephelium* et *Shorea* (Marzalina et Krisnapillay, *op. cit.*).

Une alternative très prometteuse pour la conservation des embryons consiste dans l'encapsulation suivie de déshydratation. Dans ce cas les embryons zygotiques capsulés sont maintenus pendant différentes périodes de temps sur un substrat liquide avec une concentration élevée en saccharose, après quoi, ils sont partiellement déshydratés sous hotte à flux laminaire ou en utilisant du gel de silice. Ensuite, ils sont directement plongés dans l'azote liquide. Quelques auteurs ont démontré la sensibilité présentée par les embryons de graines récalcitrantes qui se manifeste par des réponses négatives avant l'extraction, action qui présuppose leur séparation physique du reste de la graine (Benson *et al.*, 1996). Quoiqu'un tel phénomène ait été observé avec une fréquence importante chez les espèces tropicales, les symptômes sont habituellement ceux d'un rapide processus oxydatif qui implique fondamentalement les composés phénoliques, ceux-ci provoquent un noircissement aussi bien des tissus que du substrat qui les entourent et par conséquent l'inhibition de la croissance illustrée par les cellules mortes. Dans ce cas, aussi bien la déshydratation par le saccharose que les dessiccations à l'air, sont les techniques les plus communément utilisées pour éviter que les embryons ne souffrent de ces phénomènes oxydatifs délétères.

Quelques auteurs ont même suggéré l'ajout de charbon actif dans le substrat de récupération de post-congélation des embryons, cette technique s'est montrée très efficace pour absorber des composés phénoliques potentiellement nocifs (Nomah et Marzalina, 1996).

La mise en œuvre des techniques de cryoconservation a eu un rôle fondamental dans les progrès de la conservation du matériel végétal de plantes rares ou menacées. Un exemple est illustré avec des orchidées menacées d'extinction comme dans le cas de *Bletilla striata* Rchb.f. (Hirano *et al.*, *op. cit.*). Dans ce cas, des graines immatures de *Bletilla*, récoltées 4 mois après la pollinisation, ont été cryoconservées, avec un pourcentage moyen d'humidité de 33%. Cette procédure a été réalisée en appliquant un protocole de prétraitement et de vitrification. Le prétraitement consiste à maintenir les graines récoltées, dans le substrat "New Dogashima" (ND) (Tokuhara et Mii, 1993) solidifié avec de l'agar à 0,2% et enrichi avec 0.3 M de saccharose. Dans ces conditions les graines sont conservées à 25°C pendant trois jours sous un éclairage continu, avec une intensité de 62.0 mM m. $2 s^{-1}$. Après ce prétraitement les graines sont exposées à un

processus de vitrification qui consiste à introduire dans les cryovials, 2.0 ml de la solution cryoprotectrice (glycérol 2 M et saccharose 0.4 M sur un substrat ND) pendant 15 minutes à 25°C. Après ce temps on élimine la solution et les graines se déshydratent à 0°C pendant 2 heures avec 2.0 ml de solution de vitrification PVS2, qui contient du glycérol à 30% (v/v), de l'éthylène glycol à 15% (p/v) et du diméthyl sulfoxyde à 15% (p/v) sur un substrat ND enrichi avec 0.4 M de saccharose et porté à pH 5.4 (Sakai *et al.*, 1990). Ensuite les cryovials avec les graines sont ensuite directement plongés dans de l'azote liquide.

7.2. Collection active

Outre le matériel destiné à la conservation à long terme, chaque banque doit garantir la disponibilité de lots à utiliser à brève ou moyenne échéance pour des interventions *in situ* (renforcement de populations ou réintroduction) et des semis dirigés en champ, ou pour des activités de conservation *ex situ* telle la régénération, les échanges à travers les *Index Seminum* et les essais expérimentaux pour des recherches scientifiques. Les lots destinés à ces activités vont constituer la "collection active". La modalité de conservation la plus communément utilisée est la réfrigération ; cette procédure permet de stocker des échantillons à une température comprise entre 0 et 10°C et ne nécessite pas d'installations frigorifiques particulières.

7.2.1. Semis

La production de plantes est une étape fondamentale dans la conservation des espèces dont la propagation se réalise normalement par voie sexuée. Si on n'a pas la capacité de reproduire ce matériel, il ne contribue pas à la conservation des accessions de graines d'unité taxonomique. Dans le cadre de la conservation, la production de plantes répond à des objectifs différents, par exemple le renforcement de populations comme support à la conservation *in situ*, ou la création de nouvelles populations ou de collections vivantes *ex situ* ; de la même manière, il est souvent nécessaire de disposer de plantes pour des études scientifiques.

Ce chapitre n'a pas la prétention de donner une description exhaustive de méthodologies et de techniques actuellement disponibles pour la production de plantes ; le but est de reprendre l'expérience acquise pour les cas où la quantité de graines est limitée, situation fréquente avec des unités taxonomiques et/ou des populations menacées.

La mise au point des méthodes de semis et de production de plantes, est très délicate en regard de l'exigence des espèces qui peuvent être très diversifiée et des protocoles qui tendent toujours à être spécifiques à l'espèce. Malgré cela, dans tous les cas, le substrat adéquat est employé et les graines sont placées dans les conditions ambiantes les plus propices à favoriser la germination et à protéger le matériel des agents biotiques ou abiotiques qui peuvent causer des dommages sur la culture (ex. : agent climatique, pathologies, oiseaux et petits mammifères, etc.).

Types de terrines de semis

Pour l'emplacement des terrines, il est souhaitable de choisir un lieu dont il est possible de contrôler la température, l'humidité et la lumière, en considérant que la germination représente l'étape la plus délicate dans le développement de la plante. L'idéal est de disposer de chambres de culture bien isolées, dotées de systèmes de climatisation, avec contrôle de l'humidité, d'un drainage adéquat et de lumière artificielle uniforme, où seront rangés les plateaux et/ou les contenants. En général, ce travail s'effectuant en serres, les paramètres ambiants peuvent beaucoup varier selon le niveau d'automatisation. Lorsque les graines à disposition sont en nombre très limité, il est recommandé d'utiliser des

chambres de germination ou de culture (ex. : phytotron).



Figure 31 – Serre climatisée avec tablette thermo-régulée pour la multiplication des plantules à la Banca del Germoplasma della Sardegna. (photo: E. Mattana)

Au cas où l'on ne dispose pas des structures et des équipements cités, on peut utiliser des tablettes thermo-régulées (fig. 31), dispositifs très économiques au moyen desquels on obtient un contrôle climatique acceptable pour de nombreuses unités taxonomiques (Jiménez *et* Caballero, 1990). En situations extrêmes, il est envisageable de réaliser un semis en plein air, dans un milieu si possible protégé des différents facteurs météorologiques limitant (ex. : vent, rayonnements solaires, gelées, etc.).

Les exigences de chaque espèce sont différentes ; en règle générale il faut essayer de recréer les conditions les plus proches de l'habitat naturel dans lequel l'espèce se trouve. Cela présuppose que, lorsqu'on travaille en même temps avec diverses unités taxonomiques, on ne peut pas concentrer tous les semis dans une même zone de la pépinière ou de la serre. Par exemple pour semer *Anchusa littorea* Moris, *taxon* endémique des aires côtières de la Sardaigne sud-occidentale, il est opportun d'avoir une pépinière dans un lieu exposé à une lumière solaire directe pendant de nombreuses heures, alors qu'un semis d'*Anchusa formosa*, endémique des montagnes du Sulcis, devra être situé dans une zone beaucoup plus ombragée et avec des températures moyennes plus basses. En fonction du nombre d'entités à cultiver, plusieurs sites seront sélectionnés à la pépinière, de façon à regrouper les unités taxonomiques selon leurs exigences. Par exemple on placera ensemble *Anchusa littorea* et des entités typiques de la première ligne côtière, du genre *Limonium* (même si pour celui-ci un substrat différent sera utilisé).

Pour des entités dont les exigences écologiques ne sont pas connues, il est opportun de travailler en conditions de laboratoire, en utilisant les chambres de germination (Thomson, 1979). De cette manière il sera possible de déterminer avec une grande précision les meilleures conditions pour les entités étudiées et arriver ainsi à établir des protocoles de reproduction adéquats (§. 10.2). Une fois la plantule obtenue dans ces conditions, il n'est pas conseillé de la transporter directement en serre. Comme étape intermédiaire, il est recommandé d'effectuer un séjour en laboratoire pendant 3-4 jours afin d'observer son évolution et son développement.

Contenants

Le commerce offre une vaste gamme de contenants, de type et de dimensions variés ; en pépinière on travaille principalement avec des plateaux/plaques troués ou alvéolés de différentes hauteurs et volumes. Lorsqu'on travaille avec de petites quantités de graines

d'entités différentes il devient nécessaire de disposer de nombreux espaces de petites dimensions, en utilisant des plateaux de types variés aux alvéoles de dimensions différentes, en fonction des espèces. Dans la plupart des cas on utilise comme terrine de semis des plateaux en plastique percés au fond (Vilarnau et Gonzalez, 1999) (fig. 32). Ce système permet le semis d'un nombre élevé d'unités sur une petite superficie. Dans le commerce on peut trouver des plateaux réutilisables en plastique flexible, particulièrement adaptés aux entités que l'on n'est pas tenu de cultiver pendant de longues périodes, ils se dégradent relativement facilement sous l'action des rayons solaires et leur manipulation (puisque flexibles) est peu pratique. Ces contenants sont percés pour un drainage standard.

Comme alternative il est conseillé d'utiliser des plateaux en plastique très rigide, de différentes dimensions, à usage alimentaire, en les perçant pour permettre le drainage. L'avantage de ces plateaux est qu'ils résistent longtemps au soleil, sont faciles à utiliser grâce à leur rigidité et permettent d'optimiser les espaces puisqu'on les trouve dans une vaste gamme de dimensions.

Dans quelques cas il est beaucoup plus pratique d'utiliser des plateaux avec des alvéoles. Par exemple, pour les espèces du genre *Limonium* on utilise des plateaux avec des alvéoles de petites dimensions, d'un volume de 40/45 cm³ ; l'appareil radical s'adapte très bien à une structure de ce type et, pour un genre dont le pourcentage de germination est très élevé, on obtient une plantule dans pratiquement toutes les alvéoles. On utilise également ces plateaux pour de nombreuses *Scrophulariaceae*.

En général, il est conseillé d'utiliser des alvéoles pour les espèces ou accessions ayant de hauts pourcentages de germination, non échelonnée, de façon à obtenir une plus grande homogénéité de développement pendant les premières phases de la culture avec un nombre d'alvéoles vides le plus faible possible.

La profondeur du contenant doit être considérée très attentivement lorsqu'on travaille avec des espèces qui atteignent une certaine dimension, comme les arbres qui passent un certain temps dans la terrine de semis avant leur transfert dans des contenants définitifs. Dans ce cas on utilise, des plateaux percés ou alvéolés, hauts d'au moins 18 cm. Pour les récipients alvéolés, faciles à manipuler, utilisés communément pour les arbres qui ont des graines relativement grandes, on conseille ceux de 200 cm³ pour les conifères, et 300 cm³ pour les caducifoliés à fût unique (Ruano, 2003). Eventuellement si la plante reste plus de temps en pépinière, il est conseillé de repoter dans des pots plus grands.

Dès le début du développement des plantules, il est important d'éviter les déformations de l'appareil racinaire, puisque celles-ci tendent à se maintenir et créent des problèmes de stabilité pour les plantes adultes ; le problème est particulièrement grave pour les espèces d'arbre qui nécessitent toujours un bon ancrage. Beaucoup de contenants actuellement dans le commerce, particulièrement ceux destinés à des plantes forestières, ont des dispositifs (ex. : rainures, fentes ou reliefs dans le sens vertical des parois) qui évitent de graves déformations ou le chignonage des racines.

Tous les contenants doivent être désinfectés avant leur usage et/ou réutilisation ; pour ceci on emploie une solution d'eau et d'hypochlorite de sodium à 40% dans laquelle ils sont plongés au moins 30 minutes, puis rincés à l'eau courante.

Substrat

Il n'existe pas de substrat standard et il varie selon l'espèce semée. Les recommandations générales sont : le pH du substrat doit être légèrement acide avec un pouvoir tamponnant, il doit avoir une bonne rétention hydrique et une facilité d'humidification, être de granulométrie fine, de faible densité, avec une forte porosité totale et une bonne capacité d'aération, de structure stable - de sorte que s'il se contracte il n'exerce pas de pressions sur les graines -, dépourvu d'herbes indésirables, de substances phytotoxiques et de parasites, de faible salinité, avec un contenu élevé en

substances organiques, une faible vitesse de décomposition et un niveau suffisant d'assimilation des nutriments (Raymond, 1989).

Pour *Silene cambessedesii* Boiss. et Reut., par exemple, le substrat le plus adéquat est composé à 70% de sable siliceux avec une granulométrie variable entre 2 et 3 mm, puisqu'il s'agit d'une espèce qui pousse en zones psammophiles côtières.



Figure 32 – Plantules de *Silene diclinis* (Lag.) Lainz, semis dans un plateau pour usage alimentaire.
(photo: A. Prada)

Semis et pratiques culturales

Le semis consiste à placer les graines dans le substrat ; il peut être réalisé en utilisant des pincettes de laboratoire ou en mélangeant le lot de graines à du sable fin stérile ou du talc pour une meilleure distribution. La profondeur de semis doit être égale ou inférieure au double de la largeur de la graine (Besnier, 1989). Une méthode qui donne de bons résultats est de recouvrir la terrine de semis d'une fine couche de sable stérile ou de vermiculite dans le but d'empêcher la déshydratation de la partie superficielle et de protéger de l'incidence directe des rayons solaires. Après le semis, il est nécessaire de tasser légèrement le substrat avec la main pour éviter les stagnations ou la perte d'humidité.

L'irrigation se fera toujours avec une eau de qualité, propre et de faible salinité pour éviter des problèmes de phytotoxicité. Il faut garder le substrat avec une humidité constante, en le maintenant au point de saturation et en évitant des excès qui pourraient provoquer des infections fongiques nuisibles aux racines.

Il est vivement conseillé d'utiliser une irrigation par nébulisation ; dans le cas contraire, il faut hydrater les plateaux par le bas (par capillarité), afin d'éviter que des gouttes ne tombent sur les plantules, surtout pour les espèces à feuilles velues qui retiennent beaucoup l'humidité.

La température optimale pour le développement varie selon le taxon ; on considère comme adéquate une température qui oscille autour des 20°C. Toutefois beaucoup d'espèces de climats tempérés ont besoin d'une alternance marquée des températures, comme cela se produit en fin d'hiver-début de printemps, pour pouvoir donner lieu aux processus germinatifs.

De brusques variations de températures peuvent causer des dommages très graves à la germination. Les températures extrêmes pour cultiver les plantes se situent autour de 35°C, dans des conditions de température supérieures la capacité photosynthétique diminue considérablement. Ceci doit être pris en compte dans les serres ou dans les pépinières. Lorsqu'il s'agit de chambres de croissance ou de culture, celles-ci devront

être munies de capteurs d'alarme pour des températures extrêmes.

Pour de nombreuses espèces, les exigences de lumière pour la germination (intensité, photopériode, etc.) ne sont pas connues. Il est évident qu'après la germination, lorsque les feuilles cotylédonaire ou les premières feuilles caulinaires apparaissent, toutes les espèces nécessitent de la lumière. Pendant la phase de croissance il faut éviter les ombrages qui peuvent amener à l'obtention de plantes étiolées.

La fertilisation des plantules s'effectue manuellement, lorsque les deuxièmes feuilles caulinaires se sont développées. Il n'est pas intéressant de l'effectuer dans les phases précédentes pour ne pas provoquer de brûlures des radicelles. On peut utiliser un fertilisant conventionnel du type N-P-K 5-4-6 avec des micro-éléments. Il est aussi possible de se servir de fertilisants à diffusion lente à incorporer pendant la préparation de la terrine. Ce type de fertilisation a par exemple été employé pour *Dianthus turlensis* Pau et Pau et *Teucrium dunense* Sennen, avec un excellent développement des plantes. Habituellement il n'est pas réalisé de traitements herbicides lorsque les plantules sont très petites ; les herbes indésirables peuvent être extirpées manuellement en faisant attention de ne pas endommager les radicelles.

Le repotage est le moment où la plantule est enlevée de la terrine puis placée dans un pot plus grand, qui sera de type différent selon la morphologie, les dimensions de l'appareil radical et le temps de culture estimé. L'instant optimal est différent pour chaque espèce, puisqu'il doit être fait lorsque la plantule est consistante et vigoureuse pour tolérer la manipulation. Par exemple, la plantule de *Carduncellus dianius* Webb avec seulement une paire de feuilles caulinaires a une constitution suffisante pour être transplantée ; les semis d'*Ononis tridentata* L. doivent être repotés avec au moins 2 ou 3 cm de hauteur parce que l'enracinement est important.

Pour avoir un développement vigoureux les plantules d'autres espèces, doivent être repiquées avec 4-6 feuilles caulinaires, comme dans le cas de *Silene diclinis* (Lag.) Lainz (fig. 29). Certaines espèces peuvent rester pendant une longue période dans la terrine sans dépérir comme dans le cas de *Teucrium lepicephalum* Pau. Une autre méthode pour obtenir les plantules de certaines espèces consiste à profiter du matériel obtenu de la banque de graines du sol. Même si elle n'est pas conseillée comme une pratique habituelle, celle-ci peut être réalisée pour déterminer rapidement des protocoles adéquats de germination ou pour obtenir des graines difficiles à récolter avec les méthodologies conventionnelles ou dans un stade adéquat pour leur germination. C'est le cas, par exemple, de *Filago mareotica* Delile, dont les graines, extrêmement petites, se conservent dans le sol et germent au moment où les conditions sont optimales.

En zone méditerranéenne, pendant la période estivale, pour limiter les effets négatifs des fortes radiations solaires, il convient de protéger les plantes de la lumière solaire directe, avec des ombrages ou des structures pourvues de toiles d'ombrages de différentes matières (polypropylène, etc.) avec divers pourcentages d'ombrage.

Pendant tout le procédé, de la préparation pour le semis à la destination finale de la plante, on doit annoter dans la fiche appropriée (§. 13.14) toutes les opérations réalisées et les résultats obtenus, les conditions et le lieu dans lequel se trouve le matériel, ainsi que toute autre information ayant quelque intérêt.

7.2.2. Index Seminum

Le matériel utilisé pour les échanges avec les autres organismes de recherche, à travers les *Index Seminum*, est conservé en flacons de plastique scellés avec du parafilm ou en sachets en aluminium à triple couche ou en matière plastique contenant un minimum de 20 graines et un indicateur d'humidité. L'organisme qui recevra le matériel sera informé sur la provenance, le traitement subi par le matériel, les contrôles effectués et les conditions optimales de germination, grâce à une copie des fiches de terrain et de laboratoire relatives à l'accession.

La liste des accessions disponibles pour les échanges et leur quantité (en grammes et/ou en nombre de graines), doit être disponible et mise à jour périodiquement, par des publications, notices, catalogues, pages web, etc.

La demande de matériel, appelée *desiderata*, se fait habituellement par la compilation de formulaires appropriés, de cartes et/ou électroniques, selon les procédures de l'institution. Les formulaires de demande de graines de l'*Asociación Ibero-Macaronésica de Jardines Botánicos* (<http://www.aimib.org/>) et ceux de la *Banque du Germoplasma della Sardegna* (<http://www.ccb-sardegna.it/>) en sont des exemples.

Un élément important de contrôle et de collaboration entre banques peut être représenté par l'échange d'informations sur le matériel demandé ; en particulier la banque qui reçoit le matériel devrait transmettre une série d'informations relatives à chaque lot de graines reçu, et en particulier :

- destination du lot reçu (ex. : Banque de semences, collection de graines, collection de plantes vivantes, recherche, etc.) ;
- germination (pourcentage, éventuels prétraitements et conditions de germination, nombre de plantules obtenues) ;
- viabilité des graines ;
- éventuels doutes de détermination du taxon.

7.2.3. Duplication des collections

Une autre action importante à acter entre les institutions impliquées dans la conservation *ex situ* est celle de la duplication des collections. De cette manière on peut obtenir une grande sûreté sur la disponibilité du matériel végétal, même dans le cas des pannes techniques ou d'autres ennuis qui peuvent préjuger sur l'état de conservation des collections maintenues dans une banque.

L'échange de matériel végétal, comme il a été établi par exemple dans le cadre du programme Interreg IIIB Genmedoc, se produit après la signature d'un protocole approprié entre les institutions, dans les modalités qui ont été établies entre les parties en ce qui concerne la quantité du matériel et la méthode de conservation utilisée.

Un point fondamental de l'échange est celui relatif à la "propriété du matériel végétal". L'organisme qui envoie le matériel reste l'unique propriétaire de celui-ci, et peut à tout instant demander qu'il lui soit rendu, pour des exigences de la conservation *in situ* ; l'organisme recevant est donc seulement un gardien de matériel végétal.

L'échange des lots de graines est soumis au régime phytosanitaire établi par les autorités nationales et internationales compétentes (§. 5.2.3).

7.3. Méthode de conservation du pollen

Il est préférable de conserver le pollen en petits aliquotes plutôt que dans un unique contenant. Ceci parce qu'on peut prendre la quantité nécessaire sans interférer sur la conservation du lot entier. En outre plus la quantité conservée est limitée, plus homogènes seront les conditions de conservation des grains.

Théoriquement le pollen de chaque espèce a des conditions idéales de stockage, mais tous les grains de pollen ne peuvent pas être conservés avec les mêmes techniques (Hoekstra, 1995). La teneur en eau et les hydrates de carbone de réserve des grains semblent être les caractéristiques qui influencent les modalités de conservation du pollen (Pacini *et* Hesse, 2005). En particulier les grains avec une forte teneur en eau, comme ceux des *Poaceae*, se conservent avec de grandes difficultés (Barnabas *et* Rajki, *op. cit.*) par rapport à ceux partiellement hydratés.

Ci-dessous sont énumérées et décrites les méthodes de stockage les plus employées :

- Conservation à basses températures et faible humidité relative. Les récipients de conservation des grains peuvent être de petites éprouvettes, ou mieux des eppendorf en plastique qui ne doivent pas être cachetés. Les éprouvettes sont conservées à l'intérieur d'un dessiccateur dans lequel la température peut être maintenue entre -20 et + 4°C et l'humidité relative inférieure à 10%. Pour assurer ces conditions ambiantes, du gel de silice est déposé à l'intérieur du dessiccateur qui est placé, selon les températures, dans un réfrigérateur ou un congélateur. Cette méthode est, entre autres, employée pour sa simplicité et permet de conserver le pollen quelques mois. Toutefois cette méthodologie n'est pas conseillée pour conserver le pollen des céréales ou les pollens partiellement hydratés.
- Conservation à basses températures sous vide. Cette méthode prévoit une congélation rapide du pollen à -60 -80°C et le déplacement progressif, incomplet, de l'eau par sublimation. Après ce traitement le pollen doit être maintenu à des températures justes sous 0°C. Cette méthode permet de conserver le pollen longtemps, et même quelques années.
- Conservation à de très basses températures (cryoconservation). Avec cette méthode, la teneur en eau est abaissée jusqu'à un seuil déterminé et donc le pollen est plongé et conservé dans de l'azote liquide. C'est la méthode la plus employée depuis ces dernières années et elle permet une conservation correcte sur de longues périodes. Contrairement aux deux méthodes précédentes on peut l'employer pour le pollen des céréales, en effectuant une lente déshydratation à 20°C et 20-40% d'humidité relative.
- Conservation en solvants organiques. Cette méthode évite les problèmes corrélés au maintien de l'humidité relative, en outre les grains peuvent être transportés d'un lieu à un autre sans avoir besoin d'être conservés à de basses températures. Avant le stockage dans la plupart des solvants (acétone, benzène, éther de pétrole, xylène, toluène) le pollen doit être de toute façon déshydraté. Il est possible d'employer aussi d'autres solvants mais ceux-ci influent sur la viabilité. Cette méthode a été testée sur peu d'espèces et n'est pas d'un usage courant.

Indépendamment de la méthode employée, le passage du pollen, conservé dans les conditions décrites ci-dessus, à des conditions ambiantes ou de laboratoire est critique. C'est pourquoi, s'il a été conservé à basses températures, la décongélation doit être lente et il faut aussi prévoir une lente réhydratation. Le procédé se termine en plaçant l'éprouvette, ou mieux, le pollen, disposé sur une surface plane, dans un récipient à forte humidité relative obtenue grâce à la présence de papier filtre imbibé. Avant d'utiliser le pollen conservé selon quelque mode que ce soit, il est conseillé d'en vérifier la viabilité (§. 4.6.4).

7.4. Conservation du matériel végétatif

La conservation du matériel végétatif peut être une bonne méthode, parfois l'unique, pour la conservation d'un génotype, d'une unité taxonomique ou d'une population. Cette technique est adoptée dans le cas de populations en grave danger d'extinction, de populations ou d'individus qui ne produisent pas de graines ou en produisent une infime quantité. Elle peut être très utile lorsqu'on suppose une réduction de la variabilité génétique de la descendance par rapport à la génération parentale (par exemple des populations de *taxa* dioïque avec un nombre d'individus mâles très réduit), lorsqu'on veut conserver un génotype déterminé qui présente des caractères particuliers ou pour des populations dont les graines pourraient être fécondées avec du pollen n'appartenant pas

au même individu (introgression avec des espèces allochtones ou avec des géotypes de provenance non autochtone ou méconnue). En outre c'est une bonne stratégie de conservation pour les espèces qui se propagent très facilement par agamie, comme les *Salicaceae* (§. 10.3), ou pour les espèces ayant des graines récalcitrantes.

En principe il est possible d'utiliser une quelconque partie de la plante pour la propagation végétative. En tenant compte des méthodologies de propagation classiques, les matériels les plus utilisés sont les boutures herbacées et ligneuses, les appareils racinaires, les rhizomes, les tubercules et les bulbes. Ensuite il faut se référer aux époques de récolte et aux possibilités de conservation de ces matériels jusqu'au moment de leur propagation. La technique est choisie selon l'espèce, l'âge de la plante mère, les substrats disponibles et la technique de conservation. L'apparition de changements phénotypiques est liée à la provenance du matériel, et de la partie prélevée (plantes mères ou parties de plantes), en général les résultats de propagation obtenus sont meilleurs lorsque ces plantes sont jeunes ou lorsque le matériel prélevé est issu de jeunes rejets.

Les boutures ligneuses (fig. 33) sont très utilisées pour les espèces caducifoliées (ex. : *Salix*, *Populus*, *Tamarix*, *Laburnum*, *Cornus*, *Rosa*, *Ribes*, *Vitis*, etc.) parce qu'elles se conservent pendant un certain temps et ne demandent habituellement pas de traitements compliqués dans la phase d'enracinement. Elles sont prélevées pendant le cycle biologique de la plante, généralement avec du bois du cycle de croissance antérieure. Le matériel est taillé sur la portion basale et centrale de branches vigoureuses, mais avec des entrenœuds de croissance modérée. Généralement sur le terrain, on récolte des branches entières et ce n'est qu'à l'arrivée dans les laboratoires et dans les pépinières que les boutures sont préparées. Il faut utiliser des ciseaux ou des cisailles bien tranchantes de façon à obtenir une coupe nette. D'habitude une coupe oblique est pratiquée à une des deux extrémités pour indiquer la polarité de la bouture qui sera mise du bon côté au moment de la plantation.



Figure 33 – Multiplication par bouturage au CBNM de Porquerolles. (photo: G. Bacchetta)

Les dimensions des boutures sont très variables selon l'espèce, cependant habituellement leur longueur est de 10 à 20 cm, avec un diamètre compris entre 0.6 et 2.5 cm. Les boutures doivent avoir au minimum deux bourgeons en bon état. La coupe basale doit être effectuée immédiatement au dessous d'un nœud et la coupe supérieure à environ 2 cm au-dessus du nœud suivant. Ce type de bouture peut être conservé en maintenant une forte humidité, mais en évitant la prolifération de champignons, à une température comprise entre 0 et 5°C. Pour les espèces s'enracinant facilement, comme les *Salicaceae*, le matériel peut se conserver directement dans ces conditions après sa récolte sur le terrain et c'est seulement au moment de la mise en place que les boutures seront coupées. Le matériel est conservé habituellement en bouquet, en maintenant la

polarité des boutures, c'est-à-dire avec les parties basales orientées du même côté.

Les boutures ligneuses des espèces à feuillage persistant présentent d'habitude des difficultés majeures d'enracinement par rapport aux premières. Elles sont récoltées en principe entre la fin de l'hiver et le début du printemps ou la fin de l'été selon l'espèce. Dans le cas des feuillus persistants, les feuilles ou des parties de celles-ci sont coupées pour éviter leur dessèchement. Pour le transport il convient de les envelopper dans un linge humide et de les préparer rapidement pour l'enracinement dans une ambiance contrôlée.

Les boutures herbacées (ex. : *Myrtus*, quelques *Rosaceae*, *Acer*) ou seulement partiellement lignifiées (ex. : *Eunonymus*, *Erica*, *Calluna*, *Viburnum*, *Nerium*, *Rosmarinus*, *Santolina*, *Taxus*, *Prunus*, *Ilex*, *Lonicera*, *Rhododendrum*) sont récoltées habituellement au printemps et en été. Elles doivent être protégées de la perte d'humidité et mises à raciner le plus rapidement possible dans une ambiance climatiquement contrôlée. La longueur de ce type de bouture varie selon l'espèce ; habituellement leur longueur varie de 3 à 6 cm, au maximum 10 cm.

Les boutures racinaires doivent être recueillies pendant la période de repos végétatif, généralement à la fin de l'hiver ou au début du printemps. Pendant le recueil et le transport il faut maintenir le matériel humide, en ayant soin de marquer la polarité, comme pour les autres boutures. Pour ce matériel la conservation est impossible et il doit être planté rapidement, dans une ambiance contrôlée ou sans protection selon les exigences de l'espèce. Les espèces des genres *Acer*, *Populus*, *Malus*, *Rhus*, *Rosa*, *Rubus* et *Ulmus* se propagent relativement facilement par boutures racinaires.

Pour les boutures feuillées ou les boutures de bourgeons foliaires, issues habituellement d'espèces à feuilles persistantes, il est intéressant de récolter des branches pour éviter le dessèchement auquel elles sont très sensibles. Les feuilles sélectionnées pour la propagation doivent être saines et avec une croissance active, et dans le cas de boutures avec des bourgeons, ceux-ci doivent être bien développés. Les boutures doivent être coupées, et plantées le plus rapidement possible dans le substrat adapté à leur enracinement.

Dans le cas de greffes à greffons (rameaux détachés), surtout chez les feuillus, le matériel doit être récolté de préférence sur la portion centrale et basale de branches vigoureuses d'un an ou moins, présentant des bourgeons végétatifs sains, et en évitant si possible le sommet et la zone d'insertion des branches. Pour *Pinus*, les greffons sont habituellement prélevés sur la zone distale des branches dominantes avec des bourgeons vigoureux. Chez les feuillus caducifoliés le matériel peut être récolté à tout moment de l'hiver et conservé, en évitant sa dessiccation, jusqu'au moment de la greffe. Dans le cas des pins, le matériel se récolte d'habitude au début du printemps et il se greffe le plus vite possible ; le matériel des conifères peut être récolté aussi en été, mais il doit être greffé immédiatement en ambiance contrôlée ou rapidement après la récolte dans le cas de greffons peu ou pas lignifiés.

Pour une greffe de bourgeons, il convient de sélectionner des bourgeons végétatifs bien développés. Sur le terrain, les branches sont coupées et les feuilles situées à l'insertion du bourgeon à greffer sont éliminées en laissant un morceau de pétiole qui facilitera l'action de la greffe. Les bourgeons s'extraient immédiatement avant la greffe, qui devra s'effectuer au plus tôt. Le moment de la récolte du matériel dépend de l'espèce, mais aussi des conditions climatiques, de sorte qu'en zones chaudes ou en serre il est possible de pratiquer une greffe de bourgeons en activité (printemps), tandis qu'en milieux froids il faut employer des bourgeons au repos, entre juillet et septembre. Pour ce type de matériel de greffes, comme dans les autres cas, il faut éviter le dessèchement en les enveloppant de papier humide pendant le transport.

La récolte de matériel de plantes bulbeuses est un cas particulier. Habituellement le moment le plus adéquat est celui du repos végétatif, en été ou en hiver selon l'espèce, lorsque la partie épigée est complètement sèche. Les bulbes sont extraits manuellement

ou à l'aide d'une pioche ou autre matériel de jardinage. Au laboratoire ou à la pépinière, ils sont lavés, désinfectés avec des fongicides et mis à sécher à l'ombre. Les racines ensuite sont coupées, nettoyées de la terre et les bulbilles éventuellement sont séparées. L'humidité la plus adéquate pour la conservation des bulbes dépend de l'espèce ; certaines ne tolèrent pas la dessiccation, en particulier les bulbes squameux (ex. : *Lilium*), qui doivent être conservés sur sable, vermiculite, sciure, tourbe ou un quelconque autre matériau qui maintient une certaine teneur en humidité. En général, les bulbes avec tunique (ex. : *Narcissus*) se conservent bien en enveloppes de papier en milieu frais et aéré, à l'abri de températures extrêmes jusqu'au moment de leur culture. Il est conseillé de traiter le matériel végétatif avec des fongicides ; dans le cas des bulbes et des boutures lignifiées, le traitement s'effectue, à titre préventif, avant ou pendant la conservation, alors que pour les boutures herbacées ou les racines, qui ne tolèrent généralement pas une période allongée de conservation, le traitement se réalise au moment de la propagation ou pendant la période d'enracinement. Dans tous les cas il est indispensable faire attention à ce que le matériel soit parfaitement étiqueté du moment de la récolte jusqu'à la phase de propagation.

Pour une description détaillée des différentes méthodes de propagation, il est conseillé de consulter des ouvrages plus spécifiques tels ceux de Hartmann et Kester (1983) et MacDonald (1987). Le cas particulier de la propagation des *Salicaceae* est traité de façon détaillée dans le paragraphe 10.3. En effet cette famille réunit un grand nombre d'espèces de la végétation des ripisylves et certaines d'entre elles, comme *Populus nigra* sont, dans certaines régions, menacées, et leur conservation doit donc être considérée comme un objectif prioritaire.

8. GERMINATION

Les tests de germination sont nécessaires pour la gestion correcte des accessions présentes dans une banque de semences. Ces tests peuvent avoir différents objectifs : en premier lieu amener à l'élaboration d'un protocole efficace pour le *taxon*, pour la banque elle-même ou pour une autre banque. Ce protocole sera essentiel pour arriver, dans un deuxième temps, au suivi de la qualité des lots de graines conservés. Un autre but de la mise au point du protocole de germination pour une espèce est de pouvoir la cultiver en pépinière et permettre à la plantule de compléter son cycle phénologique. Parfois il peut arriver que les conditions optimales de germination en laboratoire ne coïncident pas avec les résultats expérimentaux en champ et la culture de l'espèce multipliée. De telles discordances méthodologiques sont souvent imputables à des causes contingentes et peuvent dépendre non seulement des variations de température, de la photopériode et du substrat, mais aussi des précipitations et des conditions d'humidité relative.

8.1. Définition de la germination

Au niveau physiologique la germination est un ensemble d'événements qui débute avec l'imbibition de la graine et l'activation des processus métaboliques pré-germinatifs, continue avec l'allongement de la radicule et se termine finalement avec la rupture des téguments de la graine.

D'un point de vue pratique et surtout observable en laboratoire, on définit comme germination la rupture des téguments observée par l'allongement de la radicule ou, en absence de tégument, de l'allongement visible de celle-ci (Côme, 1970). L'objectif de la germination est de faire naître une plantule à partir d'une graine viable que l'on place dans les conditions optimales pour passer de la vie latente à la vie active (Musmarra, 1996). Les méthodes officielles d'analyse pour les semences (*Ministero Agricoltura e*

Foreste, 1993) signalent que la finalité de l'essai de germination en laboratoire est de déterminer le pourcentage du nombre de graines capables de produire des plantules normales, potentiellement en mesure de se développer en plantes normales dans des conditions favorables de culture. Cette définition coïncide avec celle de l'*International Seed Testing Association*, qui dit textuellement : "la germination d'une graine dans le cadre d'un test de laboratoire est l'émergence et le développement d'une plantule jusqu'au stade où l'aspect de ses structures essentielles indique au moins sa capacité à se développer ultérieurement en une plante satisfaisante dans des conditions de culture favorables" (ISTA, 2004). Pour obtenir la germination il est nécessaire que soient respectées une série de conditions :

- La graine doit être viable, mûre et non dormante ; si elle est dormante, il faut exécuter les prétraitements nécessaires pour éliminer les inhibitions à la germination (§. 8,3 et 8.4) ;
- La graine doit être placée dans des conditions ambiantes contrôlées en ce qui concerne l'eau, la température, l'oxygène et la lumière.

8.2. Facteurs externes et germination

Ci-dessous, sont spécifiés les principaux facteurs externes qui déterminent le début du processus de germination et influencent aussi les phases suivantes.

8.2.1. Eau

Elle doit être à l'état liquide ; les besoins en eau sont variables d'une espèce à l'autre. Il existe une quantité d'eau qui ne doit pas être dépassée sinon la germination sera impossible. En effet dans ce cas l'embryon entre en condition d'anoxie. D'autre part pour quelques graines (ex. : plantes aquatiques, jonc, riz) la germination a lieu seulement lorsque les graines sont totalement immergées. Egalement, si les téguments sont impeméables à l'eau la germination n'aura pas lieu.

La réhydratation des graines casse les téguments afin de permettre la croissance de la radicule. En conditions naturelles, l'eau du sol n'est pas utilisable dans sa totalité ; selon la nature du sol l'eau est en effet plus ou moins liée par les colloïdes du sol. Les graines développent une force qui doit contrebalancer la rétention d'eau du sol. Une augmentation de la pression osmotique du sol entrave considérablement la germination (par exemple l'ajout de NaCl dans l'eau d'imbibition peut ralentir considérablement la capacité germinative d'une espèce). Pour cette raison, pendant la conduite d'un test de germination en laboratoire, l'emploi d'eau distillée ou déminéralisée permet d'avoir des conditions reproductibles.

8.2.2. Température

Elle doit être compatible avec les exigences de l'espèce, elle agit sur la vitesse des réactions biochimiques et donc sur la vitesse de germination. Une température inadéquate peut même induire une dormance de type secondaire.

Mener la germination à température constante ou avec un régime de températures alternées peut fournir des résultats différents soit par le nombre total de graines germées soit par une modification de la vitesse de germination. Les exigences thermiques sont variables selon l'espèce et son origine géographique : certaines espèces peuvent demander des températures très basses (ex. : 5°C pour *Tulipa* et *Fagus sylvatica*) ou bien élevées. L'amplitude de l'intervalle des températures optimales peut varier avec l'espèce et avec le degré de dormance de la graine.

Finalement l'interaction avec l'oxygène et l'absence ou la présence de lumière pendant la germination exige une rigueur exemplaire dans la conduite de l'essai pour déterminer les caractéristiques geminatives d'une espèce.

8.2.3. Oxygène

Selon l'espèce, le besoin en oxygène est variable. Il existe des teneurs optimales pour une germination maximum. Seul l'oxygène dissout dans l'eau d'imbibition est utilisé par l'embryon pour ses besoins métaboliques. Ce gaz est très peu soluble dans l'eau, sa solubilité est inversement proportionnelle à la température. Il s'agit par conséquent d'un des paramètres les plus difficiles à contrôler dans un laboratoire de banque de semences car il nécessite des instruments particuliers. Toutefois il ne faut pas négliger l'effet de ce paramètre pendant les essais pour la détermination d'un protocole de germination efficace.

8.2.4. Lumière

La lumière favorise la germination de la plupart des graines qui, par conséquent, sont dites à photosensibilité positive. D'autres ne gèrent par contre qu'à l'obscurité (ex. : *Cyclamen*) et sont donc dites à photosensibilité négative. D'autres encore sont indifférentes. Le mécanisme de la photosensibilité a fait l'objet de nombreuses études menées par Baskin et Baskin (1998) qui ont amené à la découverte d'un système photorécepteur : le phytochrome. Ce système est constitué d'un pigment localisé dans l'embryon. La photosensibilité s'apprécie avec l'emploi de lumière blanche sur des graines intactes et fraîches. Cette photosensibilité peut disparaître suite à la conservation au sec et aussi pour les embryons isolés (détégumentés), ce qui signifierait que cette sensibilité provient des téguments (Côme, *op.cit.*).

L'influence de la lumière sur la germination de nombreuses espèces méditerranéennes a aussi été étudiée par Thanos (Thanos *et al.*, 1991; Thanos *et al.*, 1994; Thanos *et Doussi*, 1995).

Expérimentation pour déterminer la sensibilité à la lumière

La caractéristique essentielle des réponses régies par le phytochrome est leur réversibilité : elles sont activées par les longueurs d'onde de 660 nm (Rouge clair, RC) et interdites ou bloquées par les longueurs d'ondes de 730 nm (Rouge sombre, RS).

L'objectif de l'essai est de mettre en évidence la réversibilité de l'induction à la germination par la lumière. Les akènes de laitue (*Lactuca sativa* L. var. Grand Rapids) ont une photosensibilité très marquée qui a permis de déterminer ce phénomène. Ci-dessous est présenté le protocole élaboré à partir de cette expérimentation.

1 – Les filtres.

Le dispositif permet de réaliser différents types d'éclairage sans recourir à une chambre obscure. Il est constitué de deux filtres et d'un linge noir insérés dans deux tubes cylindriques en PVC. Le premier tube (filtre rouge) permet de créer un éclairage RC, la superposition du second tube (filtre bleu) permet d'obtenir un éclairage RS et la superposition du linge noir sur les deux filtres établit l'obscurité. Il est important de vérifier, avant d'entamer le test, de pouvoir disposer de 12 dispositifs complets (chacun avec les deux filtres et le linge).

2 – Préparation des boîtes de Pétri.

Disposer 2 ou 3 feuilles de papier filtre dans 12 boîtes de 36 mm. Humidifier suffisamment avec de l'eau distillée. Dans les couvercles des capsules compter 10 akènes. Lorsque les

12 lots sont prêts, mettre les akènes sur le papier filtre et couvrir immédiatement avec les deux filtres et le linge noir pour éviter une exposition à la lumière blanche.

3 – Exposition des akènes.

Poser les 12 boîtes, couvertes des filtres et du linge sous les tubes fluorescents. On réalise 2 essais de 6 répliques.

- Influence du temps d'exposition à la lumière RC. Enlever les tissus noirs de six capsules et les exposer pendant deux heures à la lumière avec les deux filtres superposés (éclairage RS). Pour réaliser un éclairage RC il suffit d'enlever le filtre bleu pour 0., 5., 10., 20., 40 et 60 secondes en n'oubliant pas de remettre le filtre et le tissu noir au terme du temps d'exposition.
- Influence du temps d'exposition à la lumière RS. Enlever les tissus noirs des six capsules restantes et les exposer pendant 30 minutes avec les deux filtres superposés (éclairage RS). Enlever donc les six filtres bleus pour 5 minutes (éclairage RC). Remettre les filtres bleus (éclairage RS) pour des temps variables : 0., 2., 4., 10., 30 et soixante minutes. Ne pas oublier de remettre le linge noir à la fin de l'exposition RS.

4 – Germination.

Laisser les 12 boîtes recouvertes des deux filtres et du linge noir pendant 2-5 jours à température ambiante et compter le nombre d'akènes germés par boîte. Représenter les deux essais sous la forme de deux courbes de germination :

- essai 1 : % de germination en fonction du temps d'exposition au RC
- essai 2 : % de germination en fonction du temps d'exposition au RS.

8.3. Obstacles à la germination: les dormances

Après avoir atteint sa maturité morphologique, la graine se trouve dans un état de vie ralentie ; pour son retour à la vie active, il est nécessaire que les conditions extérieures soient favorables et qu'elle ait atteint sa maturité physiologique. Dans de nombreux cas il n'y a pas de dormance, la maturité morphologique et la maturité physiologique sont atteintes en même temps. Au contraire si la maturité physiologique est atteinte plus tard les graines sont définies comme "domantes". La dormance est donc l'état physiologique dans lequel se trouvent une graine ou un embryon qui, placés en conditions favorables à la germination, sont incapables de germer (Côme, *op. cit.*).

De nombreux auteurs ont défini les types de dormances, on doit d'excellentes études à Baskin *et* Baskin (1998), Côme (1970) et Côme *et* Corbineau (1992), mais on propose ici le classement de Nikolaeva (1969) plus simple, qui détermine deux grands groupes de dormances : de type endogènes ou exogènes. Dans le premier groupe l'embryon est habituellement impliqué, tandis que dans le second seulement quelques structures (endocarpe ligneux, tégument séminal, endospeme, etc.) qui l'entourent empêchent la germination. Lorsque la cause de non germination ne réside que dans les téguments, on parle d'inhibition tégumentaire (Côme, *op. cit.*). Les inhibiteurs tégumentaires sont principalement constitués de substances aromatiques ou de mélanges phénoliques (ex. : *Apiaceae*). Souvent les téguments mêmes peuvent constituer un facteur d'inhibition de la germination en empêchant l'imbibition et les échanges gazeux (ex. : *Fabaceae*) ou en empêchant la sortie de la radicule (ex. : *Prunus* sp. pl.).

Il peut y avoir, en outre, des combinaisons de dormances endogènes. Les causes spécifiques qui empêchent la germination, dans le cadre des dormances endogènes ou exogènes et les conditions pour les lever sont illustrées dans le tab. 3. S'il y a plusieurs causes qui induisent la dormance (combinaison de dormances), il y aura un prétraitement

pour chacune d'elles.

TYPE DE DORMANCES		CAUSE	PRETRAITEMENTS	EXEMPLES
DORMANCE EXOGENE	PHYSIQUE (A ₁)	Imperméabilité des téguments à l'eau	Scarification	<i>Astragalus maritimus</i> Moiss <i>Astragalus verrucosus</i> Moiss <i>Robinia pseudoacacia</i> L. <i>Laburnum anagyroides</i> Medik. s.l.
	CHIMIQUE (A ₂)	Présence de facteurs inhibiteurs dans le péricarpe (peu fréquent), quelquefois à l'extérieur du fruit	Enlèvement du péricarpe, quelquefois avec lavage	<i>Ferula toscosii</i> (Lange in Willk. et Lange) Willk. <i>Fraxinus chinensis</i> Roxb. subsp. <i>rhynchophylla</i> (Hance) A.E. Murray <i>Acer pseudoplatanus</i> L.
	MECANIQUE (A ₃)	Résistance mécanique des téguments à la croissance de l'embryon	Enlèvement des téguments	<i>Euphorbia graminifolia</i> Vill. <i>Elaeagnus angustifolia</i> L.
DORMANCE ENDOGENE	MORPHOLOGIQUE (B)	Développement incomplet de l'embryon; apparaît seulement combiné à d'autres facteurs	Estivation	<i>Acis nicaeense</i> (Ardoino) Ledo, A.P. Davis et M.B. Crespo
	PHYSIOLOGIQUE (C)	Mécanismes physiologiques d'inhibition de la germination		
	LEGERE (C ₁)		Brève période de vernalisation, Substance stimulant la croissance	<i>Linaria arcusangeli</i> Atzei et Camarda <i>Betula pubescens</i> Ehrh.
	INTERMEDIAIRE (C ₂)		Longue période de vernalisation, gibberelline	<i>Nothofagus obliqua</i> (Mirb.) Oerst.
	PROFONDE (C ₃)		Vernalisation très prolongée	<i>Sorbus aucuparia</i> L.
COMBINAISON DE DORMANCE ENDOGENE MORPHO-PHYSIOLOGIQUE (développement incomplet de l'embryon combiné à des mécanismes physiologiques d'inhibition de la germination)	(B+C)		Généralement un long traitement thermique avec alternance de températures	Très fréquente chez les <i>Rosaceae</i>
	(B+C ₃)		Longue estivation suivie d'une longue vernalisation	<i>Fraxinus excelsior</i> L. <i>Vitex agnus-castus</i> L. <i>Paeonia</i> sp. pl.

Tableau 3 – Dormances endogènes et exogènes, et prétraitements appropriés pour les enlever.

Si pendant le test de germination ou après le semis les graines non dormantes (parce que déjà soumises à un prétraitement pour l'élimination de leur dormance, §. 8.4) sont exposées à des conditions ambiantes défavorables (température élevée, anoxie, excès d'eau, etc), il peut se produire des mécanismes physiologiques de blocage de la germination (Côme *et* Corbineau, 1992). Il en résulte des "dormances induites ou secondaires", appelées ainsi pour les différencier de la "dormance primaire" (celle présente au moment de la dissémination).

Très souvent les graines sujettes à la dormance secondaire, gement de préférence pendant des cycles journaliers de températures alternées très marquées, comme cela se produit à fin de l'hiver et au début du printemps (nuits froides et jours chauds). Dans ce cas, les semences tardives exposées à des températures trop élevées peuvent entrer en dormance secondaire et ne germent pas.

8.3.1. Méthode pratique pour déterminer le type de dormance des semences non déshydratées

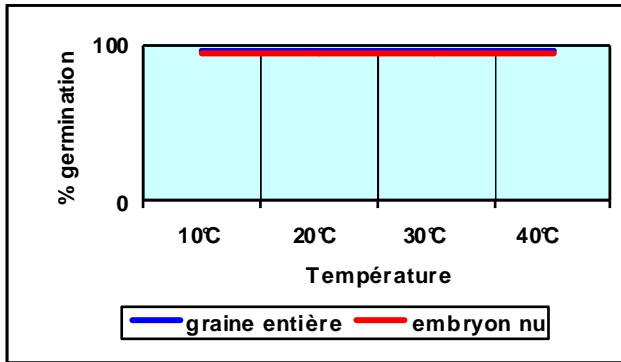
Dans le cas où, suite à différents tests expérimentaux, on obtient de faibles valeurs de germination, il est indispensable de rechercher les causes possibles de ces résultats négatifs. Celles-ci peuvent avoir pour origine soit un type de dormance, soit la viabilité insuffisante du lot de graines. Pour déterminer si les semences examinées présentent un type de dormance il est possible de procéder selon le schéma suivant :

- exécuter les essais sur du matériel fraîchement récolté ;
- déterminer s'il s'agit de graines orthodoxes ou récalcitrantes à la conservation (Hong *et* Ellis, 1996) ;
- examiner la structure des semences (Martin, 1946) et vérifier que les semences sont bien développées et bien formées ;
- faire germer à l'obscurité, à des températures comprises entre 0 et 30°C, des graines entières et des embryons isolés, puis analyser le résultat obtenu (fig. 30) ;
- si nécessaire, évaluer l'existence d'une photosensibilité positive ou négative en utilisant des semences entières et effectuer l'essai de germination à la lumière et à température élevée (20-30°C) ;
- vérifier la présence de composés phénoliques dans les téguments ;
- vérifier l'imperméabilité à l'eau ;
- déterminer l'effet des traitements particuliers tels le froid humide, la conservation au sec et les GA3 ;
- vérifier l'effet de l'oxygène.

Si, suite à ces vérifications, le nombre de graines germées donne un résultat insuffisant ou inférieur à 50% mais que les tissus sont encore intacts, il est bien de soumettre les graines à un test de vitalité (ex. : test colorimétrique au tétrazolium).

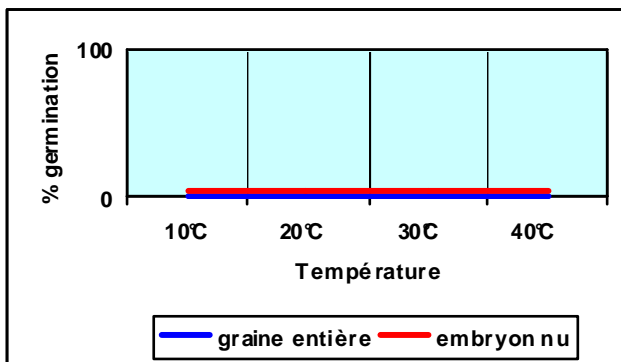
Ci-dessous (fig. 34) sont illustrées par des exemples les diverses réponses possibles des graines entières et des embryons isolés soumis à des essais de germination conduit dans une vaste gamme de températures. Ces tests peuvent mettre en évidence la présence et le type de dormance éventuelle. Une autre approche pour identifier le type de dormance présente dans un lot ou pour une espèce pour laquelle on n'a pas d'information, est décrite dans le paragraphe 10.2. Dans ce cas, les exigences écophysiological pour la germination sont déterminées par la simulation des cycles saisonniers caractéristiques de l'aire de distribution de l'espèce en question.

Figure 34 – Comportements des semences entières et des embryons dénudés pendant l'essai de germination conduit pour identifier la présence et le type d'une dormance éventuelle.



1 - AUCUNE DORMANCE

Semences entières ou embryons dénudés ; valeurs maximales à toutes les températures.
(ex : *Pancratium maritimum* L.)

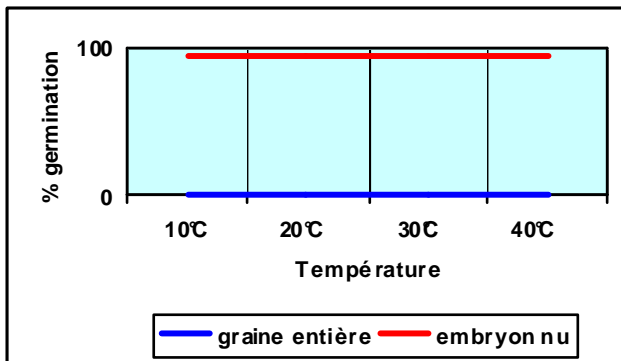


2 – DORMANCE EMBRYONNAIRE A TOUTES LES TEMPERATURES

Semences entières ou embryons dénudés : aucune germination quelle que soit la température.

Hypothèse 1 : dormance embryonnaire s'exprimant à toutes les températures (ex : *Delphinium pictum* Willd.)
Hypothèse 2 : semences non viables

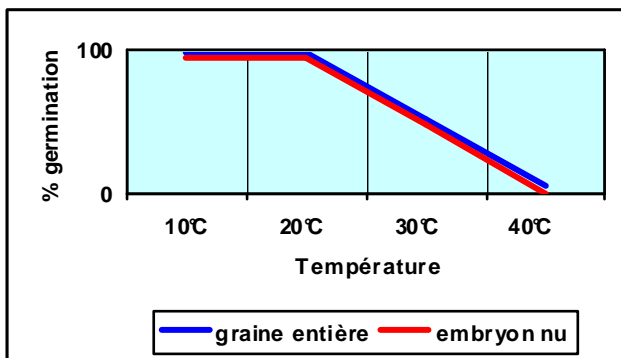
Figure 34 (cont.)



3 - AUCUNE DORMANCE EMBRYONNAIRE, INHIBITION TEGUMENTAIRE A TOUTES LES TEMPERATURES

Les embryons dénudés germent à toutes les températures, alors que les semences entières ne germent pas ; les causes de la dormance doivent être recherchées au niveau tégumentaire.

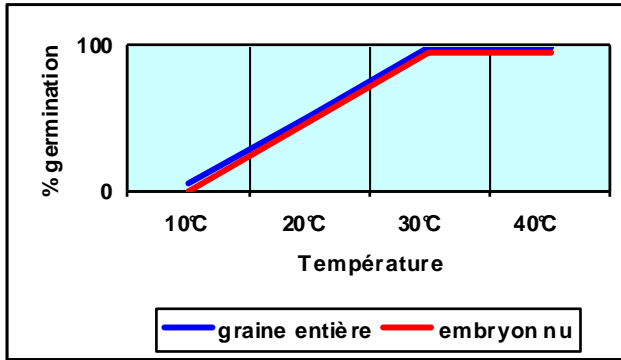
Hypothèse 1 : téguments durs, imperméables (ex : *Fabaceae*)
Hypothèse 2 : photosensibilité positive (ex : *Lactuca* sp.pl.)



4 - AUCUNE INHIBITION TEGUMENTAIRE, DORMANCE EMBRYONNAIRE SE MANIFESTANT A DES TEMPERATURES ELEVEES

Dormance embryonnaire qui s'active à des températures élevées

Hypothèse 1 : espèce de climat tempéré (ex : *Primula* sp.pl.)
Hypothèse 2 : dormance embryonnaire éliminable avec un traitement au froid (ex : *Taxus baccata* L.)

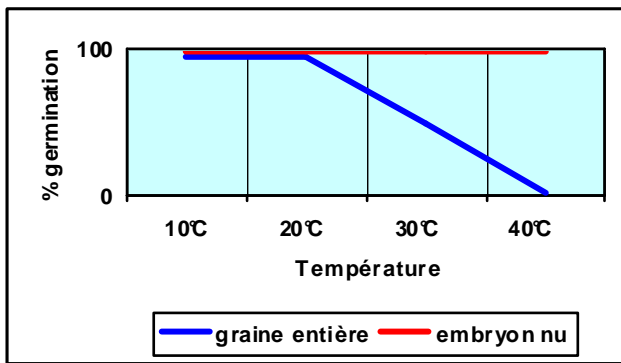


5 - AUCUNE INHIBITION TEGUMENTAIRE, DORMANCE EMBRYONNAIRE S'EXPRIMANT A DES TEMPERATURES BASSES

Les téguments n'entravent pas la germination car les courbes sont identiques, une dormance au niveau embryonnaire se manifeste à basses températures.

Hypothèse 1 : espèce de climat chaud (ex : *Chamaerops humilis* L.)

Hypothèse 2 : espèce tropicale



6 - AUCUNE DORMANCE EMBRYONNAIRE, INHIBITION TEGUMENTAIRE SE MANIFESTANT A DES TEMPERATURES ELEVEES

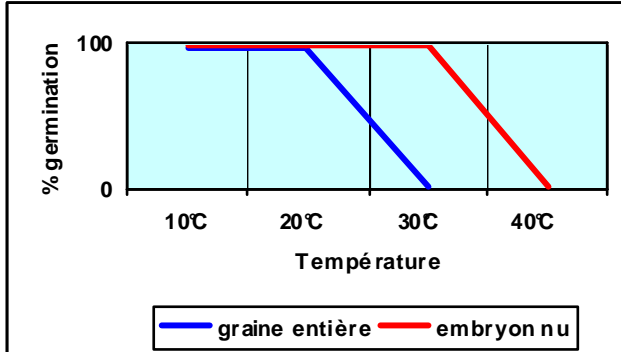
A des températures élevées l'inhibition se manifeste au niveau tégumentaire.

Hypothèse 1 : espèce de climat tempéré (ex : *Armeria belgentiensis* Donadille ex Kerguelen)

Hypothèse 2 : présence de composés phénoliques (ex : *Rouya polygama* (Desf.) Coincy)

Hypothèse 3 : photosensibilité positive (ex : *Nigella sativa* L.)

Figure 34 (cont.)

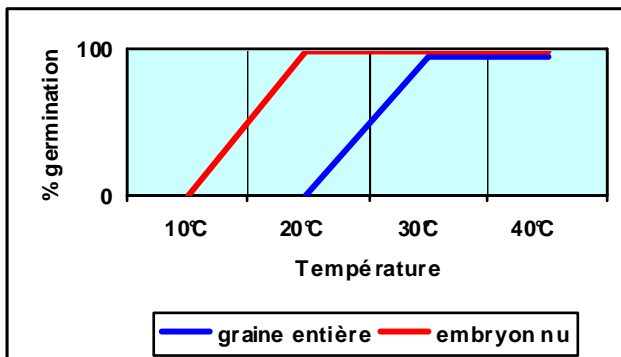


7 - DORMANCE EMBRYONNAIRE SE MANIFESTANT A DES TEMPERATURES ELEVEES ; INHIBITION TEGUMENTAIRE A DES TEMPERATURES ELEVEES

Les températures élevées déclenchent le processus de dormance embryonnaire et d'inhibition tégumentaire (à des températures différentes)

Hypothèse 1 : espèce de climat tempéré (ex : *Arenaria provincialis* Chatter & Halliday)

Hypothèse 2 : présence de composés phénoliques (ex : *Bellevalia romana* (L.) Reichenb.)



8 - DORMANCE EMBRYONNAIRE SE MANIFESTANT A DES TEMPERATURES BASSES ; INHIBITION TEGUMENTAIRE A DES TEMPERATURES BASSES

Les températures basses déclenchent le processus de dormance embryonnaire et d'inhibition tégumentaire (à des températures différentes)

Hypothèse 1 : espèce tropicale

Hypothèses 2 : espèce de climat chaud (ex : *Chamaerops humilis* L.)

8.4. Levée des dormances (prétraitements)

Le terme prétraitement englobe l'ensemble des procédés, précautions, manipulations ou

autres actions qui précèdent le semis ; ils sont effectués dans le but d'optimiser la vitesse et l'uniformité de la germination (Mezzalana et Piotta, 2003 ; Piotta, 2005). Dans ce domaine les termes "prétraitement" et "traitement" sont à considérer comme des synonymes, mais on emploie largement le premier puisqu'il suggère un procédé qui s'applique "avant" la germination. Au sens large, de nombreux "prétraitements" impliquent des procédés qui n'agissent pas directement sur la levée de la dormance (enrobage, désinfection, etc.).

Pour diverses raisons comme dans le cas de dormances physiologiques, de téguments particulièrement épais et impénétrables ou par la présence de substances inhibitrices de la germination (tab. 3), un nombre considérable de graines, au terme du test de germination, pourrait rester viable mais ne germe pas. Pour obtenir une meilleure germination des accessions il serait donc opportun de pré-traiter les graines avant de commencer le test véritable. La durée de ces traitements ne doit pas, de toute façon, être incluse dans la durée de germination véritable (ISTA, 2006).

Les méthodes officielles d'analyse des semences (*Ministero Agricoltura e Foreste, op. cit.*) indiquent le ou les prétraitements auxquels soumettre de nombreuses graines d'espèces présentes en Italie. De la même manière de nombreuses institutions dont les plus importantes sont : l'*International Seed Testing Association* (ISTA), l'*International Plant Genetic Resources Institute* (IPGRI), *Natural Resources Conservation Service* dell'*United States Department of Agriculture*, *The Native Plant Network*, *The Reforestation, Nursery and Genetic Resources Team*, *Kew Gardens*, étudient et mettent continuellement à jour des protocoles pour optimiser les résultats des procédures de multiplication des plantes ou pour déterminer la qualité des semences y compris la germination et les prétraitements pour lever les éventuelles dormances. Cependant, pour de nombreuses espèces il n'existe pas de notice, dans ce cas on peut recourir aux procédures décrites dans les paragraphes 8.3.1 et 10.2.

Ci-dessous sont décrits les prétraitements les plus couramment utilisés pour lever les dormances des semences avant le semis ou les tests de germination. Devant la grande variabilité du caractère de la dormance, il est possible que les prétraitements n'agissent positivement que sur une partie du lot (seule cette partie satisfait complètement au prétraitement) et induisent une sorte de sélection avec pour conséquence une perte de variabilité génétique. Depuis quelques années, des études ont lieu pour éviter ce risque (Suszka *et al.*, 1994; Jones et Gosling, 1994; Piotta, 1997).

8.4.1. Stratification froide, vernalisation ou prechilling

Avec le terme *prechilling* (synonyme de vernalisation ou stratification froide) on sous-entend l'exposition des semences dormantes (seules ou mélangées à un substrat souple) à une température variant entre +2° et +5°C (Côme, *op. cit.*) en conditions humide et ventilée, pendant une période déterminée pour chaque espèce ou lot. Le *prechilling* simule l'action qui s'exerce en hiver sur les semences.

Une solution alternative à la stratification froide, qui peut quelquefois durer plusieurs semaines, est l'application d'hormones telles les gibberellines (GA3) (IBPGR, 1985b).

8.4.2. Stratification chaude, estivation, preheating ou warming

Avec le terme *preheating* (synonyme de stratification chaude, estivation ou *warming*) on sous-entend l'exposition des semences à une température inférieure à 30-35°C (généralement 15-20°C) en conditions humides, mais avec une libre circulation d'air pour une période variable en fonction de l'espèce. La stratification chaude conduite artificiellement se substitue à des conditions estivales toujours suivies d'une période froide. Lorsqu'on applique plusieurs cycles de stratifications chaudes et stratifications

froides, le dernier prétraitement appliqué est le froid.

8.4.3. Enfumage

Pour faciliter la germination de quelques plantes pyrophytes, au-delà d'un traitement thermique il peut être utile d'appliquer des prétraitements qui prévoient un enfumage des graines (ex. : *Ericaceae*). Le traitement, inventé et développé déjà depuis 1990 par le *Kirstenbosch National Botanical Garden de Claremont* - de Cape Town (Afrique-du-Sud), prévoit un semis sur des disques de papier imprégnés avec une solution saturée d'une combinaison de substances naturelles qui se libèrent pendant les incendies du *fynbos* sud-africain (végétation de type méditerranéen), à laquelle est ajouté un volume déterminé d'eau et dans laquelle les graines sont mises à imbiber pendant 24 heures. D'autres centres de recherche s'occupant d'espèces d'écosystèmes de type méditerranéen en Californie et en Australie ont développé des traitements analogues qui, substantiellement, tentent d'imiter l'effet des incendies (la chaleur, la cendre en solutions, la fumée ou autres 'sous-produits' du feu) sur la germination.

De nombreuses espèces présentes dans différents écosystèmes de type méditerranéen répondent significativement à des prétraitements d'enfumage. L'effet de la fumée sur la germination a aussi été récemment expérimenté sur des unités taxonomiques du bassin Méditerranéen (Crosti *et al.*, *op. cit.*). Les espèces qui sont stimulées par la fumée, qui doit être considérée comme un sous-produit très spécifique de l'incendie, ne sont pas nécessairement les mêmes que celles qui peuvent être stimulées par le choc thermique produit par le feu. En effet, l'action de la fumée semble être de nature chimique alors que la chaleur agit par un mécanisme physico - mécanique. La fumée pourrait donc avoir un effet direct, mais aussi indirect, avec les solutions aqueuses ou les gaz qui atteignent les graines. Parmi les espèces qui réagissent positivement, la réponse à la fumée varie selon la quantité de principe actif qu'elle contient et en fonction du temps d'exposition. On a récemment isolé de la fumée une substance du groupe des buténolides qui, même à de très basses concentrations, agit sur la stimulation de la germination comme la fumée elle-même. En outre, cette substance stimule même à l'obscurité la germination de nombreuses espèces, comme les *Asteraceae* australiennes, qui ont pourtant besoin de lumière pour germer, et ceci parce qu'elle provoquerait des effets analogues à ceux de l'acide gibbérellique (Merritt *et al.*, 2006).

Les graines sensibles à la fumée ont très souvent des téguments particuliers dotés d'une couche sous-dermique qui, lorsque la graine est quiescente, peut permettre l'absorption de l'eau mais pas des solutés. L'action de la fumée modifierait ce tissu en le rendant plus perméable et favoriserait ainsi les processus de germination. La diversité des espèces, ainsi que le milieu d'origine d'une espèce, induiront des réponses très variées qui influenceront fortement la composition de la communauté végétale qui succédera à un incendie.

L'effet du feu sur la végétation est particulièrement complexe (Fenner *et* Thompson, 2005) parce qu'il influe sur la lumière, l'humidité, la température, le pH, la nutrition et la concurrence végétale ; il faut toutefois considérer la fumée comme un des facteurs déterminants dans la levée de la dormance des espèces spontanées des écosystèmes de type méditerranéen.

8.4.4. Scarification

Les semences des espèces appartenant aux familles ayant des téguments séminaux ou des endocarpes ligneux très durs et impénétrables (ex.: *Fabaceae*, *Cistaceae*, *Convolvulaceae*, *Oleaceae*, etc.) doivent être scarifiées de façon mécanique, chimique ou physique.

La scarification peut être exécutée avant le début du test ou, lorsqu'on suppose que le traitement peut endommager les graines déjà imbibées, à la fin de l'essai de germination et seulement sur celles qui ne sont pas imbibées.

La scarification mécanique prévoit l'ouverture, la coupe ou l'abrasion avec du papier émeri des téguments extérieurs (fig. 35) afin de permettre l'imbibition des graines. La partie de la graine la plus adaptée aux scarifications mécaniques est celle située immédiatement au-dessus du sommet des cotylédons (ISTA, 2006).

Les scarifications de type chimique prévoient l'immersion des graines dans de l'acide sulfurique à 96% pour un temps variable, afin de ramollir les téguments. Après traitement, les graines doivent être rincées à l'eau courante avant de commencer le test de germination ou de procéder au semis.

Les scarifications physiques des graines consistent essentiellement en un passage en eau bouillante suivi d'un trempage de 12-24 heures dans de l'eau afin d'assouplir les téguments et de favoriser l'imbibition. L'eau doit être retirée de la source de chaleur avant d'y verser les graines, celle-ci est généralement dosée à dix volumes d'eau pour un volume de graines et doit être agitée régulièrement jusqu'à son refroidissement (Mezzalana et Piotta, *op. cit.*).



Figure 35 - Semences d'*Astragalus maritimus* Moris avant (à gauche) et après (à droite) 24 heures d'imbibition. Les semences sont abrasées manuellement à l'aide de papier émeri. (photo: E. Mattana)

8.4.5. Elimination des téguments

Pour certaines espèces qui présentent des téguments particulièrement durs, la seule scarification ne permet pas un ramollissement suffisant à la sortie de la radicule. Dans ce cas il est utile d'utiliser une pince pour casser les téguments en ayant soin de ne pas endommager l'embryon.

8.4.6. Elimination des substances inhibitrices de la germination

La présence de substances chimiques à l'intérieur des semences ou des téguments peut retarder ou inhiber la germination. La présence de ces substances peut être révélée sur le substrat de germination utilisé par la formation d'une petite auréole colorée autour de la graine. Les substances inhibitrices de la germination peuvent être éliminées par un prélavage dans de l'eau ou dans de l'alcool (90°) à une température de 25°C, il faut rincer les semences avant d'effectuer le test. Pour certaines *Poaceae* on peut procéder à l'enlèvement des structures externes des semences comme les glumelles inférieures ou supérieures (lemma et palea) (ISTA, 2006).

Les substances phénoliques sont responsables de l'inhibition de la germination en

diminuant l'apport de l'oxygène au niveau de l'embryon surtout lorsque les températures sont supérieures à 10°C. Leur élimination peut s'effectuer par des lavages successifs dans de l'eau ou de l'alcool, mais surtout en maintenant la température de germination suffisamment basse afin d'augmenter le taux d'oxygène dissout dans l'eau d'imbibition (Côme *et* Corbineau, *op. cit.*).

Le trempage des semences dans un puissant oxydant (ex.: eau oxygénée, eau de Javel) permet l'oxydation de nombreuses substances inhibitrices ce qui les rend inefficaces (Ogawa *et* Iwabuchi, 2001) et permet également l'élimination de certains pathogènes.

8.5. Conseils pratiques¹

Les laboratoires des banques de semences ne sont pas toujours équipés de beaucoup de matériel technique sophistiqué permettant de conduire un essai de germination complet amenant à des conclusions rapides et efficaces sur les caractéristiques germinatives. Il est donc extrêmement important de noter les conditions utilisées et toutes les observations utiles à une meilleure définition ou à une amélioration des protocoles avec les moyens disponibles. Certaines combinaisons, températures – lumière, températures – eau, etc. peuvent permettre de simplifier le travail tout en obtenant des résultats cohérents, mais peuvent aussi être difficilement reproduit par un autre laboratoire ne disposant pas des mêmes équipements techniques. Il est bien de rappeler que l'eau, la température et la lumière jouent un rôle spécifique pour chaque espèce et que les combinaisons de ces facteurs, si elles ne sont pas suivies avec attention, peuvent compliquer les interprétations des résultats d'un test de germination.

8.5.1. Eau

Elle doit être d'une qualité irréprochable, l'eau distillée ou osmosée est donc recommandée. Si le laboratoire ne dispose pas d'équipement permettant cette qualité, il faut utiliser de l'eau minérale du commerce, de faible minéralité, de préférence aux eaux de source ou du robinet qui peuvent varier selon les saisons. Bien évidemment la marque commerciale de l'eau utilisée devra être consignée sur la fiche de germination. Ne pas oublier qu'une bouteille d'eau entamée doit être conservée à + 5°C et être rapidement utilisée.

En fonction de la quantité d'eau utilisée, le laboratoire doit étudier la différence de coût entre une installation de distillation ou d'osmose et l'achat de bouteilles.

L'usage des purificateurs domestiques doit être proscrit, en effet s'ils éliminent le calcaire, les nitrates et les métaux présents dans l'eau du robinet, ils relâchent de l'eau chargée en Na Cl qui peut se révéler néfaste à la germination de certaines espèces.

La quantité d'eau utilisée pour l'imbibition du papier filtre lors du test de germination doit être surveillée dans les 48 heures et éventuellement complétée si l'on observe un assèchement du substrat.

8.5.2. Oxygène

Paramètre difficile à maîtriser, si ce n'est en utilisant des températures basses qui induisent une grande solubilité de ce gaz dans l'eau d'imbibition ou, au contraire, des températures hautes pour réduire sa présence.

¹ Ces notes et observations sont issues de l'expérience acquise depuis plus de 25 ans à la Banque de Semences du Conservatoire botanique national méditerranéen de Porquerolles dans la conduite d'essais de germination et ils se présentent sous forme de suggestions pratiques pour suppléer au manque d'instrumentations et/ou structures nécessaires à l'étude de la germination.

8.5.3. Température

Dans l'idéal, le laboratoire d'une banque de semences devrait être équipé d'une batterie d'étuve à températures constantes et alternatives combinées à de l'éclairage et/ou alors d'une table à gradient thermique, toutefois tout cet équipement n'est pas toujours disponible.

D'un point de vue technique et financier une étuve à température constante est plus facile à acquérir et donne des résultats plus facilement reproductibles. En effet, l'efficacité des cycles thermiques dépend des températures appliquées, de la durée d'exposition à chaque température, de l'écart entre les températures ; les étuves à alternances de températures peuvent mettre un certain temps pour augmenter ou abaisser la température en fonction du cycle prévu, et donc influencer sur les vitesses de germination. Toutes ces variations possibles sur un seul paramètre compliquent l'analyse du résultat de germination.

8.5.4. Lumière

La typologie de la chambre de culture, la durée d'éclairage, les cycles appliqués, la longueur d'onde émise, l'intensité, la qualité, la durée de vie qualitative (dans la plupart des cas elle n'excède pas une année) des ampoules ou tubes néons utilisés, leur marque commerciale et leur reproductibilité, sont autant d'éléments importants à évaluer et à noter.

Si l'on combine le paramètre lumière avec une alternance de température, il devient alors difficile de pouvoir reproduire le protocole géminalif en dehors de son propre laboratoire. Certaines espèces ne nécessitent parfois qu'une brève exposition à la lumière. Suivant les cas, ces exigences en lumière ou en obscurité peuvent être supprimées par la conservation au sec, la décortication ou la scarification des téguments, l'application de températures plus froides pour la germination inhibée par l'obscurité ou plus chaudes pour les semences inhibée par la lumière. L'influence particulière de la lumière sur certaines graines explique pourquoi, longtemps quiescentes dans le sol, elles gement lorsqu'elles se retrouvent ramenées en surface à l'occasion d'un labour. On notera alors une meilleure germination après plus de 6 mois à 1 an de conservation au sec et au froid.

8.5.5 Hormones et autres produits

Gibberelline

Son application ne semble pas obligatoire en présence d'une dormance supposée. De plus si l'on souhaite conserver les plantules pour une multiplication, celle-ci n'en sera que plus difficile à cause de l'étiollement engendré par l'ajout d'hormone. Si pour des raisons non élucidées l'application de gibbérelline reste essentielle pour la production de plants, il faudra recourir à une méthode de culture adéquate souvent réalisable uniquement dans des conditions contrôlées : éclairage adéquat pendant 14h/24h au minimum et une alternance de températures avec un écart très prononcé entre les périodes nocturnes et diurne. Toutefois toutes les espèces ne pourront pas être maintenues en employant cette méthode de culture.

L'application de gibbérelline permet aussi de lever les dormances dues à la photosensibilité positive des semences.

Il faut noter que la solution de gibbérelline confectionnée au laboratoire ne se conserve qu'au froid, à l'obscurité et au maximum une semaine, on risque sinon de ne pas obtenir l'effet désiré.

Emploi d'autres produits

Certains fongicides utilisés pour éviter les infections pendant la germination peuvent induire des défauts ou des retards de croissance, de même que toutes substances pesticides non encore testées peuvent amener à des défauts du développement de l'espèce étudiée, des retards de floraison, etc. Par conséquent leur usage est déconseillé.

8.6. Détermination et élaboration du ou des protocoles

Pour effectuer correctement les tests de germination il est opportun d'effectuer une enquête bibliographique préliminaire, visant à acquérir le plus grand nombre possible de données et des informations sur l'anatomie, la physiologie et la biologie des graines ainsi que sur l'écologie du *taxon* étudié. En même temps il est utile de consulter, soit dans des publications spécifiques soit sur les sites web d'institutions reconnues, les algorithmes et protocoles de germination déjà expérimentés, même pour des *taxa* phylogénétiquement et/ou écologiquement semblables. De cette manière il sera possible au gestionnaire de la banque, sur la base des instruments et des méthodologies acquises, de programmer un protocole spécifique, en déterminant les différents paramètres et le nombre des répliques nécessaires en fonction de la disponibilité des graines.

Il existe diverses méthodes pour la standardisation de l'élaboration de protocoles de germination (Terry *et al.*, 2003) ; toutefois il faut considérer que de telles procédures sont conditionnées à la structure et à l'équipement existant dans les banques (par exemple nombre d'incubateurs équipés ou non de régulation thermo et photopériodique, etc.), par conséquent chaque banque adopte le protocole le plus adapté aux équipements dont elle dispose et de ses exigences. *La Banca del Gemoplasma della Sardegna* (BG-SAR) utilise le schéma décisionnel suivant, de type dichotomique, en accord avec les standards internationaux tels IPGRI (1985b) et ISTA (2006).

- | | |
|---|---|
| 1. Recherche bibliographique préalable | 2 |
| 2. Consultation d'algorithmes et de protocoles de germination déjà expérimentés, même en cas de <i>taxa</i> semblables selon des critères phylogénétiques et/ou écologiques : | |
| a. Il n'existe pas de protocole déjà défini | 3 |
| b. Il existe un protocole déjà défini | 7 |
| 3. Prétraitements | |
| a. Estivation (ex.: <i>Primulaceae</i>) | 4 |
| b. Vernalisation (ex.: <i>Cistaceae</i>) | 4 |
| c. Enfumage (ex.: <i>Ericaceae</i>) | 4 |
| d. Scarification (ex.: <i>Fabaceae</i>) | 4 |
| e. Elimination des substances inhibitrices de la germination (ex. : <i>Poaceae</i>) | 4 |
| 4. Imbibition | |
| a. Semences non imbibées | 3 |
| b. Semences imbibées | 5 |
| 5. Semis | |
| a. Traitement chimique (KNO ₃ , GA3, etc.) | |
| i. Obscurité et température constante | |
| % de germination < 50% | 6 |
| % de germination > 50% | 7 |

ii.	Photopériode et température constante	
	% de germination < 50%	6
	% de germination > 50%	7
iii.	Photopériode et températures alternées	
	% de germination < 50%	6
	% de germination > 50%	7
b.	Eau distillée (aucun traitement)	
i.	Osbcurité et température constante	
	% de germination < 50%	6
	% de germination > 50%	7
ii.	Photopériode et température constante	
	% de germination < 50%	6
	% de germination > 50%	7
iii.	Photopériode et températures alternées	
	% de germination < 50%	6
	% de germination > 50%	7
6.	Exécution du test de viabilité	
a.	Les résultats du test de germination ne sont pas confirmés (viabilité haute)	5
b.	Les résultats du test de germination sont confirmés (viabilité faible)	7
7.	Exécution du test de germination de confirmation	
a.	Les résultats ne sont pas confirmés	5
b.	Les résultats sont confirmés	

VALIDATION DU PROTOCOLE

Le nombre de graines pouvant être analysées peut varier selon la disponibilité effective de celles-ci (si la quantité est faible il faut renoncer à effectuer des essais destructifs) et selon les différents protocoles de germination. Par rapport au nombre de graines disponibles et sur la base de l'expérience acquise à la *Banca del Gemoplasma della Sardegna*, le schéma suivant est proposé :

- nbre. semences <500 unité = on n'effectue pas de tests de germination ;
- nbre. semences 500-1000 unité = le nbre de graines à analyser doit être au maximum de 10% ;
- nbre. semences 1000-5000 unité = le nbre de graines à analyser doit être entre 10 et 20% ;
- nbre. semences >5000 unité = le nbre de graines à analyser doit être au maximum de 20%.

Il faut toutefois considérer qu'en travaillant avec des populations d'unités taxonomiques rares et/ou à risque d'extinction, il sera difficile de disposer de lots constitués d'au moins 500 graines. Dans ce cas le choix du nombre de répliques et de graines par réplique doit être attentivement pondéré en prenant en considération différents paramètres parmi lesquels :

- degrés critique/menace du *taxon* ;
- disponibilité en matériel provenant d'une autre population du même *taxon* ;
- disponibilité en accession des années précédentes de la population étudiée.

Les conditions standard de germination auxquelles soumettre des graines de *taxa* encore inconnus sont les combinaisons des facteurs suivants :

- température 5°C², 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, (en fonction aussi de l'aire géographique considérée) ;
- photopériode 12/12 h ;
- agar 0,5%-1% ou papier buvard (3 feuilles)³ ;
- acide gibberellique 120 - 800 ppm (IBPGR, 1985b) ;
- durée de l'essai variable de 30 à 60 jours, sauf exceptions ;
- une ou plusieurs boîtes de Pétri dont la dimension dépend du type de graine ;
- KNO₃ (0,2% p/v.) (Côme, *op. cit.*; IBPGR, 1985b; ISTA, 2006).



Figure 36 – Contrôle d'un test de germination d'*Astragalus maritimus* Moris. (photo: E. Mattana)

Pour permettre des analyses correctes (y compris statistiques) il est recommandé d'observer les résultats (fig. 36) tous les jours après le début du test pendant 2 à 3 semaines puis, tous les deux jours pour toute la durée de celui-ci.

Lorsque le résultat négatif de l'essai de germination est imputable à l'apparition de pollutions fongiques, il sera nécessaire de répéter le test, en prévoyant un traitement antifongique. Le traitement antifongique peut être effectué avant le début du test en plongeant le matériel dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaClO) commercial à 1-2% pendant 5-10 minutes. En alternative, au moment du semis des répliques en boîtes de Pétri, il faut imbiber le papier filtre avec une solution d'hymexazol à 36% p/v, fongicide qui peut être utilisé sur les graines et sur le substrat (De Liñán, 2004), à une concentration de 0.1 ml de produit pour 500 ml d'eau distillée (Picher *et* Campos, *in verbis*).

Au cas où des infections interviennent pendant le test il faut remplacer la boîte de Pétri, le papier filtre, laver abondamment les graines à l'eau et ensuite les traiter avec de

² La réplique à 5°C, lorsqu'on n'obtient pas de résultats positifs, après 1-2 mois, lors des premiers essais, peut être transférée à des températures supérieures, de façon à évaluer l'éventuelle nécessité d'une période de *prechilling*. Il y a, de toute façon, des espèces pour lesquelles la température optimale de germination est proche de 5°C (ex. : *Fagus sylvatica*).

³ Les deux types de substrat présentent des caractéristiques différentes et sont utilisés en alternative selon la conduite du test et la typologie des graines : il vaut mieux choisir l'agar si l'on a la possibilité de travailler en milieu stérile ou avec des graines ou spore de dimensions très réduites (ex. : spore de ptéridophyte ou graines d'*Orchidaceae*), alors que des graines de grandes dimensions risquent d'absorber toute l'eau présente dans la solution d'agar en induisant donc un facteur limitant à la germination.

l'hypochlorite de sodium. Pour les graines particulièrement rugueuses et difficiles à stériliser (ex. : *Astragalus* sp. pl.), il est préférable d'employer des solutions spécifiques comme le "Tween 20TM" et de préparer une solution à 0,1 % ; ce mélange réduit la tension superficielle et favorise un meilleur contact du liquide avec le tégument de la graine. Après le traitement, le matériel végétal doit être méticuleusement rincé avec de l'eau courante.

8.7. Analyses des résultats

Les observations effectuées pendant le test de germination permettent la caractérisation des résultats obtenus. C'est dans ce but que sont présentés ensuite les moyens utiles aux analyses des résultats.

8.7.1. Catégories d'évaluation

Pendant le suivi du test de germination il est possible d'observer et d'annoter le nombre de graines germées et de graines mortes ; à la fin du test on peut généralement identifier (§. 13.11) les catégories de graines suivantes (ISTA 2006 ; *Ministero Agricoltura e Foreste, op. cit.*) :

- germées : observation de la sortie de la radicule ;
- imbibées : graines qui à la fin du test sont fraîches, viables et imbibées mais non germées ;
- non imbibées : graines qui à la fin du test ne sont pas imbibées (elles ont généralement des téguments très durs qui nécessitent une scarification) ;
- mortes : somme des graines qualifiées de mortes après différents contrôles ;
- autre catégorie : graines qui ne rentrent pas dans les catégories ci-dessus, en particulier celles qui sont vides ou infestées (ISTA, 2006).

La somme des pourcentages des graine appartenant à toutes les catégories doit être égale à 100 et leur nombre total doit correspondre au nombre de graines posées dans la boîte au début du test. Pour les graines germées il est possible d'effectuer une ultime distinction (ISTA, 2006) :

- Graines germées avec plantules normales : elles sont pourvues d'organes essentiels à la vie de la future plante. Celles-ci se distinguent en trois catégories : plantules intactes, avec de légers défauts ou avec des infections secondaires
- Graines avec plantules anormales : graines ayant germé mais ne présentant pas de plantule pouvant être considérée comme normale. Même dans ce cas on distingue trois catégories : plantules endommagées, déformées ou détériorées¹.

8.7.2. Pourcentage de germination

Le pourcentage de germination est calculé pour chaque réplique et, il est donné par le rapport entre le nombre de graines germées et le nombre total de graines, multiplié par cent :

$$(\text{Nombre de graines germées/nombre total de graines}) \times 100$$

Le pourcentage final du test sera calculé en faisant la moyenne entre toutes les répliques soumises aux mêmes conditions de germination.

¹¹ Pour l'évaluation de la plantule s'aider en particulier du Manuel ISTA "Seedling Evaluation" (Don, 2003)

8.7.3. Vitesse de germination ('T50')

Le T50 est le paramètre le plus utilisé pour déterminer la vitesse de germination. On calcule en nombre entier de jours et cela correspond au temps nécessaire pour obtenir 50% de la capacité germinative du lot (Côme, *op. cit.*). Cette valeur peut se calculer par interpolation linéaire avec la formule de Coolbear *et al.* (1980), légèrement modifiée ensuite par la définition fournie par Thanos *et Doussi* (1995) :

$$T50 = \frac{[(N/2) - N_1] \times (T_2 - T_1)}{N_2 - N_1} + T_1$$

avec :

- N = pourcentage final de semences germées ;
- N₁ = pourcentage de semences germées légèrement inférieur à N/2 ;
- N₂ = pourcentage de semences germées légèrement supérieur à N/2 ;
- T₁ = nombre de jours correspondant à N₁ ;
- T₂ = nombre de jours correspondant à N₂.

Le calcul du T50 est un résultat très utile lorsque la période de germination se révèle très longue (plusieurs mois) et permet aussi de toujours vérifier la qualité du protocole. Il permet en outre d'évaluer indirectement la vigueur d'un lot de graines, la vitesse de germination en étant une expression.

8.7.4. Délai de germination

C'est le temps nécessaire (en jours) pour observer la première graine germée. Il ne dépend pas seulement des caractéristiques de l'espèce, mais est aussi un indicateur de l'état de vieillissement des lots conservés lorsqu'on compare les résultats obtenus avec le même protocole sur des graines testées immédiatement après la récolte et après plusieurs années de conservation.

8.7.5. Courbe d'interprétation

Avec les résultats obtenus pendant le test il est possible de tracer différentes sortes de courbes d'analyses des résultats. Ci-dessous sont présentés deux types de graphiques (fig. 37 et 38) utilisés pour analyser, caractériser et visualiser les données. Pour ces graphiques il est possible d'utiliser le T50 au lieu du pourcentage de germination.

Pourcentage de germination en fonction du temps

Cette courbe (fig. 37) représente en ordonnée les pourcentages de germination et en abscisse le temps ; on peut comparer les différentes séries de données sur le même graphique afin d'évaluer les différents protocoles, méthodes de conservation, récoltes relatives à des différentes populations ou récoltes relatives à la même population, mais réalisées des années différentes.

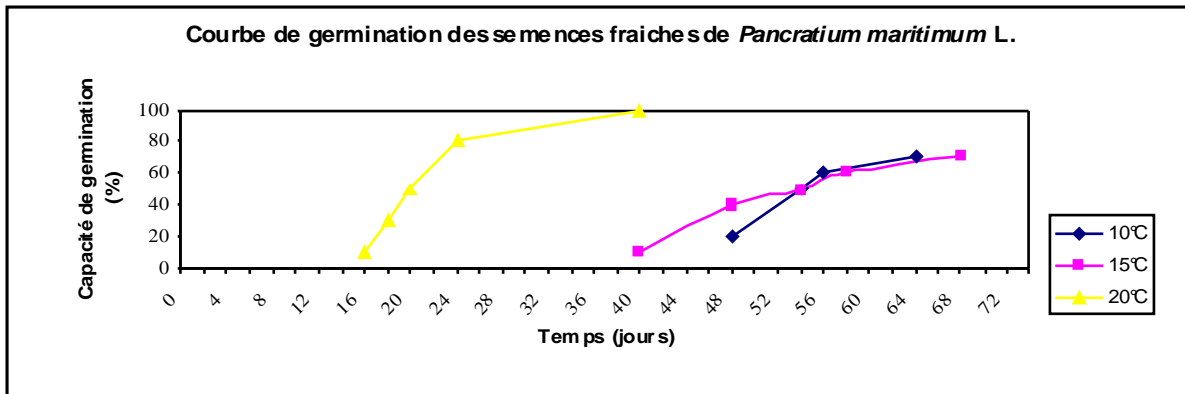


Figure 37 – Courbe de germination des semences fraîches de *Pancratium maritimum* (données: M. Virevaire)

De la figure 37, exemple du pourcentage de germination en fonction du temps, on peut déduire que le retard de germination en fonction des températures employées pour le test est de 18 jours pour 20°C, 42 jours pour 15°C et 48 jours pour 10°C. Le temps total du test est de 42 jours pour 20°C et de bien plus au-delà pour les autres températures. La température la plus efficace pour ce lot, dans ces conditions de test (graines entières, obscurité, boîtes de Pétri humidifiées avec de l'eau distillée) est donc de 20°C. Ce test a été mené sur *Pancratium maritimum*, espèce qui ne présente pas de dormance ou d'inhibition de germination, et est utilisée pour généraliser les résultats des pourcentages de germination selon différents protocoles normalement appliqués en utilisant des graines fraîches pour évaluer la qualité du lot à l'entrée en banque.

Grâce aux graphiques il est possible de comparer différentes séries de données afin d'évaluer immédiatement différents protocoles, méthodes de conservation, récoltes relatives à différentes populations ou à une même population mais avec des prélèvements exécutés sur des années différentes.

Pourcentages de germination en fonction de protocoles différents

Ci-dessous, dans la figure 38 sont représentés en ordonnée les pourcentages de germination et en abscisse les différents protocoles testés. Grâce à ce type de graphique il est possible d'évaluer les différentes méthodes de conservation et de déterminer la température optimale de germination. Les tests utilisés pour cette courbe ont été réalisés sur un échantillon correspondant à une seule récolte, soit de suite avant la conservation, soit après plusieurs années de conservation des graines congelées et lyophilisées. Les graines fraîchement récoltées ont été soumises à des essais pour évaluer les caractéristiques germinatives du lot qui serviront de référence pour les tests suivants. Pour chaque méthode de conservation les graines ont été nettoyées et stockées avec du gel de silice à la température indiquée dans le graphique, sauf pour celles conservées à température ambiante du laboratoire (variable selon les saisons de 15 à 38°C). La comparaison entre la courbe des graines fraîches et celles relatives aux différentes méthodes de conservation (5°C, congélation et lyophilisation) montre qu'au moment de la récolte, et donc du test de germination, la totalité des graines n'était pas encore arrivée à la maturité physiologique. En effet les graines conservées ont subi une postmaturation atteignant ainsi une meilleure homogénéité du lot, ensuite, après déshydratation elles ont été conservées au froid (+5°C, lyophilisées, -20°C), à température ambiante et à 20°C. Le graphique met en évidence une température optimale de germination de 20°C pour les graines fraîchement récoltées ; il ressort aussi que la température optimale est en réalité de 15°C sauf pour les graines lyophilisées qui gèrent bien dans une vaste gamme de températures.

Le graphique montre clairement que les températures optimales pour la germination sont comprises entre 15 et 20°C, alors qu'on observe une forte baisse du pourcentage de germination à des températures inférieures. En considérant que les graines présentent une gamme de températures optimales plus étroite, qui va en se réduisant au fur et à mesure de l'augmentation du temps de conservation, et que les graines diminuent de viabilité avec l'augmentation du temps de stockage, il est possible de formuler des hypothèses sur la meilleure méthode de conservation. Dans ce but il est certainement utile de continuer à approfondir les recherches en comparant les mêmes lots de la même récolte afin d'évaluer la meilleure méthode de conservation pour l'espèce étudiée.

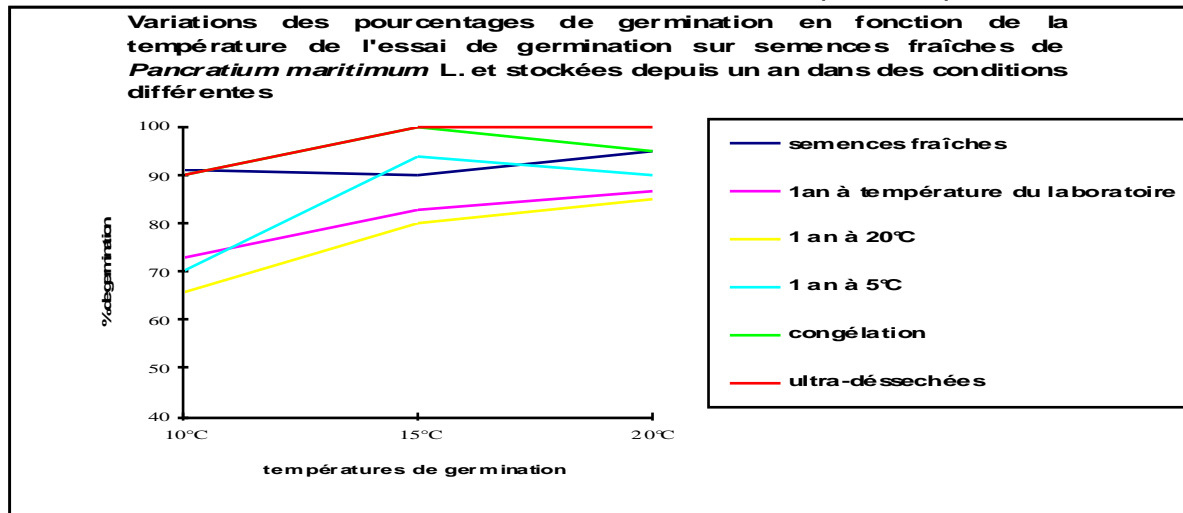


Figure 38 – Pourcentages de germination de *Pancratium maritimum* en fonction de la méthode de conservation et de la température de germination. (données: M. Virevaire)

9. GESTION DU MATERIEL VEGETAL

9.1. Gestion des données de l'échantillon

La gestion quotidienne d'une banque de matériel végétal prévoit le contrôle et le suivi des différentes structures, équipements et paramètres.

Périodiquement, des contrôles sont exécutés sur les lots conservés pour vérifier que les contenants sont d'une parfaite étanchéité ; il est donc important d'observer fréquemment si l'indicateur d'humidité présente un virage éventuel, déterminé par l'humidité en excès. Tous les 5-10 ans, selon le type de semence et la quantité disponible, des tests de germination seront effectués sur le matériel conservé (après l'avoir rééquilibré à la température et à l'humidité ambiante pendant quelques jours) pour vérifier le pourcentage de graines viables. Lorsque le niveau de viabilité descend au-dessous de certaines valeurs (qui dépendent de la qualité initiale du lot et de l'espèce traitée), il devient nécessaire de procéder à une nouvelle récolte ou à une régénération en pépinière/laboratoire en approfondissant les études sur l'entité. On peut se référer aux standards de régénération proposés par l'IPGRI, variables de 65 à 85% pour des accessions de 10-20 ans conservées en collections actives (FAO/IPGRI, *op. cit.*).

Pour la gestion d'une petite banque de semences on peut se contenter de recourir à un registre ou des fiches cartonnées. Dès l'instant où les accessions, au fil des ans, deviennent toujours plus nombreuses, il devient nécessaire d'avoir un système de gestion informatisé. Une première approche peut être faite au moyen d'une feuille de calcul, mais un logiciel spécifique de gestion des données est un moyen précieux pour

gérer les accessions. C'est pourquoi de nombreuses banques, dans le temps, ont décidé de développer des moyens dédiés et plus spécifiquement des bases de données. Ainsi a été réalisé, par exemple, au Conservatoire botanique national méditerranéen de Porquerolles (CBNMP) un logiciel de gestion dénommé VANDA, qui a été développé pour la banque de semences (fig. 39). Cet outil se divise en deux parties : une qui gère le stockage des données et l'autre qui permet des recherches selon des critères de requête. Le logiciel utilise des menus qui donnent accès à des sous-menus ; ces derniers permettant d'ouvrir une série de fenêtres à menu déroulant. Le support des fichiers contenant les données est archivé sous forme de tableaux de base que l'on incrémente à chaque fois que l'on introduit une nouvelle donnée. Les tableaux de base comprennent : les localités de récolte, la nomenclature (qui inclut les caractéristiques biologiques du *taxon* et les informations sur leur protection légale), la bibliographie et les protocoles de germination. Les accessions engendrent des fiches uniques qui permettent une recherche de caractère hiérarchique pour les tests de germination et pour les types de traitement.



Figure 39 - Une fenêtre de VANDA, logiciel de gestion de la Banque de semences du Conservatoire botanique national méditerranéen de Porquerolles réalisé par M. Virevaire.

À partir de cette expérience, et lorsqu'est apparue dans le cadre du projet Genmedoc (fig. 40) l'élaboration des fiches de terrain et de laboratoire présentées dans les annexes, il a été nécessaire d'utiliser un logiciel de gestion pour recueillir les données. Ce logiciel permet l'archivage, la recherche et la mise à jour du système directement en réseau *via* internet. Le tout est garanti par une sauvegarde des données en temps réel, grâce à un serveur virtuel qui permet à un nombre illimité d'opérateurs de travailler en même temps et de dialoguer entre eux. Actuellement le logiciel est testé auprès de la *Banca del Germoplasma della Sardegna* et de celle du *Dipartimento di Botanica di Catania*.

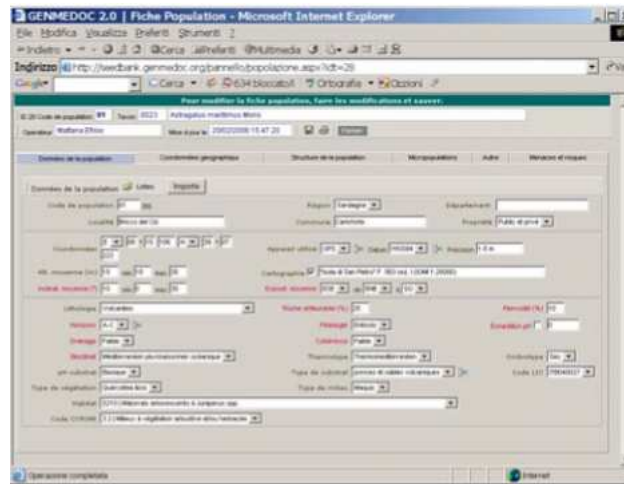


Figure 40 – Fenêtre de la base de données du programme Interreg IIB Genmedoc.

9.2. Gestion du matériel végétatif

Les procédures relatives à la récolte et à la délivrance à la banque du matériel pour la multiplication végétative (rhizomes, tubercules, bulbes, bulbilles, boutures, etc.) ne sont pas très différentes des procédures standards précédemment exposées. En effet, chaque accession doit être accompagnée de la fiche correspondant à la récolte (§. 13.1) et éventuellement des autres fiches de terrain remplies (ex. : fiche de relevé phénologique 13.2, démographique 13.3 floristico- sociologique 13.4, etc.) et d'une liste récapitulative contenant l'énumération de toutes les fiches produites et les informations relatives au collecteur.

En revanche, la conservation et la multiplication du matériel végétatif présentent des différences substantielles par rapport aux accessions constituées de graines, pour cela il est nécessaire d'adopter des protocoles spécifiques selon le type de matériel délivré à la banque.

Après avoir inséré les données relatives à la fiche de récolte dans la base de données on procède, en reportant les données sur la fiche de gestion du matériel végétatif (§. 13.13), à la vérification du type et de la quantité de matériel produit et des éventuelles précautions à adopter dans le maniement. En effet, il s'agit généralement de matériel plus sensible à la manipulation et ayant tendance à une rapide déshydratation s'il n'est pas conservé dans des conditions ambiantes adéquates. Si nécessaire on détermine le traitement initial le plus adéquat (ex. : emploi de fongicide, élimination des bords foliaires des boutures feuillées ou le temps et les conditions de conservation pour la formation des cals des boutures), et il est noté sur la fiche toutes les procédures propices à la conservation qui sont exécutées sur le matériel. Le nombre d'échantillons produits est aussi indiqué, par exemple combien de boutures ont été réalisées et combien ont donné un résultat probant. Il faut enfin assigner un code à chaque échantillon produit et indiquer pour chacun la localisation et les techniques utilisées pour l'installation (§. 13.13).

10. APPROFONDISSEMENTS

10.1. Indications pour la récolte, la conservation et le semis des semences d'arbres et d'arbustes indigènes

10.1.1. Introduction

À travers la multiplication par graine des plantes, et afin de gérer correctement les ressources naturelles, deux objectifs fondamentaux doivent être visés :

- contribuer à maintenir ou augmenter la biodiversité des espèces, objectif possible si on a connaissance des mécanismes de propagation sexuée d'un nombre élevé d'entités végétales ;
- contribuer à maintenir ou augmenter la biodiversité au niveau génétique en employant des techniques qui empêchent la perte de variabilité génétique pendant la culture des espèces végétales.

En ce qui concerne ce dernier point il est important de se rappeler que les plantules obtenues ne doivent pas subir de pertes de diversité génétique pendant la culture, et il faut éviter les sélections volontaires ou involontaires qui restreignent la variabilité des caractères génétiques. La présence d'une forte hétérogénéité est particulièrement importante dans le cas de plantes employées pour les restaurations et réhabilitations de milieux, alors qu'elle l'est moins pour des plantations à but productif avec des cycles brefs.

Il n'est pas toujours facile de gérer et conserver en pépinière le potentiel biologique représenté par la variabilité des caractères génétiques mais, dans beaucoup de cas, on peut minimiser les risques non désirés de l'érosion par l'application de techniques culturales adaptées. Certaines de ces techniques méritent une attention particulière pour les opérations concernant le semis : la connaissance des particularités biologiques de la graine (domance, conservation, etc.), l'époque de semis idéal, les prétraitements nécessaires pour ôter d'éventuelles domances, ainsi que les conditions qui peuvent favoriser ou inhiber la germination. Toutes ces opérations sont essentielles pour empêcher la perte de diversité génétique pendant les premières phases de culture des plantules.

Dans le tableau présenté ci-après (tab. 4) sont reprises les indications pour la récolte, la conservation et le semis de graines de nombreux arbres et arbustes spontanés en Italie. Les cases vides indiquent le manque d'informations ou de données spécifiques pour l'espèce traitée.

En ce qui concerne la récolte (§. 4), sont indiquées les saisons favorables ainsi que l'époque (précédant la récolte) où l'on peut juger de la qualité de la fructification. Pour la conservation (§. 6 et 7), il est indiqué le type de travail nécessaire pour obtenir les graines destinées à la conservation ou à la propagation, la température de conservation et l'aptitude de la graine à la conservation (ou bien la conservation en conditions contrôlées). Le tableau donne aussi l'époque de semis, soit du matériel végétal non soumis à un traitement soit de celui traité, et les opérations à ne pas appliquer aux graines qui se montrent dormantes (§. 8.3 et 10.2). Sont signalées les espèces avec des domances complexes (difficile à ôter) ; les espèces dont les graines tendent à germer à des températures très basses à la fin du traitement de vernalisation et les espèces dont les graines tendent à retourner à l'état de dormance (dormance secondaire) si elles sont exposées à des températures relativement élevées suite aux traitements préalables au semis (ou prétraitements) appliqués pour ôter la dormance primaire.

10.1.2. Note pour la consultation de la table 4

- (1) Éléments à considérer pour procéder à la récolte : sont énumérées les conditions qui peuvent indiquer l'instant idéal de l'opération, ou bien les situations susceptibles d'interférer négativement et qui doivent donc être évitées.
- (2) Types de traitements des graines : ensemble de procédés qui, à partir des fruits,

permettent d'obtenir des graines débarrassées des impuretés et aptes au semis. Les diverses techniques de traitements ont été décrites précédemment (§. 6.4 et 6.6).

- (3) Température de conservation : ce sont les températures normalement employées au *Centro Nazionale per lo Studio e la Conservazione della Biodiversità Forestale, Peri (VR), Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Corpo Forestale dello Stato*.
- (4) Conservation des graines : aptitude de la graine à être conservée en conditions contrôlées. Ce comportement détermine le classement de la graine en deux catégories fondamentales : graines orthodoxes et graines récalcitrantes. Entre ces deux catégories extrêmes il existe tout un continuum de comportements et l'on tend aujourd'hui à classer les graines comme tolérantes ou non tolérantes à la déshydratation (Piotto *et Di Noi*, 2003). Pour une description plus précise : paragraphe 6.9 et glossaire.
- (5) Les espèces caractérisées par le chiffre 5 dans la colonne relative à la conservation des semences orthodoxes sont celles dont le contenu en humidité doit être compris entre 10 et 20% pour une conservation optimale. En effet elles se conservent moins bien par rapport aux semences orthodoxes typiques qui supportent une dessiccation jusqu'à 5 à 7%.
- (6) Époque de semis : si ce n'est pas spécifié, le semis automnal ne comporte pas de prétraitement des graines, alors que le semis printanier nécessite souvent l'emploi de graines non dormantes et donc soumises avant le semis à des prétraitements avant la germination.
- (7) Prétraitements (s'il est nécessaire d'ôter la dormance) : sont indiqués les traitements de présemis nécessaires pour ôter la/les dormance/s, avec les modalités et les durées (§. 8.4). Les prétraitements recommandés sont fondamentalement de trois types :
 - scarification (§. 8.4.4) ;
 - estivation (ou stratification chaude ou *preheating* ou *warming*) ;
 - vernalisation (ou stratification froide ou *prechilling*) (§. 8.4.1).

(DC) = indique les espèces ayant une dormance complexe. Dans le tableau le terme a été appliqué conventionnellement à celles qui nécessitent des traitements complémentaires ou des combinaisons de traitements d'une durée généralement rallongée. Le concept "dormance complexe" a été en outre appliqué aux dormances présumées complexes puisqu'elles ne répondent pas positivement aux traitements les plus communément employés en pépinière. Pour beaucoup de ces espèces aux dormances complexes, le tableau indique un semis automnal. Une germination au printemps suivant n'est pas toujours systématique. Les émergences peuvent, en effet, très fréquemment se vérifier pendant le deuxième ou le troisième printemps. Le semis automnal, de toute façon, représente la possibilité d'ôter la/les dormance/s grâce aux conditions climatiques qui caractérisent les saisons et l'on y a recourt lorsqu'on ne connaît pas de techniques pour faciliter la germination ou que les étuves thermocontrôlées ne sont pas disponibles pour l'exécution des prétraitements.

(GF) = indique les graines des espèces qui, lors de la stratification froide, peuvent germer même à des températures très basses. Pour cette raison, lorsque ce type de graines est soumis à un prétraitement, il faut contrôler fréquemment le semis en vernalisation, surtout vers la fin du traitement.

(DS) = indique les graines des espèces qui, après enlèvement de la dormance primaire (celle présente au moment de la dispersion naturelle) par les traitements de présemis, peuvent retrouver une condition de graines dormantes (dormance secondaire) lorsque la couche de semis maintient des températures 'élevées' (autour de + 20°C) pendant des

périodes rallongées. La germination complète des graines dormantes de ces espèces n'est généralement pas favorisée par l'alternance de températures (nuits froides et jours chauds) sur le terrain, comme cela se produit au début du printemps. Les températures relativement hautes de fin printemps - été induisent une dormance secondaire qui stoppe la germination.

Binôme scientifique et nom vernaculaire	Epoque pour estimer l'importance et la qualité de la fructification	Epoque de récolte	Eléments à considérer pour procéder à la récolte (1)	Type de travail des semences (2)	Température de conservation (3)	Conservation des semences (4)	Epoque de semis (6)	Prétraitements (nécessaires pour lever la dormance) (7)
<i>Abies alba</i> Mill. (Sapin blanc), <i>A. cephalonica</i> Link. (Sapin de Grèce), <i>A. nordmanniana</i> Spach. (A de Nordmann), <i>A. pinsapo</i> Boiss. (Sapin d'Espagne)	été	début automne	la résination des cônes indique le moment où il est possible de débiter la récolte	à froid	- 7°C	orthodoxe	Semis automnal réussi ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 3 – 4 semaines.
<i>Acer campestre</i> L. (Erable champêtre)	début d'automne	automne	le virage des graines au marron indique le moment où il est possible de débiter la récolte	à froid	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Semis automnal ou printanier avec des semences traitées (DC) (GF) .	Estivation de 0-8 semaines suivie d'une vernalisation de 12-24 semaines.
<i>Acer monspessulanum</i> L. (Erable de Montpellier)	début d'automne	automne	l'abondante fructification n'indique pas nécessairement la qualité, on trouve parfois des graines vides	à froid	+ 2°C	de conservation difficile (5)	idem ci-dessus.	Vernalisation de 8-12 semaines
<i>Acer opalus</i> Mill. (Erable à feuilles d'Obier)	début d'automne	automne	idem ci-dessus	à froid	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Semis automnal ou printanier avec des semences traitées (GF) .	Estivation de 0-12 semaines suivie d'une vernalisation de 4-12 semaines.
<i>Acer platanoides</i> L. (Erable Plane)	début d'automne	automne	le virage des graines au marron indique le moment où il est possible de débiter la récolte	à froid	+ 2°C	de conservation difficile (5)	idem ci-dessus.	Vernalisation de 4-6 semaines

<i>Acer pseudoplatanus</i> L. (Erable Sycomore)	début d'automne	automne	idem ci-dessus	à froid	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Idem ci-dessus.	Vernalisation de 4-10 semaines
<i>Alnus cordata</i> (Loisel.) Loisel. (Aulne à feuilles en coeur), <i>A. glutinosa</i> (L.) Gaertn. (A. glutineux), <i>A. incana</i> (L.) Moench (A. blanc), <i>A. viridis</i> (Chaix) DC. (A. des Alpes)	début d'automne	automne	que les petits pseudostrobiles ne soient pas ouverts.	à froid/ à chaud	+ 2°C	orthodoxe	Semis en février ou au printemps avec des semences traitées.	Vernalisation de 4-6 semaines
<i>Amelanchier ovalis</i> Medik. (Amélanchier à feuilles ovales)	été	été	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal de suite après la récolte ou printanier avec des semences traitées.	Vernalisation de 8-12 semaines.
<i>Arbutus unedo</i> L. (Arbousier)	automne	automne	la maturation est échelonnée et se prolonge dans le temps	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier, éventuellement avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 0-8 semaines.
<i>Berberis vulgaris</i> L. (Epinevinette)	été	automne		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 6-13 semaines (une estivation préalable peut être positive).
<i>Betula pendula</i> Roth (Bouleau pleureur)	été	fin d'été		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 4-8 semaines.
<i>Buxus sempervirens</i> L. (Buis)	été	été		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées.	
<i>Carpinus betulus</i> L. (Charme)	automne	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Présence de dormance complexe. Semis de fin d'été avec des semences encore vertes ou semis printanier avec des semences mûres traitées (DC) (GF) .	Estivation de 2-8 semaines suivie d'une vernalisation de 12-14 semaines.
<i>Carpinus orientalis</i> Mill. (Charme d'Orient)	automne	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences exposées à une estivation + vernalisation (DC) (GF) .	Estivation de 3-6 semaines suivie d'une vernalisation de 12-15 semaines.
<i>Castanea sativa</i> Mill. (Chataîgnier)	automne	automne		à froid	+ 2°C	récalcitrante	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées, généralement en nature au moment de la récolte.	

<i>Cedrus sp. pl.</i> (Cèdre)	automne	hiver	au moment de la récolte, présence de cônes immatures et matures	à froid	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Semis en février ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 3-6 semaines.
<i>Celtis australis</i> L. (Micocoulier)	automne	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées (GF).	Vernalisation de 8-12 semaines.
<i>Ceratonia siliqua</i> L. (Caroubier)	été	fin d'été		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences scarifiées.	Scarification mécanique.
<i>Cercis siliquastrum</i> L. (Arbre de Judée)	été	fin d'été		à froid		orthodoxe	Semis printanier avec des semences scarifiées (possibilité d'effectuer une brève vernalisation à la suite d'une scarification).	Scarification mécanique.
<i>Colutea arborescens</i> L. (Baguenaudier)	été	été		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences scarifiées.	Scarification mécanique.
<i>Coriaria myrtifolia</i> L. (Corroyère à feuilles de Myrte)	automne	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences prétraitées. Les températures alternées favorisent la germination.	Application d'une solution d'acide gibbérellique à : (2,6 x 10 ⁻³).
<i>Cornus mas</i> L. (Cornouiller mâle)	été	fin d'été	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Présente des dormances très complexes. Semis automnal (la germination commence au printemps suivant) ou printanier avec des semences exposées à une estivation suivie d'une vernalisation ; la scarification effectuée avant l'estivation peut être utile (DC).	Estivation de 16 semaines suivie d'une vernalisation de 4-16 semaines.
<i>Cornus sanguinea</i> L. (Cornouiller sanguin)	automne	automne	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences exposées à une estivation + une vernalisation ; la seule vernalisation peut être suffisante.	Vernalisation de 12-18 semaines (éventuellement précédée d'une estivation de 0-8 semaines).

<i>Corylus avellana</i> L. (Noisetier)	fin d'été	début d'automne	plusieurs types de prédatons	à froid	+ 2°C	sub- orthodoxe	Les semences ne supportent pas la déshydratation. Semis automnal ou printanier, dans les deux cas avec des noisettes vernalisées en nature au moment de la récolte.	Vernalisation.
<i>Cotinus coggygria</i> Scop. (Arbre à perruques, Sumac des teinturiers)	été	été		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences d'abord scarifiées mécaniquement ou chimiquement et ensuite vernalisées (DC).	Scarification mécanique ou chimique (acide sulfurique 30-45 minutes) suivie de 4-8 (ou plus) semaines de vernalisation en fonction de la provenance.
<i>Crataegus sp. pl.</i> (Aubépine)	automne	automne		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Semis en fin d'hiver – début de printemps avec des semences exposées à une estivation + une vernalisation, éventuellement d'abord scarifiées (DC).	Estivation de 4-16 semaines suivie d'une vernalisation de 12-20 semaines.
<i>Cytisus sp. pl.</i> (Cytise)	fin d'été	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences scarifiées.	Scarification mécanique ou chimique.
<i>Elaeagnus angustifolia</i> L. (Olivier de Bohême)	automne	automne		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Semis automnal ou de fin d'hiver – début de printemps avec des semences exposées à une estivation (quelquefois inutile) + une vernalisation. Un traitement alternatif consiste à immerger les semences dans l'eau courante (+15°C) pour 6 jours suivi d'une stratification froide pour 4 semaines (DS).	v. époque de semis
<i>Elaeagnus umbellata</i> Thunb. (Oléastre à ombelles)	automne	automne		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Semis automnal ou de fin d'hiver – début de printemps avec des semences immergées dans l'eau courante (+15°C) pour 6 jours et ensuite vernalisées pour 4 semaines (DS).	v. époque de semis

<i>Emerus majus</i> Mill. (<i>Hypocrepis emerus</i> subsp. <i>emerus</i>) (Coronille arbrisseau)	été	été		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences scarifiées mécaniquement ou immergées dans l'eau chaude pour 12-14 heures.	Scarification mécanique.
<i>Erica arborea</i> L. (Bruyère arborescente)	été	été		à froid	+ 2°C	orthodoxe		
<i>Euonymus europaeus</i> L. (Fusain, Fusain d'Europe)	automne	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou de début de printemps avec des semences exposées à une estivation + une vernalisation (DC) .	Estivation de 8-12 semaines suivie d'une vernalisation de 8-16 semaines.
<i>Fagus sylvatica</i> L. (Hêtre)	automne	automne		à froid / à chaud	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou de fin d'hiver – début de printemps avec des semences vernalisées. Eviter le semis printanier tardif lorsque les températures du sol s'élèvent afin d'éviter d'induire des dormances secondaires (GF) (DS) .	Vernalisation de 3-12 semaines (8 en moyenne).
<i>Frangula alnus</i> Mill. (<i>F. dodonei</i> subsp. <i>dodonei</i>) (Bourdaine), <i>F. rupestris</i> (Scop.) Schur.	été	été (<i>F. rupestris</i>), fin d'été - début d'automne (<i>F. alnus</i>)	maturité échelonnée (<i>F. alnus</i>)	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe		
<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl (Frêne à feuilles étroites)	automne	automne - hiver		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou de fin d'hiver – début de printemps avec des semences exposées à un prétraitement pour lever la dormance (DC) (GF) (DS) .	Prétraitements possibles : estivation (4 semaines) + vernalisation (4-8 semaines) ou seulement une vernalisation de 8-16 semaines.
<i>Fraxinus excelsior</i> L. (Frêne commun, F. élevé)	automne	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Présente une dormance complexe. Semis automnal ou printanier avec des semences prétraitées (DC) (GF) (DS) .	Estivation (8-16 semaines) + vernalisation (8-16 semaines).

<i>Fraxinus ornus</i> L. (Orme, Frêne à fleurs)	automne	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou de fin d'hiver – début de printemps avec des semences exposées à un prétraitement	Estivation (2-8 semaines) + vernalisation (8-15 semaines).
<i>Genista pilosa</i> L. (Genêt poilu), <i>G. radiata</i> (L.) Scop. (<i>G. rayonnant</i>), <i>G. tinctoria</i> L. (<i>G. des teinturiers</i>)	été	été		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences scarifiées.	Scarification mécanique ou chimique (immersion dans l'acide avec des durées variables).
<i>Hippophae rhamnoides</i> L. (Argousier)	été	fin d'été		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 4-12 semaines.
<i>Ilex aquifolium</i> L. (Houx)	automne	hiver		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Semis automnal ou printanier avec des semences prétraitées (DC).	La dormance, complexe et liée à la dissémination ornithochore, n'est pas facile à lever. On suggère une longue période d'estivation (jusqu'à 40 semaines) suivie d'une vernalisation (jusqu'à 24 semaines).
<i>Juglans regia</i> L. (Noyer)	automne	automne		à froid	+ 2°	sub- orthodoxe	Les semences ne supportent pas la déshydratation poussée. Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées, généralement en nature, pendant tout l'hiver.	
<i>Juniperus communis</i> L. (Genévrier commun), <i>J. oxycedrus</i> L. subsp. <i>macrocarpa</i> (Sibth. et Sm.) Neim. (Genévrier à gros fruits)	fin d'été	automne	Coexistence de fruits à plusieurs stades de maturité au moment de la récolte.	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou de fin d'hiver – début de printemps avec des semences traitées (DC).	Dormance très complexe qui peut être levée par une estivation suivie d'une vernalisation, il est possible que quelquefois la vernalisation suffise.
<i>Laburnum alpinum</i> (Mill.) Bercht. et J. Presl (Aubour des Alpes, Cytise des Alpes), <i>L. anagyroides</i> Medik (Aubour, Cytise à grappes)	automne	automne (<i>L. alpinum</i>), automne - hiver (<i>L. anagyroides</i>)		à froid	+ 2°	orthodoxe	Semis printanier avec des semences scarifiées.	Scarification mécanique ou chimique.

<i>Larix decidua</i> Mill. (Mélèze commun, Mélèze d'Europe)	automne	hiver	Il est possible aussi de récolter des vieux cônes.	à chaud	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal réussi ou printanier, de préférence avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 3 – 8 semaines.
<i>Laurus nobilis</i> L. (Laurier, Laurier-sauce)	automne	hiver	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Semis automnal immédiatement après la récolte (les semences perdent rapidement leur viabilité) ou printanier avec des semences vernalisées pendant l'hiver.	Vernalisation de 8-12 semaines.
<i>Ligustrum vulgare</i> L. (Troène commun)	été	automne	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 4-12 semaines.
<i>Lonicera alpigena</i> L. (Chèvrefeuille des Alpes), <i>Lonicera etrusca</i> Santi (Chèvrefeuille de Toscane), <i>Lonicera nigra</i> L. (Chèvrefeuille noir), <i>Lonicera xylosteum</i> L. (Chèvrefeuille à balais)	été	été (<i>L. etrusca</i>), été - automne (<i>L. nigra</i> et <i>L. xylosteum</i>) automne (<i>L. alpigena</i>)	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Peu d'information sur la propagation par graines, en général il est indiqué un semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées (DC).	Vernalisation de 12 semaines (parfois précédée d'une estivation de 8 semaines).
<i>Malus sylvestris</i> (L.) Mill. (Pommier sauvage)	automne	automne	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis immédiatement après la récolte ou printanier avec des semences traitées (DS).	Estivation (2-4 semaines) + vernalisation (12-16 semaines).
<i>Mespilus germanica</i> L. (Néflier)	fin d'été	automne	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Peu d'information sur la propagation par graines. Semis immédiatement après la récolte ou printanier avec des semences traitées (DS).	Estivation + vernalisation.
<i>Myrtus communis</i> L. (Myrte commun)	fin d'été	automne	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis tardif automnal ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 3-6 semaines.
<i>Morus alba</i> L. (Mûrier blanc), <i>M. nigra</i> L. (Mûrier noir)	printemps	fin de printemps	multiples prédatations	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal, après immersion dans l'eau froide pour 3-4 jours, sinon printanier avec des semences vernalisées	Vernalisation de 4-8 semaines.

<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop. (Charme-houblon)	fin d'été	automne - hiver		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis de fin d'hiver – début de printemps avec des semences exposées à une estivation + une vernalisation (DC) (GF) (DS) .	Estivation de 4-8 semaines suivie d'une vernalisation de 16-20 semaines.
<i>Paliurus spina-christi</i> Mill. (Epine du Christ, Paliure)	fin d'été	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 10-20 semaines.
<i>Phillyrea angustifolia</i> L., (Filaire à feuilles étroites) <i>P. latifolia</i> L. (Filaire à feuilles larges)	début d'automne	automne	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier, dans les deux cas il est bien d'employer des semences scarifiées.	Mécanique ou chimique (acide sulfurique 30 minutes).
<i>Picea abies</i> (L.) H. Karst. (Epicéa)	début d'automne	automne		à chaud	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences d'abord immergées dans l'eau froide pour 24-48 heures ou vernalisées.	Vernalisation de 2-3 semaines.
<i>Pinus sp. pl.</i> (Pin)	Été (automne pour <i>P. nigra</i> et <i>P. sylvestris</i>)	De déc. à juin. <i>P. halepensis</i> De nov. à mai <i>P. pinea</i> D'oct. à juin <i>P. pinaster</i> été (<i>P. mugo</i>), automne (<i>P. cembra</i> et <i>P. nigra</i>), aut.- hiver (<i>P. sylvestris</i>)		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Pour les pins méditerranéens, semis printanier sans prétraitement, pour les autres, semis printanier avec des semences vernalisées pour 4-10 semaines.	
<i>Pistacia lentiscus</i> L. (Pistachier lentisque)	fin d'été	automne		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées (2-3 semaines). En alternative semis printanier avec des semences scarifiées mécaniquement.	Vernalisation ou scarification v. époque de semis

<i>Pistacia terebinthus</i> L. (Pistachier Térébinthe)	fin d'été	automne	certaines années forte production de graines vides	à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 12 semaines.
<i>Platanus orientalis</i> L. (Platane d'Orient)	été	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis immédiatement après la récolte (hiver) ou printanier avec des semences vernalisées.	Vernalisation de 6-8 semaines
<i>Prunus amygdalus</i> Stokes (Amandier), <i>P. avium</i> L. (Merisier), <i>P. brigantina</i> Vill. (Prunier des Alpes), <i>P. cerasifer</i> Ehrh. (Mirabolan), <i>P. cerasus</i> L. (Griottier acide), <i>P. laurocerasus</i> L. (Laurier cerise), <i>P. mahaleb</i> L. (Cerisier de sainte Lucie), <i>P. padus</i> L. (Merisier à grappes), <i>P. spinosa</i> L. (Prunellier)	printemps (été pour <i>P. spinosa</i>)	été pour toutes sauf <i>P. mahaleb</i> (début d'été) et <i>P. spinosa</i> (fin d'été - automne)	prédation par l'avifaune, en particulier <i>P. avium</i> et <i>P. mahaleb</i>	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis de fin d'hiver – début de printemps (la germination est favorisée par l'alternance journalière des températures du sol) avec des semences exposées à un prétraitement pour lever la dormance (DS)	Estivation (2-6 semaines) + vernalisation (4-18 semaines), variable selon l'espèce. Pour <i>P. avium</i> on conseille vernal. 6 sem. + estiv. 2 sem. + vernal. 2 sem.; la germination est favorisée par une forte alternance journalière de températures (3°C la nuit, 20°C le jour).
<i>Pyrus spinosa</i> Forssk. (Poirier à feuilles d'amandier), <i>P. pyrastrer</i> Medik. (Poirier sauvage)	automne	automne	fréquente prédation par l'avifaune	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis de fin d'hiver – début de printemps (la germination est favorisée par l'alternance journalière des températures du sol) avec des semences exposées à un prétraitement pour lever la dormance (DC) (DS).	Estivation (2-4 semaines) + vernalisation (12-18 semaines).
<i>Quercus sp. pl.</i> (Chêne)	fin d'été	automne		à froid	+ 2°C	récalcitrante	Les semences ne supportent pas la déshydratation. Semis automnal immédiatement après la récolte ou printanier avec des semences vernalisées, généralement en nature, au moment de la récolte.	

<i>Rhamnus sp. pl.</i>	été	en général fin d'été – début d'automne	prédation multiple. Certaines années la production de graines vides est élevée.	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Le <i>Rhamnus</i> montre une dormance plutôt complexe qui peut varier selon l'année et la provenance. Semis automnal ou printanier avec des semences prétraitées (DC) .	Pour <i>Rhamnus alpinus</i> il est conseillé 12-16 semaines de vernalisation.
<i>Rosa sp. pl.</i>	fin d'été	automne		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis de fin d'hiver – début de printemps avec des semences exposées à une estivation + une vernalisation. L'ajout dans le substrat de stratification de substance utilisée comme starter de compostage, écourté la durée du traitement en dégradant l'endocarpe charnu. Les traitements ne sont pas toujours efficaces (DC) (GF) (DS) .	Estivation (8-24 semaines) + vernalisation (8-24 semaines).
<i>Ruscus aculeatus</i> L. (Petit-houx)	hiver	hiver - printemps		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	L'espèce montre une dormance très complexe et on ne connaît pas à ce jour de méthode vraiment efficace pour stimuler la germination. Semis printanier avec des semences exposées à une estivation + une vernalisation (pour plusieurs cycles) (DC) .	Estivation (4-8 semaines) + vernalisation (8-12 semaines).
<i>Sambucus sp. pl.</i>	été	été	fréquente prédation par l'avifaune (en particulier <i>S. nigra</i>)	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe		

<i>Sorbus sp. pl.</i>	été	fin d'été - automne (S. <i>aria</i> , S. <i>domestica</i>), automne (S. <i>aucuparia</i> , S. <i>torminalis</i>)	plusieurs types de prédation (en particulier sur S. <i>aucuparia</i> et S. <i>torminalis</i>)	nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis immédiatement après la récolte ou fin d'hiver – début de printemps (l'alternance journalière des températures favorise la germination alors qu'une température constante élevée induit une dormance secondaire) avec des semences exposées à une estivation + une vernalisation (ou seulement vernalisées) (DC) (DS) .	Estivation (0-4 semaines) + vernalisation (12-16 semaines).
<i>Spartium junceum</i> L. (Spartier à tige de jonc)	été	été - automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis printanier avec des semences scarifiées	Scarification.
<i>Staphylea pinnata</i> L. (Faux Pistachier)	automne	automne		à froid	+ 2°C	orthodoxe	Semis immédiatement après la récolte ou printanier avec des semences exposées à une estivation + une vernalisation (DC) .	Estivation (12 semaines) + vernalisation (12 semaines).
<i>Taxus baccata</i> L. (lf)	fin d'été	fin d'été – début d'automne		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Semis automnal (la germination se produit au deuxième printemps) ou printanier avec des semences exposées à un traitement (pas toujours efficace) (DC) .	Estivation (12-28 semaines) + vernalisation (8-16 semaines).
<i>Tilia sp. pl.</i>	automne	automne ou fin d'automne		à froid	+ 2°C	de conservation difficile (5)	Présente une dormance complexe. Si l'on emploie des graines non traitées, la germination se prolonge pendant 3 ans. Semis printanier avec des semences traitées (estivation + vernalisation) (DC) (GF) .	Estivation (16 semaines) + vernalisation (14-18 semaines).

<i>Ulmus sp. pl.</i>	printemps	printemps		à froid	+ 2°C	en nature, perte rapide de la viabilité; de conservation difficile (5)	Les graines d'orme n'ont pas de dormance. Semis immédiatement après la récolte (printemps).	
<i>Viburnum sp. pl.</i>	été (<i>V. lantana</i> et <i>V. opulus</i>), automne (<i>V. tinus</i>)	fin d'été - automne		nettoyage des fruits charnus	+ 2°C	orthodoxe	Semis automnal ou printanier avec des semences exposées à une estivation + une vernalisation (DC) (GF) .	v. époque de semis

Tableau 4 – Indications pour la récolte, la conservation et le semis des semences d'arbres et d'arbustes spontanés.

10.2. Comment déterminer les exigences écophysiologicals de la germination?

Conserver et gérer correctement le matériel végétal signifie aussi connaître les stratégies que l'espèce emploie pour se perpétuer. En particulier la propagation sexuée, parce qu'elle assure la plus grande diversité génétique, et, dans ce domaine, les exigences de nature écophysiologicals auxquelles les graines doivent satisfaire pour germer.

Face à des espèces rares ou des endémiques menacées d'extinction, quelquefois indispensables pour restaurer et délivrer aux générations futures un habitat de qualité, il n'est pas rare de découvrir un manque de connaissances total sur leur multiplication.

Une condition importante qui doit être vérifiée pour procéder à la propagation artificielle de plantes menacées ou d'un intérêt particulier est l'existence de dormance (§. 8.3) des graines au moment de la dissémination. Il est bien de rappeler que les graines appartenant aux espèces spontanées des régions tempérées froides du monde se sont adaptées à de tels milieux en nécessitant souvent un séjour dans le sol pendant un hiver ou bien pendant un été et un hiver, conditions qui ôtent naturellement la dormance et permettent la germination.

Dès que les inconnues sont définies, elles peuvent, dans beaucoup de cas, être éclaircies par des études précises qui tendent à faire la lumière sur les caractéristiques du cycle reproductif de l'espèce concernée et sur les liens avec les conditions ambiantes spécifiques qui provoquent la germination (écophysiologicals de la germination). Ce type d'approche de la connaissance scientifique sur la propagation a débuté aux Etats Unis dans les années 1990 et les procédures ont été progressivement améliorées (Baskin *et* Baskin, 1998 ; Piotta *et* Crosti, 2005). Dans ces études, il faut employer des graines fraîches (disséminées ou récoltées depuis peu), parce que la graine destinée à la conservation à moyen - long terme peut parfois modifier ses caractéristiques. Et il est de toute façon important de comprendre si le stockage implique un quelconque type de changement de la physiologie des graines (ex. : induction ou enlèvement de dormance).

Pour les premières données sur le type de dormance qui caractérise les graines d'une espèce, leur mode de dissémination peut livrer des renseignements. Connaître cet aspect est utile pour comprendre la détérioration des semences, ainsi que le type de dormance de l'espèce, surtout si l'information peut être complétée par l'observation des saisons auxquelles la germination des semences dispersées a lieu. Ainsi, en comparant avec le comportement d'espèces connues, des indications peuvent être trouvées. Quelques exemples de dormances liées à la dissémination (mais pas nécessairement provoquée par elle) peuvent apporter des explications :

- de nombreuses espèces qui évoluent dans les milieux fluviaux (*Populus*, *Salix*, *Ulmus*, etc.) disséminent au printemps et produisent généralement des graines non dormantes qui gèrent vite (mais qui se conservent difficilement) ;
- les graines des espèces disséminées en automne et qui gèrent au cours du printemps suivant ont une dormance généralement ôtée par une période de froid humide (l'hiver auquel elles sont exposées en conditions naturelles) ;
- les graines contenues dans des fruits de couleurs vives ou brillantes sont fréquemment ingérées et redisséminées en automne - hiver par les oiseaux ou les petits mammifères, elles montrent une dormance très complexe et difficile à ôter (*Cornus*, *Crataegus*, *Ilex*, *Viburnum*, etc..) ;
- les graines qui sont disséminées en fin de printemps - été gèrent au cours du second printemps suivant la dispersion, elles montrent généralement une dormance morpho - physiologique qui nécessite des conditions chaudes - humides (été),

suivies de périodes froides - humides (hiver) pour permettre la germination (ex. : de nombreuses *Rosaceae*) ;

- les graines qui sont dispersées au printemps ou en été et gement pendant l'automne ou l'hiver suivant, montrent une dormance morpho - physiologique et nécessitent une période chaude et sèche (été) pour activer les processus de germination (ex. : nombreuses *Cistaceae*).

La méthodologie de Baskin *et* Baskin (2003) développée aux Etats Unis pour déterminer les exigences des graines pour germer résulte d'applications relativement faciles (même avec les limites dues aux équipements scientifiques disponibles) et suffisamment souples pour être adaptées aux espèces ayant des caractéristiques de climats différents. Initialement ces essais consistaient dans le suivi des phases phénologiques qui se déroulaient à la dispersion des graines, par des semis immédiatement après la dissémination dans le milieu naturel avec des précautions pour éviter les dommages de la prédation. Afin de réaliser ce suivi, il était extrêmement important de confiner les graines dans des sachets de tissu non tissé et de les insérer dans des petites cages de métal (pour mieux identifier les lieux de dépôt et pour éviter les prédatations). Périodiquement le matériel était déterré et observé pour établir l'avancée de la germination. Il a été ensuite développé une méthodologie analogue mais réalisée en milieux contrôlés (armoires thermostatiques). Ces armoires, moins exposées à des situations aléatoires fournissent la possibilité de maintenir des conditions stables pour pouvoir arriver à déterminer la température ou la séquence de températures nécessaires pour ôter la dormance des espèces dont on ignore l'écophysologie de la germination.

Pour organiser les armoires thermostatiques ou autres milieux thermo - contrôlés employés pour les essais de germination, une série de températures sont choisies avec des constantes ou avec des alternances journalières, qui simulent les conditions thermiques de l'air au cours des différentes saisons de l'année de la région d'origine du matériel. Généralement il est prévu deux successions (tab. 5) qui sont basées sur la succession des saisons, et débutent l'une par hiver et l'autre par l'été. Les graines imbibées sont exposées en parallèle aux deux parcours et sont suivies jusqu'à la germination.

En fonction de la disponibilité en graines, l'essai peut être conduit à l'obscurité *et/ou* avec une photopériode. La durée de la photopériode doit être définie par l'opérateur mais elle est généralement comprise entre 8 et 14 heures journalières. La lumière est allumée pendant la phase chaude du cycle thermique, ou pendant n'importe quel moment de la journée lorsqu'il n'est pas prévu une alternance journalière de températures (par exemple pendant l'hiver à 5°C constant).

Pour chaque régime thermique employé dans les essais, il est prévu des répétitions qui seront toujours placées aux mêmes conditions de température et de lumière pour toute la durée de l'essai (témoin). Les graines exposées constamment à un régime thermique déterminé et qui ne gement pas dans les 30-40 jours sont considérées dormantes.

Le chercheur modifiera les températures des cycles pour se rapprocher le plus possible de celles enregistrées dans l'aire de l'espèce étudiée. En fonction de la disponibilité des équipements certaines saisons peuvent être éliminées lorsqu'il y a des limitations dans la disponibilité d'armoires thermo - régulées : on peut faire abstraction, par exemple, du début du printemps et de la fin de l'automne en ayant cependant l'habileté d'allonger de quatre autres semaines les périodes correspondantes à la fin du printemps et au début de l'automne (tab. 5). Dans ce cas, il y aurait seulement trois régimes thermiques différents. Ceux-ci peuvent être conduits dans une seule armoire dans laquelle les cycles seront successivement établis, ou bien dans trois armoires différentes ayant chacune un cycle fixe et dans lesquelles les graines seront transférées au fur et à mesure des périodes simulant les saisons.

S'il est décidé de dupliquer l'expérience en la menant aussi à l'obscurité, il suffira d'envelopper les contenants employés pour loger les graines avec un film d'aluminium. L'observation des graines germées se déroule hebdomadairement ou avec des fréquences plus élevées ; dans le cas du traitement à l'obscurité, l'observation devra s'effectuer sous une lumière modifiée par rapport au spectre visible.

Durée des phases du traitement (semaines)	Succession parallèle de cycles thermiques		Témoins			
	4 répétitions de 25 semences (A)	4 répétitions de 25 semences (B)	4 rép. de 25 sem. (C)	4 rép. de 25 sem. (D)	4 rép. de 25 sem. (E)	4 rép. de 25 sem. (F)
12	5°C hiver	25/15°C été	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C début printemps	20/10°C début d'automne	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C fin de printemps	15/6°C fin d'automne	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
12	25/15°C été	5°C hiver	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C début d'automne	15/6°C début de printemps**	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C fin d'automne	20/10°C fin de printemps **	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
12	5°C hiver	25/15°C été	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C début de printemps *	20/10°C début d'automne	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C fin de printemps *	15/6°C fin d'automne	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
12	25/15°C été	5°C hiver	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	20/10°C début d'automne	15/6°C début printemps	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C
4	15/6°C fin d'automne	20/10°C fin de printemps	5°C	15/6°C	20/10°C	25/15°C

Tableau 5 – Schéma pour l'organisation d'essais expérimentaux pour déterminer la température ou le cycle de températures nécessaires pour lever la dormance dans le cas où ces particularités ne sont pas connues. (modifié de Baskin et Baskin, 2003)

10.2.1. Interprétation des résultats

Si l'espèce a seulement besoin du froid humide d'hiver pour ôter la dormance et de températures plus élevées pour germer, les graines qui débutent avec la phase froide (colonne A) germeront dans la période simulant la saison suivante (printemps), tandis que les graines de la colonne B germeront pendant leur cinquième ou sixième phase (celles-ci

représentant le printemps), seulement après avoir traversé une période d'hiver. Il ne sera pas observé de germination pendant les contrôles à température constante. Une variante à ce cas classique, pourrait être fournie par des graines capables de germer à des températures très basses une fois satisfaite leur nécessité de froid, dans ce cas, il peut être observé une germination tant à la fin de la première phase de la colonne A qu'à la fin de la quatrième phase de la colonne B, toutes les deux à de basses températures, ou bien après une certaine période en température constante à 5°C (colonne C).

Les graines qui ont besoin des séquences suivantes, chaud humide (été) + froid humide (hiver) pour ôter la dormance, germeront pendant le printemps suivant si elles sont soumises à la séquence prévue dans la colonne A (v. tab. 5, mis en évidence avec un astérisque). Ceci se produit normalement en milieu naturel pour beaucoup de *Rosaceae* et pour le frêne élevé (*Fraxinus excelsior* L.). Si, par contre, une partie de la germination s'observe avant la fin de la phase chaude (colonne B), les besoins de chaud humide + froid humides sont nécessaires pour compléter la germination (tab. 5, mis en évidence avec deux astérisques). Afin d'optimiser d'éventuels traitements futurs on doit tenir compte de ce que les graines qui ont ce type de dormance (dite morpho - physiologique), ont besoin de passer progressivement d'abord par la phase chaude, pour compléter le développement de l'embryon, et seulement après par la phase froide qui n'agit efficacement du point de vue physiologique que si l'embryon a atteint sa maturité.

Il est évident qu'une procédure parallèle, dans laquelle les successions thermiques partent de saisons différentes comme l'hiver et l'été, permet d'obtenir des réponses plus rapides.

Les résultats de ces études peuvent avoir besoin d'être approfondis pour déterminer, par exemple, la durée adéquate des cycles thermiques. Il peut être également utile, afin d'optimiser la simultanéité de la germination, de déterminer la température de germination optimale à appliquer après l'enlèvement de la dormance. Les températures idéales pour la germination sont parfois plus basses que celles que l'on pourrait prévoir, surtout en milieux méditerranéens et tempérés où les périodes fraîches (automne) sont aussi les plus humides de l'année et représentent donc l'époque idéale pour la germination de beaucoup d'espèces.

La méthodologie pour déterminer les exigences écophysologiques de la germination permet d'obtenir des informations assez précises dans des temps généralement compris entre 12-14 mois, mais les ajustements à apporter à la procédure sont nombreux et restent de la décision du chercheur qui tiendra compte de la disponibilité des graines, du type, de la quantité et de la capacité des milieux thermo - contrôlés et de la précision des informations qu'on souhaite obtenir.

10.3. Récolte, conservation et gestion du matériel végétal des Salicaceae

Les peupliers et les saules peuvent être facilement propagés par graines ou par multiplication végétative, mais c'est surtout la facilité de propagation par boutures ligneuses qui a favorisé, avec le temps, les programmes d'amélioration génétique et l'évolution des techniques culturales. La possibilité de récolter du matériel végétatif sur les meilleurs génotypes spontanés identifiés le long des fleuves en vue d'une propagation et d'une culture réussies, a souvent fait oublier la notion de gestion durable aux agriculteurs. Pour la culture du peuplier, comme pour toutes les espèces agricoles et forestières, la gestion durable des ressources génétiques et le progrès génétique à long terme ne peuvent être assurés qu'à travers la conservation d'une biodiversité élevée et en favorisant la recombinaison génétique qui suit la reproduction sexuée (Bisoffi *et al.*, 1999).

La variabilité génétique peut être maintenue soit par la protection des habitats naturels (réserves génétiques primaires ou collections *in situ*), soit au moyen de la constitution de réserves secondaires (collections *ex situ*) (fig. 41). En considérant la grande variabilité

présente dans le genre *Populus*, l'objectif principal doit être de favoriser l'évolution des diverses espèces par la protection des populations naturelles. Une partie de la variabilité génétique existante dans les formations spontanées, déjà identifiée, récoltée et caractérisée, peut être efficacement conservée en propageant les génotypes en banques clonales et en arboretums de collection ; il s'agit d'activités qui, pour leur réalisation et gestion, demandent des terres agricoles disponibles et de considérables ressources humaines et financières, mais qui sont toutefois insuffisantes pour assurer une gestion optimale des ressources génétiques, même pour les risques de type phyto - sanitaire auxquels ils peuvent être sujets. Une forme plus économique que la conservation de matériel végétal, qui complète bien les méthodes traditionnelles de conservation, est la création de banques de pollen, de graines et de cultures de tissu *in vitro*. De plus, cette méthode facilite le déplacement du matériel génétique entre les différentes institutions, en limitant les problèmes phyto - sanitaires qui se produisent avec l'échange de rameaux, boutures, ou autre matériel végétal similaire.



Figure 41 – Arboretum de semenciers de *Populus nigra*. (photo: L. Vietto)

Parmi les diverses espèces de peuplier, sur le continent européen, une attention particulière doit être portée à *Populus nigra* Mill. (Peuplier noir). Pour cette espèce, dans quelques zones du Danube, des projets coordonnés de conservation *in situ*, ont été menés mais il s'agit de programmes de protection générique d'écosystèmes fluviaux, sans mesures spécifiques pour une espèce considérée comme à risque de disparition dans une grande partie de l'Europe occidentale, Italie comprise. Il manque encore une information cognitive de type inventaire sur la localisation des formations naturelles, qui pourrait constituer le début fondamental d'une action de conservation systématique, même si maintenant elle reste difficilement applicable sur une grande échelle en raison de l'extrême fragmentation et de l'altération des milieux fluviaux originels (Cagelli, 1998). Jamais comme dans ce cas, en traitant d'une espèce pionnière symbole des milieux fluviaux et en même temps de l'importance stratégique pour les programmes d'hybridations au niveau international, il n'a été aussi important de constituer des réserves génétiques secondaires. Dans le cadre du programme *European Forest Genetic Resources Program* (http://www.ipgri.cgiar.org/networks/euforgen/euf_home.asp) le *Populus nigra* Network a

coordonné plusieurs initiatives orientées vers la création de collections de matériels végétaux garantissant l'origine et l'identité de divers pays européens. Une *core - collection* comprend notamment des génotypes représentant l'ensemble de l'aire de répartition de l'espèce et des bases de données spécifiques qui recueillent des informations sur plus de 3300 génotypes maintenus dans 20 pays et en gère l'entière activité (Vietto *et Bianco*, 2005). Pour le peuplier noir, grâce à une grande disponibilité de connaissances sur les stratégies de conservation (Léfèvre *et al.*, 2001), dans quelques pays comme l'Italie (Vietto *et Chiarabaglio*, 2004) et la Belgique (Vanden Broeck *et al.*, 2002) une "conservation *ex situ* dynamique" a été initiée. Il s'agit d'une forme active de conservation à long terme qui consiste à créer, dans des sites adaptés aux restaurations naturelles, des peuplements artificiels assimilables à des arboretums de graines (fig. 41) et caractérisés par une forte variabilité génétique. Ainsi la reproduction sexuée et l'évolution des complexes géniques, comme réponses à des modifications du milieu, climatiques ou biotiques, pourront assurer la survie de l'espèce dans les milieux fluviaux d'origine.

10.3.1. Propagation agamique

La reproduction agamique se déroule généralement pendant le repos végétatif. La période favorable à la récolte du matériel destiné à la production de boutures ligneuses est la fin de l'hiver (février - mars). Des pousses, rejets ou branches âgées d'un an sont utilisés pour obtenir facilement des boutures de longueur standard (environ 20 cm) avec un grand nombre de bourgeons latéraux et particulièrement adaptés à la transplantation mécanisée. Lorsque la multiplication se fait à partir d'arbres adultes, des branches âgées de 3-4 ans, si possible les plus vigoureuses du houppier sont généralement prélevées ; Les boutures produites devront avoir une longueur optimale (environ un mètre) et surtout porter des bourgeons latents à la base des branches latérales ou immédiatement en dessous de l'anneau qui sépare l'accroissement de deux années successives, elles devront être plantées manuellement en enterrant au moins 2/3 de leur longueur.

La propagation clonale permet, pour la plupart des espèces de peupliers et de saules, de préserver presque intégralement quelques caractéristiques importantes comme la capacité d'enracinement, le port, l'accroissement, la forme et la vigueur. L'installation des boutures en conditions et pépinières appropriées permet d'obtenir des plantes ayant les mêmes capacités de croissance et de développement que les plantes mères. On peut par contre remarquer qu'en ce qui concerne quelques caractères morphologiques et physiologiques, surtout en cas de propagation d'exemplaires adultes, il existe une certaine variabilité intraclonale liée aux conditions édaphiques et environnementales dans lesquelles ils ont poussé, à l'âge de la souche, et à la partie de houppier prélevé pour la multiplication (Frison, 1996).

En considérant que les *Salicaceae* sont des plantes dioïques, on doit, pour effectuer les prélèvements, tendre vers un pourcentage équitable de matériel agamique provenant de plantes des deux sexes (Landis *et al.*, 2004).

Le matériel destiné à la propagation (branches ou rameaux) et les boutures produites peuvent être conservés pendant 1 à 2 mois dans un lieu réfrigéré à des températures comprises entre - 2 C° et + 4 C°, éventuellement en fermés dans des sachets de nylon ou, en cas de grandes quantités de matériel, mis en caisses protégées par des sacs de jute afin de prévenir une déshydratation excessive. On effectue parfois un traitement chimique avec des dithiocarbamates. Lorsqu'il est nécessaire de faire des expéditions de matériel qui demandent des temps longs pour le dédouanement et la consigne, il est d'usage de protéger les extrémités des boutures avec du mastic adapté, de la cire, ou simplement d'emballer les boutures dans des sachets fermés sous vide.

La capacité d'enracinement dépend surtout de facteurs génétiques variables d'une espèce

à l'autre, mais elle est conditionnée par des facteurs morphologiques, physiologiques, ambiants, souvent interagissants et concomitants entre eux, et tend en général à se réduire à mesure que l'âge du matériel utilisé pour la propagation augmente.

Avant de procéder à l'installation, il est de bonne pratique d'hydrater le matériel en le plongeant dans l'eau pendant une période de 10 à 15 jours selon l'état d'hydratation initial et surtout lorsqu'au cours de la saison végétative il y a eu des stress hydriques prolongés.

Dans le cas de *Populus nigra* les boutures racinent très facilement ; lorsque le matériel de départ a deux ans ou plus d'âge il est souvent opportun de préparer des boutures de grande longueur (30-50 cm) par rapport au standard. Les sujets de *Populus deltoides* Marshall (Peuplier noir américain) présentent par contre une aptitude à l'enracinement bien inférieure à celle du *P. nigra*, avec des différences considérables entre divers génotypes qui sont particulièrement faibles surtout avec les individus caractérisés par des cycles végétatifs plutôt longs et ayant une faible lignification de tissus et par conséquent de fortes prédispositions à la déshydratation. La plupart des hybrides de *Populus x canadensis*, clones de peupliers communément désignés d'« euraméricains » parce qu'obtenus de croisements entre des sujets femelles de *P. deltoides* et des sujets mâles de *P. nigra*, sont généralement caractérisés par d'excellentes capacités d'enracinement, aptitude héritée du parent mâle. La forte ou faible capacité d'enracinement conditionne nettement l'enracinement du matériel en pépinière. C'est pour cette raison que, à l'occasion de l'installation d'une pépinière, en plus de réduire au minimum la période entre le déracinage et la mise en place du peuplement, les plantations de clones euraméricains sont généralement constitués en plein hiver (novembre - février), alors que pour les plantations de *P. deltoides* ou de clones phénotypiquement semblables à cette espèce, l'installation est en général effectuée plus tardivement (février - mars), de façon à limiter une déshydratation excessive du matériel après la mise en place. Pour *Populus alba* L. (peuplier blanc) la capacité rhizogène et l'enracinement sont très variables selon le génotype, mais même dans ce cas les résultats peuvent être améliorés en augmentant la longueur de la bouture (30-50 cm). Au contraire, les possibilités de propagation par boutures de *Populus tremula* L. (peuplier tremble), *Populus tremuloides* Michx et *Populus grandidentata* Michx sont très limitées, phénomène probablement lié à l'absence de primordiaux radicaux sur les branches. Les possibilités de propagation végétative des peupliers trembles sont en somme limitées à l'emploi de rejets radicaux qui peuvent être facilement prélevés sur des racines proches de la surface. Les rejets radicaux sont utilisés avec succès pour obtenir des boutures vertes pendant la période estivale (juin - juillet) ; dans ce cas les boutures, constituées d'une partie de racine et d'une partie, de quelques centimètres, de pousses feuillées, doivent être propagées en conditions contrôlées de température et d'humidité, sur un substrat stérile et avec l'emploi d'auxine.

En ce qui concerne d'autres espèces mineures de peupliers, la capacité rhizogène est très variable d'une espèce à l'autre. *Populus euphratica* Oliver, *P. lasiocarpa* Oliver, *P. heterophylla* L. présentent en général des difficultés considérables d'enracinement. Au contraire, certaines espèces américaines tels *P. trichocarpa* Torr et A. Gray et *P. balsamifera* Mill., et d'autres typiquement asiatiques comme *P. laurifolia* Ledeb, *P. maximowiczii* Henry, *P. coreana*, *P. simonii* Carrière, *P. yunnanensis* Dode peuvent se propager facilement grâce à une bonne capacité rhizogène des boutures (Frison, *op. cit.*).

La technique de greffe peut être une bonne alternative pour les clones de peupliers qui ayant une aptitude insuffisante à la propagation par bouture. L'utilisation à des fins commerciales est limitée presque exclusivement à des sujets de *P. tremula* qui sont généralement greffés, en flûte ou par bourgeon, sur des plantes d'un an, de la même espèce ou de Peuplier blanc. La greffe par approche est depuis longtemps pratiquée avec succès pour les activités scientifiques expérimentales (fig. 42).



Figure 42 – Greffe par approche (photo: L. Cagelli)

Ce type de greffe est réalisé pendant les saisons végétatives (août), en greffant sur le porte-greffe (plantes maintenues en vase, généralement des clones I- 2 14, *P. x canadensis*) des branches florales (femelles prélevées sur des sujets adultes, fig. 43) destinées à la pollinisation contrôlée pendant le printemps suivant. Pour induire des floraisons anticipées on peut aussi pratiquer une greffe à double brin à l'anglaise.

Pour la conservation à moyen terme de clones caractérisés par un intérêt commercial, les procédures de micropropagations *in vitro* sont disponibles (Lubrano, 1992). Cette technique permet, par rapport à la propagation végétative par bouture, une meilleure rapidité de propagation, une possibilité de conservation du matériel pour de longues périodes, et elle est aussi utilisée pour des échanges de matériel sans encourir de problèmes de nature phyto-sanitaire. Suite à des résultats prometteurs obtenus sur d'autres cultures ligneuses, la cryoconservation a aussi été récemment testée sur le peuplier. Au moyen de la technique de vitrification suivie de l'immersion directe dans l'azote liquide (-196°C), avec des méristèmes primaires ou des tissus d'embryons on a obtenu un fort pourcentage de survie pour *P. alba* (82%), satisfaisant pour *P. canescens* Sm. (54%), insuffisant pour *P. nigra* (22%) (Lambardi, 2002).

10.3.2. Propagation gamétique

La disponibilité d'une grande variabilité génétique est la condition essentielle à une bonne gestion des ressources de matériel végétal, au-delà de la réalisation des programmes d'amélioration génétique. Dans ce domaine, les échanges de graines permettent de constituer des populations de base caractérisées par une grande variabilité, et les échanges de pollen permettent la réalisation immédiate de croisements avec des sujets femelles d'intérêt particulier et le démarrage précoce de programmes d'hybridation.

Les recherches effectuées sont nombreuses, pour évaluer la viabilité et la faculté germinative du pollen et des graines, pour connaître les conditions optimales nécessaires à la conservation à long terme et surtout pour déterminer l'influence des différents facteurs pouvant influencer négativement, dans le temps, sur la faculté germinative et sur la structure génétique.



Figure 43 – Récolte de rameaux floraux avec des capsules proches de la dissémination. (photo: C. Lioia)

10.3.3. Récolte et conservation des semences

En nature et dans les conditions climatiques de la plaine du Pô, la floraison débute généralement début mars. En milieu contrôlé (ex. : serre) la floraison du matériel récolté sur le terrain peut être provoquée prématurément pendant toute la période de repos végétatif et la rapidité d'apparition des chatons augmente si le matériel est prélevé vers la fin de l'hiver, surtout si les branches florales subissent préventivement une période de conditionnement à + 4 C° pendant environ un mois. Les meilleurs producteurs de graines sont les sujets adultes isolés. Le peuplier est en mesure de fleurir et de produire des graines dès l'âge de 5 -10 ans, parfois même plus précocement en conditions particulières de stress. Les graines (fig. 44) sont très petites et un gramme contient en moyenne 1000 graines, le poids et le volume varient considérablement d'une espèce à l'autre : il passe de 442.000 - 3.300.000 graines par Kg dans le cas de *P. deltoides*, 1.000.000 - 1.100.000 graines par Kg pour *P. nigra* et 1.600.000 - 1.800.000 graines par Kg pour *P. alba*, pour atteindre des valeurs de 5.900.000 - 19.700.000 dans le cas de *P. tremula* (Piotto, 1992 ; Piotto *et Di Noi*, 2001). En ce qui concerne les saules, les graines sont en général beaucoup plus petites, en moyenne 12.000.000 - 15.000.000 de graines par Kg dans le cas de *Salix alba* L.



Figure 44 – Semences de peuplier. (photo: L. Cagelli)

La récolte des graines doit se faire au moment le plus proche de la dissémination naturelle, c'est-à-dire pendant la phase d'ouverture des capsules ; si ces dernières sont récoltées trop prématurément, elles fournissent des graines caractérisées par une viabilité insuffisante. En tout cas la période entre la récolte et le début de la phase de conservation doit être la plus brève possible. Afin de prévenir des détériorations éventuelles, les fruits doivent être disposés en fines couches et laissés sécher à température ambiante (1 - 2 jours), de façon à pouvoir ramasser les graines et les séparer de la bourre en une semaine. Le nettoyage (fig. 45) de lots de graines de *P. nigra* ou de *P. deltoides* peut se faire à l'aide d'un jet d'air comprimé à travers une série de tamis à mailles de 1.6 mm et donner de bons résultats.



Figure 45 – Nettoyage des semences de *Populus nigra*. (photo: C. Lioia)

La faculté germinative est généralement élevée (80% - 90%), mais elle peut se réduire considérablement en seulement 3 - 4 semaines, surtout si les graines sont exposées à l'air quelques jours après la déhiscence des capsules. Les graines de peuplier gement très rapidement : en conditions favorables, si la graine est fraîche, la germination peut se produire en seulement 6 - 12 heures. Un test de germination rapide (fig. 46) peut être exécuté en disposant les graines (nbre de 100 pour trois répliques) sur des disques de papier filtre imbibés d'eau déionisée dans des boîtes de Pétri à + 25 C°, et en évaluant la germinabilité après 7 - 10 jours selon le test proposé par Simak (1980). Pour déterminer avec plus de certitude les résultats des tests de germination il est possible de réaliser un test colorimétrique de façon à évaluer la vitalité du lot de graines (fig. 47). Même si l'épicotyle émerge généralement des téguments séminaux avec une certaine rapidité, il faut considérer que pour des graines apparemment normales il est également possible d'obtenir un nombre élevé de gemes anormaux, y compris avec une variabilité considérable entre espèces, même entre des géotypes de la même espèce. Pour des semis importants on emploie généralement des plaques alvéolaires de 20 cm³ de capacité, remplies d'un substrat tourbeux et placées en serres climatisées à 18°C - 20°C ; dans ces conditions l'émergence des plantules s'effectue environ en une semaine (Casson, *in verbis*).

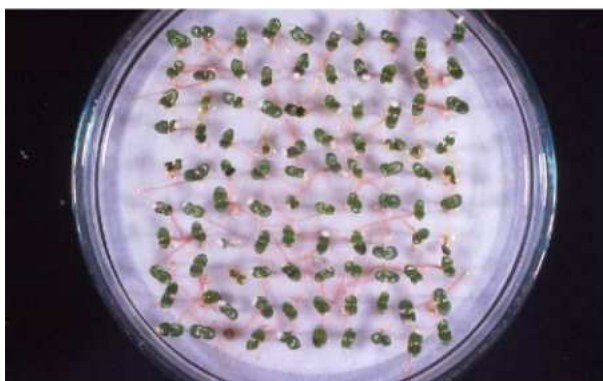


Figure 46 - Test de germination sur des semences de *Populus nigra*.

(photo: L. Cagelli)



Figure 47- Test colorimétrique au TTC de semences de *Populus nigra*.

(photo: L. Cagelli)

De nombreux facteurs influent sur la germination : époque de récolte, laps de temps entre la récolte et le début de la conservation, teneur en humidité des graines et température de conservation. La déshydratation est un élément très important de la conservation : les graines peuvent être conservées avec succès pendant de nombreuses années à basses températures si le contenu hydrique est préalablement réduit à 5-8%. Le niveau d'hydratation peut être déterminé rapidement en déshydratant avec une thermobalance à rayons infrarouges des quantités de graines d'environ 200 mg. Dans le cas de graines de *P. nigra*, il arrive que la déshydratation se fasse naturellement sans aucune nécessité de traitement. Le taux d'humidité doit être réduit progressivement ; pour atteindre les valeurs optimales d'hydratation, une méthode efficace consiste à laisser les graines dans un courant d'air pendant une période de 2-5 jours à + 20 C°, ou mieux, de mettre le matériel dans une étuve à une température de 35 C° pendant environ 10-30 minutes, selon la teneur initiale en eau.

Le matériel destiné à la conservation peut-être préalablement placé dans des petits contenants comme des éprouvettes, ou mieux, dans des enveloppes fermées sous vide. La température de conservation est un facteur très important : à + 4 C° il n'est pas possible de préserver la capacité germinative même pour des périodes inférieures à un an. Dans le cas de lots de graines de *P. deltoides*, de *P. nigra* et de *P. x canadensis*, les meilleurs résultats ont été obtenus avec des températures comprises entre -18 C° et -40 C° (Cagelli, 1997). Du moment qu'il n'a jamais été remarqué de différences significatives de germinabilité dans cet intervalle de températures, la température de -18 C°, facilement atteinte dans un congélateur classique, peut être considérée comme optimale pour préserver la viabilité de lots de graines sur une longue période. Dans ces conditions quelques lots de graines des espèces citées ont maintenu une bonne faculté germinative (40-50%) pendant 10 ans. Après une longue conservation et avant d'utiliser les semences, il est opportun que, soit le temps de passage de températures très basses à des valeurs avoisinant + 20 C°, soit la

réhydratation, se fasse progressivement, surtout pour éviter que des imbibitions trop rapides puissent provoquer des dommages irréversibles.

10.3.4. Récolte et conservation du pollen

Comme pour les graines, la viabilité du pollen dépend de différents facteurs : le moment et la méthode de récolte, le temps écoulé entre la récolte et le début du stockage, le taux d'humidité et la température de conservation.

Alors que la qualité de la graine peut être facilement vérifiée au moyen d'un test de germination, l'essai de viabilité du pollen chez les *Salicaceae* est plus difficile. On ne dispose pas encore d'informations suffisantes sur la corrélation entre la viabilité du pollen et la capacité de fécondation. Cette dernière caractéristique s'apprécie par la quantité de graines produites par le sujet femelle fécondé : selon des données fournies d'expériences précédentes, il semble que, même avec des lots de pollen caractérisés par une viabilité insuffisante, on obtient généralement de bonnes productions de graines en termes quantitatifs.

Les branches florales mâles peuvent être récoltées pendant toute la période hivernale ; la plus grande quantité de pollen est obtenue de branches prélevées à proximité des rejets, celles-ci peuvent être conservées dans des vases, avec de l'eau (fig. 48), et maintenues en ambiance contrôlée (serre) avec une température d'environ + 20 C° et une humidité relative de 70%.

La récolte du pollen peut être effectuée selon deux méthodes : directement à partir des anthères, au moment de la déhiscence naturelle, ou bien des chatons récoltés en fin de développement et laissés pendant 24 heures sur des tamis, à une température d'environ + 25 C° et avec une humidité relative d'à peu près 40%. La geminabilité est élevée immédiatement après la récolte, mais peut décroître rapidement jusqu'à devenir nulle après une période de conservation d'une semaine à + 4 C° avec du gel de silice. L'un des tests les plus utilisés pour évaluer la faculté geminative *in vitro* est celui proposé de Brewbacker et Kwack (1963). Il consiste à préparer un substrat d'agarose (KNO₃ 0.1 g/l ; CaNO₃ 0.3 g/l ; H₃BO₃ 0.1 g/l ; MgSO₄ 7H₂O 0.2 g/l ; saccharose 100 g/l pour *P. deltoïdes*, 200 g/l pour *P. nigra*), sur lequel on pose les grains de pollen à germer. La germination (fig. 49) est évaluée après 12 à 24 heures d'inoculation en mesurant la longueur du tube pollinique. Une autre méthode rapide, est le test au tetrazolium qui permet d'évaluer la viabilité du pollen sur la base de l'intensité de coloration prise par les grains de pollens. Ceux qui réagissent positivement à ce test prennent une coloration allant du rose clair au rose intense, la réaction colorimétrique commence après environ trente minutes et atteint son maximum au bout d'une heure (Rajora et Zuffa, 1986).



Figure 48 – Récolte du pollen. (photo: L. Cagelli)



Figure 49 – Pollen de *Populus nigra* en germination. (photo: L. Cagelli)

La teneur en humidité des grains de pollen varie considérablement d'une espèce à l'autre et selon les divers génotypes d'une même espèce, dans un intervalle compris entre 10% et 80%. Même dans le cas du pollen, en ce qui concerne la conservation dans le temps, le contenu hydrique semble être le facteur fondamental. Avant de placer le matériel en conservation il est nécessaire de réduire ce contenu hydrique à des valeurs inférieures à 10%. Tant pour le pollen de *P. nigra* que pour celui de *P. deltoides*, 2 heures sur du gel de silice à + 4 C° permettent généralement d'abaisser le taux d'humidité aux environs de 7-10%. Toutefois, une période de déshydratation de 12 heures à + 4C° est la technique la plus communément employée et la plus sûre pour la gestion de pollen dont les contenus en humidité sont très variables. Dans ce cas le contenu hydrique peut aussi être évalué en déshydratant des échantillons d'environ 120 mg de pollen, à l'aide d'une thermobalance à rayons infrarouges (méthode destructive). Après déshydratation, le pollen peut être conservé efficacement à des températures comprises entre -18 C° et - 40 C° pendant au moins un an. Des études ultérieures seront nécessaires pour déterminer les contenus hydriques et les températures les plus adaptées à une plus longue conservation du pollen. Actuellement, sur la base de tests menés au cours de croisements artificiels, des lots de pollen conservés pendant 5 ans dans un congélateur à -40 C° ont été utilisés avec succès tant pour leur capacité fécondante que pour le nombre et la qualité des graines produites. La seule précaution importante à prendre est de réhydrater progressivement le matériel avant son utilisation. Pour le pollen conservé sur peu de temps, il suffit de l'exposer à une forte humidité (60-70%) pendant 1 à 2 heures à + 20 C°; après une longue conservation il est important d'assurer une élévation progressive de température, en hydratant d'abord le matériel pendant 1 heure à + 4 C° puis pendant 2 heures à + 20 C° (Stanton et Villar, 1996).

10.4. Un exemple d'étude démographique : le programme AFA en Espagne

Concernant l'étude démographique des populations et l'étude de la dynamique des populations, un exemple de la méthodologie adoptée est présenté par le programme AFA (*Atlas Flora Amenazada* – Atlas de la Flore Menacée), développé récemment en Espagne (Albert *et al.*, 2003).

Le programme a été promu et financé par le Ministère de l'Environnement Espagnol, et voit l'implication de plus d'une centaine d'experts dont l'objectif principal est d'analyser l'état de conservation de la flore d'Espagne pour en faciliter la gestion dans une optique de conservation. Au cours de la première année du programme (2000) les données relatives à la flore ont été mises à jour et unifiées sur la base des catégories établies par *International*

Union for the Conservation of Nature (IUCN), pour arriver à la publication du Livre rouge de la flore menacée d'Espagne (Bañares *et al.*, 2003). Puis pendant deux ans 2001-2002, des analyses de terrain ont été réalisées sur les espèces, dans le but d'uniformiser le travail de toutes les unités opérationnelles, et de définir la méthodologie de recueil des données des analyses démographiques. Tout cela a permis l'élaboration d'un manuel méthodologique.

En particulier pour l'étude de la dynamique des populations, on a tenu compte de la nécessité d'avoir, pendant de nombreuses années, des données relatives à la taille des individus, à la production de graines, au nombre de plantules qui germent et au nombre de celles qui survivent. Cela a nécessité un suivi de chaque exemplaire pendant longtemps, en considérant un nombre d'exemplaires représentatif de la population dans son ensemble. Ce type d'étude peut s'appliquer, avec toutefois quelques difficultés, à des plantes pérennes (par exemple, des géophytes à un stade végétatif) mais pas à des espèces annuelles pour lesquelles il devient nécessaire d'analyser la banque de graines du sol. Dans le cas de populations avec un nombre limité d'individus, comme dans le cas de quelques endémiques ponctuelles, il est important d'effectuer des suivis sur toute la population, en recensant tous les individus présents. Alors que dans le cas d'études réalisées sur des populations étendues et avec une large distribution, il devient indispensable de déterminer des aires de tests (carrés permanents), de dimensions variables selon le *taxon* étudié, représentatives de la population et de tous les habitats dans lesquels cette espèce se trouve. Le nombre, la localisation et les dimensions des carrés permanents sont corrélés aux dimensions de la population et au rang écologique de la distribution de l'espèce. Par exemple :

- Populations réduites (moins de 3000 exemplaires) et homogènes : une parcelle incluant au moins 10% des individus est délimitée, et ceux-ci sont tous analysés, indépendamment de leur taille ou de leur stade de développement. En cas de microhabitats évidents et différents, il est préférable de sélectionner des parcelles significatives, après avoir déterminé chacune d'elles.
- Populations grandes et homogènes : deux parcelles sont déterminées au hasard comprenant chacune au moins 5% de tous les individus de la population, avec au maximum 300 individus. Si la population n'est pas homogène on doit sélectionner 2-4 parcelles, situées dans les différents microhabitats sélectionnés.

Si la topographie du lieu le permet les parcelles seront de préférence carrées ou rectangulaires. Les 4 sommets seront indiqués par des piquets, alors qu'on utilisera des cordes pour les côtés. Si la forme de la parcelle n'est pas optimale, il est important d'en faire un dessin extrêmement détaillé et de rapporter les mesures pour pouvoir calculer l'aire totale et donc la densité des plantes ; on peut si nécessaire déterminer à l'intérieur de l'aire de tests de nombreuses sous-parcelles de façon à inclure les 300 individus. En situations particulières (falaises ou affleurements rocheux), on peut utiliser de la peinture pour délimiter les aires. Il est fondamental de rédiger pour chaque parcelle une monographie du lieu, avec des photos, des références métriques et les indications permettant de le retrouver, de façon que quiconque puisse s'y rendre à tout moment.

10.4.1. Etude des individus

Afin de suivre au fil des ans la croissance, la survie et la régénération des populations, il est nécessaire d'identifier tous les individus présents dans la parcelle, y compris ceux qui apparaîtront dans le temps, en attribuant à chacun un code alphanumérique d'identification. Il est fondamental de réaliser ce recensement pendant la période de floraison - fructification pour pouvoir déterminer tous les exemplaires d'une population, surtout lorsque ceux-ci sont

de dimensions réduites et pourraient par conséquent passer inaperçus ; de cette façon il sera possible de recueillir, en même temps, les données relatives à l'accroissement, la survie et la biologie reproductive des individus. Un tel recensement doit être répété tous les ans, à des dates très semblables (avec des marges d'un mois maximum d'une année à l'autre) pour obtenir des données homogènes et comparables.

Pour les plantes annuelles il ne sert à rien de marquer les individus, sauf si l'on veut faire l'étude de la phénologie de la floraison et/ou des fructifications.

Pour les autres espèces, la méthode d'identification des individus dépend de la taille des individus adultes, de la forme biologique et du type d'habitat.

Chaque individu d'une parcelle peut être repéré de différentes manières, par exemple au moyen de :

- piquets en bois ou en fer zingué (environ 7 cm de longueur) enfoncés près de chaque individu, avec à l'extrémité un anneau métallique portant le code d'identification ;
- étiquettes métalliques ou en plastique liées au tronc ou aux branches de l'individu ;
- petits drapeaux à côté des individus, indiquant le code.

Après avoir délimité la parcelle, la position des individus peut être signalée selon les méthodes suivantes :

1. Cartographie avec des feuilles plastiques. Une fois la parcelle délimitée, on la recouvre avec des feuilles de plastique et on dessine le contour des individus situés dessous ou on indique leur position avec un point ; les feuilles doivent avoir une certaine épaisseur (environ 0.5 mm), être transparentes et maniables (1 m²) ; chaque feuille portera un code qui identifie sa position par rapport à la parcelle entière (rangée ligne - colonne) de façon à pouvoir les repositionner exactement au même endroit pour les suivis ultérieurs. Dans le cas où un individu se trouve à la limite de différentes feuilles, on ne dessinera sur chaque feuille que la partie correspondante de l'individu, celui-ci pourra être mesuré en unissant les différentes feuilles concernées. En utilisant cette méthodologie, il n'est pas nécessaire d'étiqueter les individus ;
2. Cartographie par carrés. La parcelle est subdivisée en carrés à l'aide de cordes liées à des piquets enfoncés au sol ; chaque individu sera identifié par le numéro du carré (rangée ligne - colonne) et, à l'intérieur, sur la base des coordonnées ;
3. Cartographie avec des structures métalliques. Méthode très utile dans le cas d'individus de petite taille qui se trouvent très rapprochés les uns des autres ;
4. Cartographie avec un GPS doté d'un système de correction différentielle instantanée. Chaque individu est identifié grâce aux coordonnées ; le système est très utile dans le cas d'arbres ou d'arbustes de grande taille.

Dans les zones pastorales, il est possible que la parcelle soit modifiée par la présence des animaux ; pour cette raison, il est recommandé d'utiliser une double identification des plantes pour permettre leur localisation les années suivantes. Dans de telles circonstances il est conseillé de vernir le sommet des piquets identifiant les coins des parcelles et de les enterrer complètement ; leur position sera retrouvée en mesurant avec une roue métrique et à la boussole les distances et les orientations relatives à trois points fixes opportunément identifiés (ex. : roches, etc.).

10.4.2. Données de recueil de chaque parcelle

Dimensions des individus : Etant donné la grande variabilité spécifique, il n'existe pas de méthodologie unique. On peut cependant déterminer quelques solutions à caractère général, qui devront évidemment être évaluées au fur et à mesure du travail de relevé sur le terrain.

En général, pour les chaméphytes basses ou pour les plantes ayant une rosette basale, il peut être intéressant de mesurer la plus grande dimension et la dimension perpendiculaire à celle-ci.

Dans le cas des chaméphytes élevées et des nanophanérophytes, la mesure la plus efficace est donnée par la hauteur totale et le diamètre du tronc au niveau du sol. Pour les phanérophytes le paramètre le plus simple à mesurer est le diamètre du tronc à hauteur de poitrine (ou DBH) et si possible la plus grande hauteur. Une autre méthode simple pour estimer la dimension des plantes consiste à compter le nombre de feuilles et/ou relever leur longueur et/ou largeur.

Dans le cas de plantes annuelles, il n'est pas nécessaire d'en mesurer les dimensions puisqu'elles auront le même âge lors des analyses de périodicité annuelle.

Les stades vitaux se déterminent essentiellement en 3 stades :

- plantule: individu apparu pendant la saison en cours, identifiable par la présence des cotylédons ;
- jeune ou individu en végétation : il est dépourvu de cotylédons et sans organes reproducteurs ;
- adulte ou reproducteur : individu avec des organes reproducteurs.

Pour les espèces dont on ne connaît pas la physionomie de la plantule, cette donnée ne pourra pas être notée la première année. Pour pouvoir les identifier l'année suivante il sera nécessaire de récolter un échantillon de graines au terme de la saison de fructifications et de les semer en conditions contrôlées au laboratoire. Les années suivantes, les plantules, seront identifiées de la même manière que le reste des individus ou, si ce n'est pas possible, avec une autre méthode qui permette, de toute façon, un suivi les années suivantes. A toute plantule qui se développe chaque année, il faudra attribuer un code alphanumérique d'identification.

10.4.3. Production de fruits par plante

Pour obtenir cette donnée il est nécessaire de compter ou d'estimer le nombre total des fruits pour chaque individu de la parcelle et d'estimer le nombre moyen de graines pour chaque fruit. Les fructifications varient beaucoup en fonction des espèces et des conditions ambiantes. Au cas où l'on ne dispose pas de données bibliographiques, il est nécessaire, la première année, d'observer au moins 3 fois la population au cours de la période de floraison et de fructification.

Il est important de vérifier que les organes reproducteurs restent sur la plante jusqu'à mûrissement ou qu'il en reste une partie, ou une cicatrice, qui permette de les compter dans un deuxième temps si les floraisons/fructifications sont simultanées ou échelonnées pour l'individu et dans la population. Toutes ces données serviront à estimer la production totale de fruits, et donc de graines, dans le cas où elles n'auraient pu être comptées directement sur la plante.

Dans quelques cas il sera possible de compter directement le nombre total de fruits qu'a produit chaque plante de la parcelle. Lorsqu'il n'est pas possible d'effectuer un comptage direct, on peut avoir deux solutions :

1. Espèces à fleurs hermaphrodites et espèces monoïques : si le nombre de structures florales par plante (boutons, fleurs et/ou fruits, selon le stade phénologique) est supérieur à 100, on peut faire une estimation par la méthode suivante :
 - pour les espèces ayant une production homogène sur tout l'individu, on peut compter les fruits présents sur la moitié de la plante et multiplier la donnée par 2 ou, les compter sur un tiers et multiplier la donnée par 3 ;
 - si la production est hétérogène, c'est à dire avec une quantité variable sur diverses parties de la plante, la donnée est obtenue en multipliant le nombre total d'inflorescences par le nombre moyen de fruits par inflorescence.
2. Espèces dioïques : il faut spécifier le sexe de la plante et que pour les plantes femelles on suivra la procédure du point 1.

10.4.4. Autres données

En cas de signes évidents d'herbivorie, de parasitisme, de prédation et de formes de phytophagies diverses, il faut annoter le type de données (§. 13.5) et le quantifier en pourcentage par rapport à la plante entière ou bien avec une échelle numérique de 0 (aucune partie de la plante concernée) à 4 (75% de la plante touchée par le phénomène).

12.4.5. Autres études à mener

- Nombre moyen de semences par fruits : récolter, en dehors de la parcelle, 1 à 2 fruits sur au moins 30 individus différents et, en laboratoire, compter le nombre de semences par fruit (§. 13.8 et 13.9).
- Estimation du taux de reproduction végétative : pour les espèces qui se reproduisent de manière asexuée, identifier les individus qui naissent par voie végétative et le code alphanumérique de la plante la plus proche. Il est nécessaire, en outre, de connaître le type de multiplication végétative ; celui-ci peut être établi en détarrant quelques exemplaires hors de la parcelle et en vérifiant de quelle façon ils sont liés entre eux. Cette étude peut s'effectuer avec des plantes cultivées en serre ou du matériel provenant de collections *ex situ*.
- Banque de graines du sol : pour l'étude de la dynamique de la population des espèces annuelles il faut connaître la banque de graines viables du sol ; pour cela il est nécessaire de prélever, hors de la parcelle, au moins 50 échantillons dans les 3 premiers centimètres du sol (sur des aires d'au moins 200 cm²) et, de mettre les graines à germer en laboratoire ; on comptera les futures plantules pendant au moins de 2 mois. Si les graines sont facilement repérables, elles peuvent être comptées directement, en évitant ainsi les essais de germination en laboratoire (§. 13.11).

10.5. Analyses d'images : un outil utile pour la caractérisation des paramètres morphométriques et colorimétriques des accessions.

Le matériel végétal peut être défini par des paramètres qualitatifs tels la forme, les dimensions et la couleur. De tels paramètres sont difficiles à mesurer, il ne peut en effet s'agir que d'une estimation et non pas d'une mesure exacte et objective.

Les caractéristiques dimensionnelles sont généralement estimées manuellement, avec une grande perte de temps. La couleur est actuellement évaluée par une estime à l'oeil en la

comparant à des couleurs standard sur des tableaux photographiques de référence à partir desquels, il est possible de remonter à la valeur RVB (Rouge, Vert, Bleu) ou TLS (Tonalité, Luminosité, Saturation) correspondante (Fagundez *et* Izco, 2003). Cette méthode est subjective et non reproductible, en effet deux opérateurs peuvent attribuer des couleurs différentes au même échantillon et le même opérateur peut donner des couleurs différentes selon le moment. En outre, on ne réussit pas souvent à estimer de petites différences entre des graines distinctes à l'intérieur d'un échantillon. La forme est elle aussi estimée visuellement, et il n'est pas possible d'obtenir des valeurs objectives.

Ces limites concernant l'étude morpho-colorimétrique des graines peuvent être largement améliorées avec des mesures réelles et objectives, soit par des paramètres dimensionnels, soit par des paramètres relatifs à la forme et à la couleur. De nouvelles méthodes sont en effet aujourd'hui disponibles, non destructives et rapides, basées sur la technologie de l'analyse d'image (Venora *et* Grillo 2006 ; Venora *et al.*, 2006).

Un exemple d'application de la technologie d'analyse d'image pour la caractérisation morpho-colorimétrique des graines est relaté ci-dessous, suivi d'un classement statistique. La validité de cette application a été vérifiée sur différentes accessions de haricots (Venora *et* Grillo, *op. cit.*) et de lentilles cultivées (Venora *et al.*, *op. cit.*).

Les images de graine que l'on veut analyser sont obtenues avec un scanner finement et convenablement standardisé (fig. 50 et 51), successivement ou simultanément, les images sont élaborées avec un Macro (fig. 52-58) et expressément développée en langage KS400 (Système d'Analyse d'Image - de Zeiss), avec lequel il est possible de mesurer les paramètres suivants :

- surface ;
- périmètre ;
- diamètre maximum ;
- diamètre minimum ;
- facteur de forme ;
- facteur sphérique ;
- rapport entre diamètres.

Le facteur de forme se calcule avec la formule suivante :

$$F. \text{ forme} = \frac{4 \cdot \pi \cdot \text{Surface}}{\text{Périmètre}^2}$$

Ce facteur a des valeurs comprises entre 0 et 1, la valeur de 1 étant celle d'une parfaite homogénéité de forme.

Le facteur sphérique est donné par la formule suivante :

$$F. \text{ sphérique} = \frac{4 \cdot \text{surface}}{\pi \cdot \text{diamètre max}^2}$$

Ce facteur a des valeurs comprises entre 0 et 1, 1 étant la valeur d'une sphère parfaite.

Le rapport entre diamètres est la valeur du rapport d'aspect, (m/M), c'est-à-dire le rapport entre le diamètre minimum et le diamètre maximum, il est donné par la formule :

$$\text{Rapport diamètre} = \frac{\text{Diamètre min}}{\text{Diamètre max}}$$

Diamètre max

Egalement dans ce cas, la valeur varie de 0 à 1, 1 indiquant que les 2 diamètres sont identiques.

Dans le tableau 6 sont reportés quelques exemples de valeurs de ces trois facteurs relatifs à quatre formes géométriques différentes :

		Facteur de forme	Facteur sphérique	Rapport diamètres
r $r = x$		1	1	1
b	$a = 6$ a $b = 4$	0.67	0.67	0.67
	$L = 2$ d L $d = 2.828$	0.785	0.64	0.71
	$L = 5$ l $l = 2$ $d = 5.385$	0.16	0.44	0.37
	L			

Tableau 6 – Paramètres morphométriques. (données: G. Venora)

Concernant les paramètres colorimétriques, les valeurs RVB, et TLS (modèles de couleur) indiquent respectivement la valeur moyenne des canaux Rouge, Vert, Bleu, ainsi que les Tonalité, Luminosité et Saturation de tout l'objet en examen et sont exprimés en échelle de gris avec des valeurs qui vont 0 (noir) à 255 (blanc).

Si les graines présentent des ornements du tégument, il est possible d'en déterminer la surface moyenne, le nombre de taches par graine et leur surface en pourcentage. La surface des taches est un paramètre indiquant la superficie en mm² totale de toutes les taches d'un objet. En ce qui concerne les paramètres colorimétriques, en présence d'ornementations, on distingue la couleur du fond (couleur dominante% >50) et la couleur des taches.

Pour chaque image, les données brutes sont insérées dans un tableau de calcul et peuvent être considérées comme des caractéristiques intrinsèques des graines, ou bien utilisées pour la réalisation de classifications statistiques appropriées (Venora *et* Grillo, *op. cit.* ; Venora *et al.*, *op. cit.*).

Les séquences d'images élaborées sont ensuite rapportées, et utilisées pour effectuer les mesures morphométriques et colorimétriques des graines. A titre d'exemple, on a utilisé une image d'*Astragalus verrucosus* qui présente des graines sans ornements.

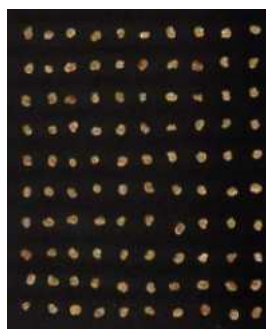


Figure 50 - Image originale. Cette image peut être obtenue à partir d'un scanner puis affinée par l'analyseur d'image. (photo: G. Venora)



Figure 51 – Image standardisée. Cette opération permet d'obtenir des résultats reproductibles pour la couleur en utilisant n'importe quel type de scanner. (photo: G. Venora)



Figure 52 - Image contrastée. Sert à délimiter avec clarté le contour des objets à mesurer. (photo: G. Venora)



Figure 53 - Image segmentée. Permet la séparation par rapport au fond, des objets à mesurer, et représente l'image caractéristique qui va permettre au système de distinguer quels sont les objets à mesurer. (photo: G. Venora)



Figure 54 – Image en TLS. Créée à partir de l'image standardisée pour convertir les couleurs de la

valeur RVB (Rouge, Vert, Bleu) à la valeur TLS (Tonalité, Luminosité, Saturation) de manière à obtenir une image sur laquelle il est possible de mesurer trois autres paramètres colorimétriques. (photo: G. Venora)

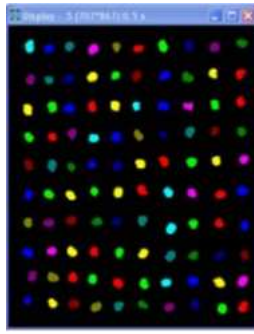


Figure 55 – Image avec les objets identifiés. Le simple but de cette image est de permettre de vérifier visuellement que tous les objets à analyser sont séparés et que deux objets ou plus ne soient pas considérés par le système comme une graine unique (objet). (photo: G. Venora)

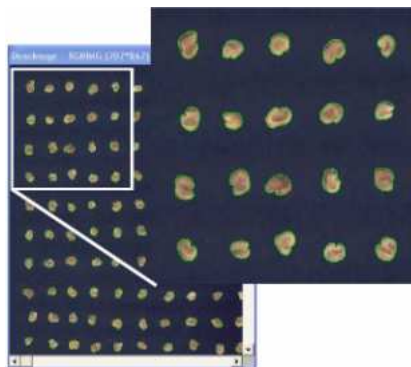


Figure 56 - Image pour la mesure des paramètres morphométriques. Elle permet la sélection interactive des objets sur lesquels on va effectuer les mesures relatives à la forme et à la dimension. (photo: G. Venora)

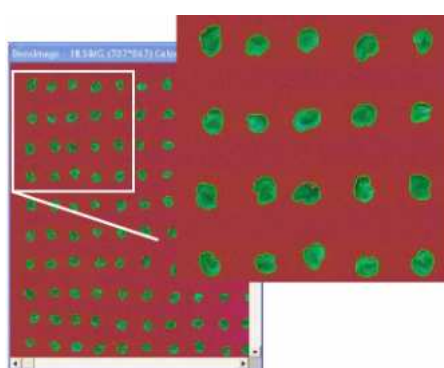


Figure 57 - Image de mesure. Elle permet la sélection interactive des objets sur lesquels on va effectuer les mesures colorimétriques. (photo: G. Venora)

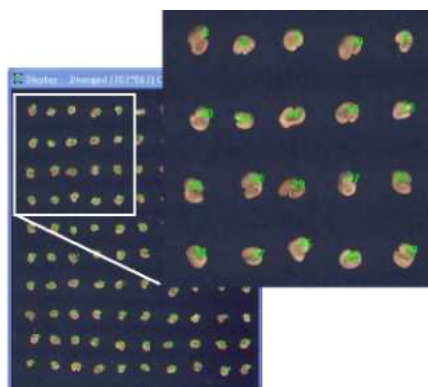


Figure 58 - Image numérisée. C'est l'image sauvegardée à la fin des analyses, avec en impression les numéros indiquant l'ordre suivi par le système dans les mesures de chaque objet. Cela permet la corrélation d'autres caractéristiques de la graine (germination - vitalité) avec celles mesurées par les analyses d'images. (photo: G. Venora)

10.6. Dispersion des diaspores: influence du vecteur et de la forme

Sur la base de la structure externe des semences ou des fruits Werker, (1997) a discerné diverses stratégies de dispersion active et/ou passive précisées ci dessous.

10.6.1. Anémochorie

Diaspores transportées par le vent et caractérisées par des graines légères et souvent dotées d'appendices qui en augmentent la superficie. Typique de nombreuses familles et en particulier des *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Orchidaceae*, *Poaceae* et des *Scrophulariaceae*. Les appendices peuvent être de diverses natures :

- poils recouvrant totalement ou en partie la surface de la graine (ex.: *Platanus*, *Nerium oleander*, etc.) ;
- poils simples ou plumeux formant une touffe ou une couronne de poils, appelé pappus (ex.: *Taraxacum*, *Crespis*, *Sonchus*, *Hieracium*) ;
- appendice plumeux (ex.: *Clematis*, *Anemone*, etc.) ;
- ailes (ex.: *Bignonia*, *Tilia*, *Fraxinus*, *Acer*, etc).

10.6.2. Hydrochorie

Beaucoup de graines et de fruits d'espèces aquatiques flottent sur l'eau et sont entraînés par le courant (ex. : *Posidonia oceanica*, *Nuphar*, etc.), des espèces non aquatiques (ex. : *Anchusa formosa*, *Pancratium maritimum*) peuvent également être transportées par l'eau lors de phénomènes météorologiques, crues de cours d'eau ou marées et même se disperser à des distances considérables.

10.6.3. Autochorie

L'autochorie est un type de dispersion des diaspores assuré par la plante elle-même. La méthode passive de dispersion par laquelle les fruits ou les graines tombent à proximité de la plante mère et qui par gravité sont entraînés vers le bas est appelée barochorie. Les graines ainsi dispersées peuvent, par la suite, être mangées par des animaux qui en assurent ainsi la dispersion (diplochorie). Les graines des espèces géochores ne dispersent pas, leurs fruits sont enterrés, assurant de cette manière leur conservation sur place [ex. : *Morisia monanthos* (Viv.) Ascherson, *Arachis hypogaea* L., *Trifolium subterraneum* L.]. La maturation de quelques fruits secs s'accompagne d'un véritable lancement (balistochorie) de leurs graines (ex. : *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Acanthus mollis* L., *Cardamine*, *Geranium*, etc.). Chez *Hura crepitans* L. le fruit explose en 18 morceaux avec une telle violence que les graines, de 1 cm d'épaisseur, sont projetées jusqu'à 25 m. Chez *Mercurialis annua* L. les graines sont aussi lancées à une distance moyenne de 15 cm (Lisci et Pacini, 1997). Le rayon de dissémination des graines par ce mécanisme est beaucoup plus limité que celui assuré par la dispersion par le vent, l'eau ou les animaux.

10.6.4. Zoochorie

La zoochorie est la dissémination effectuée par des animaux et dans laquelle ils jouent un rôle actif (principalement à travers l'endozoochorie) ou passif (épizoochorie). Dans le cas de l'endozoochorie, les graines sont toujours contenues à l'intérieur de fruits ou de pseudofruits charnus, consommés par un animal frugivore (ex. : *Ficus carica* L., *Fragaria vesca* L., *Pyrus*, *Malus*, *Phoenix*, etc.) .Expulsées avec les fèces, les graines gement facilement, puisque leurs téguments ont été attaqués par les acides gastriques au cours du transit dans l'appareil digestif de l'animal. L'épizoochorie concerne toutes les graines sèches munies d'un système d'ancrage macro ou microscopique, poils, soies et crochets permettant une fixation aux poils ou aux plumes de l'animal (ex. : *Xanthium*

strumarium L., *Agrostemma githago* L., etc.). En outre, et plus simplement, les animaux transportent aussi des graines avec la terre collée à leurs pattes.

Les fourmis ne réalisant ni endozoochorie ni épizoochorie proprement dites méritent un paragraphe à part. On constate que ces hyménoptères transportent, entre leurs mandibules, un grand nombre de graines, en particulier celles pourvues d'appendices riches en huiles dont elles se nourrissent (ex. : *Euphorbia*). Ce type de dispersion des diaspores est nommé myrmécochorie.

10.6.7. Elaiosome et dispersion des semences des plantes méditerranéennes

Dispersion

Sur les graines de quelques fruits secs se trouve un appendice, non impliqué dans la germination, dont la fonction principale est d'attirer les animaux disperseurs, principalement les fourmis, plus rarement les oiseaux (Lisci *et al.*, 1996). Cet appendice appelé "élaiosome" par Sernarder (1906) parce qu'il contient des lipides, est aussi nommé caroncule, strophiole, etc. Toutefois, indépendamment du nom et des origines anatomiques, sa fonction est principalement écologique en favorisant la dispersion de la graine par des fourmis qui trouvent dans l'élaiosome une récompense comestible (Lisci *et al.*, *op. cit.*).

Les élaiosomes sont comme des capuchons à une extrémité de la graine, toujours de couleur claire contrastant avec le reste de la graine habituellement sombre, marron ou noire. Ils sont constitués de cellules mortes dont le cytoplasme s'est transformé en réserves lipidiques. Les élaiosomes sont tendres et facilement amovibles, soit par les fourmis soit, expérimentalement, par l'homme.

Les réserves des élaiosomes sont généralement constituées de lipides, dans quelques cas particuliers ils contiennent aussi des protéines, comme chez *Cirsium arvense* (L.) Scop., *Cytisus scoparius*, *Euphorbia cyparissias* L., *Centaurea parlatoris* Heldr. ; ou bien de l'amidon comme chez *Euphorbia lathyris* L., *Lamium purpureum* L. et *Tussilago farfara* L. Chez *Centaurea jacea* L. la récompense pour les disperseurs étant seulement composée de protéines cet appendice ne devrait pas s'appeler élaiosome (Lisci *et al.*, *op. cit.* ; Viegi *et al.*, 2003).

Lorsque le contenu calorique de la graine entière et de l'élaiosome a été mesuré, on a remarqué que ce dernier contient toujours environ le tiers de l'énergie de la graine, indépendamment du groupe systématique (Lisci *et al.*, *op. cit.*).

Parmi les fruits secs à élaiosomes du milieu méditerranéen il faut retenir les espèces des genres *Euphorbia*, *Viola*, *Chelidonium*, *Corydalis*, *Melampyrum*, *Trillium*, *Vulpia* (Beattie *et Lyons*, 1975 ; Aronne *et Wilcock*, 1994 ; Lisci *et al.*, *op. cit.*). Les élaiosomes se trouvent aussi dans les akènes d'*Asteraceae* tel *Sylibum marianum* (L.) Gaertn., dans certaines espèces du genre *Centaurea* et également sur des graines de fruits chamus (ex. : *Rhamnus alaternus* L.).

Les élaiosomes peuvent être une constante pour un groupe systématique déterminé, comme par exemple les *Euphorbiaceae*, ou bien être présents sporadiquement à l'intérieur d'un genre ayant un nombre élevé d'espèces comme *Centaurea* (Viegi *et al.*, *op. cit.*).

Fonctions de l'élaiosome

Indépendamment de la dispersion, qui est leur fonction principale, les élaiosomes peuvent indirectement acquiescer une ou plusieurs des fonctions suivantes :

- Ils permettent d'éviter la prédation d'autres animaux puisque les fourmis font

disparaître du sol les graines tout juste dispersées de la plante mère ;

- les graines déposées dans la fourmière sont protégées du feu et des hautes températures ;
- la compétition intraspécifique est évitée parce que les graines sont éloignées de la plante qui les a produites ;
- les parois des cellules d'élaiosomes peuvent être épaisses et contenir des pectines, molécules réussissant à absorber et à retenir l'eau utile au début du processus de germination (Bianchini *et Pacini*, 1996) ;
- grâce à ces parois épaisses, les élaiosomes peuvent être impliqués dans la déshydratation de la graine avant la dispersion, ou dans la réhydratation qui précède la germination (Lisci *et al.*, *op. cit.* ; Bianchini *et Pacini*, *op. cit.*) ;
- ils déterminent la dormance de la graine, comme cela se produit chez *Mercurialis annua*, *Euphorbia cyparissias* et *Calendula arvensis* L. où la graine ne germe que lorsque l'élaiosome vient naturellement ou expérimentalement à être ôté (Pacini 1990 ; Lisci *et al.*, *op. cit.*).

Elaiosomes et diplochorie

Les graines ayant des élaiosomes sont souvent diplochores. Leur dispersion se produit en deux temps. Aronne *et Wilcock* (1994) ont mis en évidence que les fruits chamus de *Rhamnus alaternus* sont d'abord dispersés par les oiseaux, puis, après défécation, par les fourmis, grâce aux élaiosomes qui n'ont pas été endommagés par la digestion.

Pacini (1990) et Lisci *et Pacini* (1997) montrent que chez *Mercurialis annua* les graines, d'abord lancées grâce à un mécanisme de catapulte des parois du fruit à des distances d'environ de 130 centimètres, sont ensuite ramassées par les fourmis qui les éloignent généralement dans un rayon de six mètres, rarement au-delà (Lisci *et Pacini*, *op. cit.*).

Viegi *et al.* (2003) montrent par contre que dans le genre *Centaurea*, les akènes ont ou n'ont pas, selon les espèces, d'élaiosomes et de pappus. Lorsque le pappus et l'élaiosome sont présents, les poils du pappus, peuvent avoir selon l'espèce, des longueurs différentes qui permettent une dispersion à des distances différentes. De toute façon la dispersion par le vent précède toujours celle effectuée par les fourmis. Les espèces n'ayant que l'élaiosome ou le pappus n'auront qu'un seul type de dispersion. Les mêmes auteurs ont remarqué que la présence - absence des élaiosomes n'est pas liée à la systématique du genre, et réaffirme que ces structures ont plus une signification écologique pour l'espèce que systématique et évolutive.

Les distances auxquelles les fourmis peuvent disperser les graines dépendent de l'espèce ; Il existe chez ces hyménoptères qualifiés de sociaux, différents types et différents niveaux de sociabilité. Certaines fourmis appartenant à des espèces ayant un faible niveau d'organisation mangent l'élaiosome dès qu'elles trouvent la graine, l'éloignant peu du lieu où elle a été ramassée. D'autres fourmis, avec un niveau de sociabilité supérieur, transportent la graine dans le nid, dans ce cas l'élaiosome est ôté de la graine qui est jetée hors du nid, dans le tas de déchets. Il y a enfin le cas de *Messor structor*, une espèce méditerranéenne qui vit en milieux anthropisés et qui une fois les graines portées dans le nid, ôte les élaiosomes et dépose les graines dans de petites cellules différentes selon l'espèce. On a supposé que ce mécanisme de "conservation systématique" sert pour consommer l'intérieur de la graine, pleine de réserves, dès l'assouplissement du tégument dur par l'action de bactéries et de champignons (Pacini, 1990). La plupart des graines échappent cependant à cette "séquestration" grâce aux pratiques agricoles de bêchage et labourage.

En conclusion on peut dire que les graines ayant des élaiosomes sont toutes orthodoxes, (Baskin *et Baskin*, 1998) donc dispersées avec une faible teneur en eau et un métabolisme ralenti. Les élaiosomes assurent la dispersion mais celle-ci peut durer

un certain temps, voire longtemps, la présence des élaïosomes n'est donc pas compatible avec les graines récalcitrantes qui sont de conservation difficile.

10.7. Banque de semences du sol

Ecologistes et biologistes s'accordent désormais sur le rôle important des banques de graines dans le maintien de la biodiversité écologique (au niveau de l'espèce) et de la génétique dans les populations et les communautés végétales (Gross, 1990). L'étude de la banque de graines du sol, qui met en évidence la capacité des plantes à créer des stocks de graines viables enterrées, aide à mieux définir l'autoécologie de l'espèce, à estimer la capacité de résilience des communautés, à approfondir l'étude des dynamiques végétales et à obtenir des informations d'aide à la programmation d'activités de gestion (Cerabolini *et al.*, 2003).

La formation de banques de graines dans le sol est une stratégie fréquente chez les plantes qui végètent dans des milieux sujets à un dérangement, aussi bien naturel qu'anthropique. Ces sols contiennent généralement plus de graines d'espèces annuelles que pérennes ; plus de graines d'herbacées à feuille large (annuelles et pérennes), que de graminées, beaucoup de graines de légumineuses et de nombreuses graines de plantes envahissantes, spécialisées dans la colonisation de sites perturbés (Miller, 2000). Sur la base de la durée de vie des graines dans la banque, on distingue :

- les banques transitoires : les graines restent viables dans le sol pendant environ un an ;
- les banques persistantes : les graines restent viables plus longtemps.

Ce sont ces dernières qui contribuent le plus à la régénération des cénotes végétales détruites ou dégradées (Thompson, 1993).

De nombreuses espèces australiennes et sud-africaines, adaptées au feu, ainsi que quelques conifères méditerranéens, forment des banques de graines dans des fruits ligneux qui s'ouvrent après les incendies.

La typologie des plantes qui constituent des banques de graines dans les zones nord-américaines, normalement sujettes à des incendies, est illustrée dans le schéma suivant (tab. 7) :

Groupe d'espèce	Banque transitoire	Banque persistante		
		dans le sol	dans les fruits	la germination est stimulée par le feu
Conifères (arbres)	X		X	
Latifoliés toujours verts (arbres)	X			
Caducifoliés (arbres)	X			
Arbustes	X	X		X
Herbacées à feuilles larges, de dimension moyenne à grande, (annuelles)	X	X		X
Herbacées à feuilles larges, de dimension moyenne à grande, (pérennes)	X	X		X
Graminées	X			

Tableau 7 – Type de banque de semences du sol (Miller, 2000).

La procédure pour l'étude de la banque de graines du sol consiste d'abord à prélever des échantillons de sol, de les placer dans des sachets en plastique et d'enregistrer les informations utiles à la reconnaissance des graines présentes. On procède ensuite, en laboratoire, à la reconnaissance minutieuse des graines contenues dans l'échantillon. Ces graines peuvent être identifiées et comptabilisées, soit après qu'elles aient été

extraites de la terre qui les contient (manuellement ou mécaniquement), soit en favorisant leur germination dans les échantillons de sol que l'on aura installés en milieux contrôlés. Cette méthode de germination prévoit que les échantillons, après avoir été débarrassés des restes végétaux (branches, feuilles, etc.) petits organismes et petits cailloux présent, soient répartis (1 cm d'épaisseur sur des plateaux de verre (Roberts, 1981). Ils seront arrosés, et les plantules contrôlées au fur et à mesure qu'elles germeront.

Les échantillons peuvent être mis en alternance en chambre de germination ; cette option pourrait ne pas convenir à la germination de graines dormantes qui ont besoin de prétraitements spécifiques. Cette solution n'est donc utilisable que dans le cas où le protocole de germination de l'unité taxonomique étudiée est bien connu.

La difficulté d'application de ces méthodologies a amené à définir une méthode plus rapide et efficace qui permet de prévoir la persistance des graines dans le sol en se basant sur les informations morphométriques de la graine étudiée, principalement la forme et les dimensions (Thompson *et al.*, 1993). On a observé que les graines persistantes sont généralement petites et de forme arrondies, alors que celles qui ne persistent pas sont grosses, aplaties ou allongées. Les dimensions et la forme sont, en effet, les paramètres qui influencent la capacité d'enfouissement de la graine dans le sol. Les graines enterrées ont des taux de prédation plus bas que celles qui restent à la surface du terrain (Hulme, 1994), et les prédateurs sont considérées comme le facteur principal qui détermine la durée de la persistance de la graine dans le sol (Hulme, 1998). Ce n'est que récemment, que l'étude de la banque de graines du sol dans les analyses démographiques des populations a été prise en considération ; probablement parce que les données des banques du sol (graines viables et taux de germination) sont très souvent difficiles à confronter aux données relatives aux plantules et aux plantes adultes.

Les caractéristiques des banques de graines du sol se révèlent déterminantes dans la structure, la dynamique et la distribution spatio-temporelle des cénozes végétales en général de type méditerranéen en particulier (Parker *et al.*, 1989 ; Ortega *et al.*, 1997 ; Peco *et al.*, 1998). Les variations des dynamiques des banques de graines du sol se répercutent dans la composition, la distribution et la dominance des espèces (Parker *et Kelly*, 1989). Toutefois, une corrélation directe entre la végétation et la banque de graines du sol n'est pas toujours évidente (Thompson, 1986 ; Leck, 1989 ; Rice, 1989) parce que certaines espèces se reproduisent soit par graine, soit par agamie.

11. GLOSSAIRE

Pour l'élaboration des définitions de ce glossaire, les oeuvres de référence suivantes ont été principalement consultées : Arrigoni, 1974; Begon *et al.*, 1989; Canullo *et Falińska*, 2003; Cappelletti, 1975; Cervelli, 2005; Font Quer, 1993; Gerola F.G., 1997; Gerola F.M., 1995; Hartmann *et Kester*, 1990; Mabberley, 1997; Mauseth, 1997; Mezzalana *et Piotta*, *op.cit.*; Musmarra, *op. cit.*; Pacini, 1981; Pignatti, 1995; Piotta *et al.*, 2005; Pupillo *et al.*, 2003; Raven *et al.*, 2002; Ray Peter *et al.*, 1985; Strasburger, 1995; Tonzig *et Marrè*, 1971.

Abscission

Procédé de détachement qui se produit sur des zones particulières de la plante, dites zones d'abscission et qui provoque la chute de feuilles, fleurs et fruits.

Accession

Echantillon d'une variété de plante, collecté dans un lieu et à un moment donné ; peut être de taille quelconque. Cet échantillon ou lot est placé en banque de graines.

Agamique

Type de reproduction asexuée, sans la fusion des gamètes. Les organismes produits, présentent un bagage génétique identique au parent maternel.

Agamospermie

Processus apomictique par lequel des semences se forment sans fusion des gamètes.

Aire

Distribution géographique générale d'une espèce. Elle peut être unitaire ou disjointe par l'effet de facteurs biologiques intrinsèques à l'espèce, géographiques, écologiques et historiques.

Aire homogène

Lieu uniforme d'un point de vue climatique et écologique à l'intérieur duquel la récolte d'échantillon s'effectue.

Akène

Fruit sec, indéhiscent, issu d'un carpelle unique et libre, ne renfermant qu'une seule graine non soudée au péricarpe de ce fruit particulier. (Composée)

Albumen

Tissu nourricier situé dans la graine des angiospermes et provenant d'une caryogamie entre un des deux noyaux spermatiques et le ou les noyaux centraux du sac embryonnaire. Quand ses réserves sont consommées en totalité par l'embryon pendant la maturation de la graine, celle-ci est dite exalbuminée. Au contraire, si l'albumen reste présent la maturation une fois terminée, et n'est exploitée par l'embryon qu'au moment de la germination, la graine est qualifiée d'albuminée.

Albuminée

Voir Albumen.

Allélopathie

Influence négative de produits du métabolisme de certaines plantes sur d'autres, qu'elles soient en contact ou non.

Allochtone

Taxon présent dans un territoire donné bien qu'il n'en soit pas originaire.

Allogamie

Pollinisation croisée, par des gamètes appartenant à des fleurs ou à des individus différents.

Amphimixie

Reproduction sexuée par fusion des noyaux de deux gamètes.

Analyse d'image

Procédé qui permet électroniquement, à l'aide de logiciels spécifiques, d'analyser et de mesurer une image.

Androcée

Appareil reproducteur mâle de la fleur des Angiospermes, constitué d'une ou plusieurs étamines.

Anémochorie

Procédé de dispersion de fruits, graines ou spores par le vent. C'est un des mécanismes de dissémination le plus répandu chez les végétaux supérieurs.

Angiosperme

Division des Spermatophytes qui regroupe des plantes avec un ovaire renfermant un ou des ovules.

Anthère

Partie terminale fertile d'une étamine, constituée d'une ou plusieurs loges, chacune scindée à son tour en deux sacs polliniques.

Aphylle

Absence totale de feuilles. La photosynthèse s'accomplit à travers les jeunes rameaux encore verts. Caractéristique de nombreuses espèces de Légumineuses, d'arbre et d'arbuste typiques de la végétation méditerranéenne (ex. : *Genista* sp. pl.) et d'une grande partie des espèces présentes dans les zones tropicales désertiques (ex. : Cactacées).

Apocarpique

Gynécée avec des carpelles non soudés entre eux.

Apomixie

Développement de l'ovule sans intervention de la fécondation.

Arille

Involucre charnu, d'origine tégumentaire, émanant de la région du hile de l'ovule et enveloppant au moins partiellement la graine de certains spermaphytes.

Association

Unité fondamentale de la phytosociologie, c'est un concept abstrait des communautés végétales qui présentent des caractères équivalents au niveau floristique, statistique, écologique, dynamique, chorologique, syngénétique.

Autochorie

Dissémination d'une plante par ses propres moyens. Il est synonyme d'autodissémination.

Autochtone

Taxon, ou population considéré comme originaire du territoire biogéographique où il se trouve. Contraire d'allochtone.

Autodissémination

Voir Autochorie.

Autopollinisation

Fécondation directe d'une fleur par son propre pollen, ou celui d'une autre fleur du même individu.

Autotrophe

Organisme capable de synthétiser toute sa matière organique à partir de sources exclusivement minérales.

Baie

Fruit indéhiscent, totalement charnu, sans distinction entre le mésocarpe et l'endocarpe. Provient d'un ovaire supère.

Balistochorie

C'est la dissémination opérée par la plante elle-même (autodissémination) par l'expulsion ou le lancement des graines à distance.

Banque de gènes

Etablissement destiné à la conservation *ex situ* d'individus (graines), de tissus ou de cellules reproductrices de végétaux ou d'animaux.

Banque de germoplasme

Structures dans lesquelles sont conservées divers types d'accessions vivantes, végétales ou animales. De telles accessions peuvent être constituées de gènes, de graines, de spores, de pollens, de tissus vivants ou de parties de végétaux tels bulbes, bulbilles rhizomes, tubercules, rameaux, etc.

Banque de graines

Installation conçue pour la conservation *ex situ* de variété de plantes par le stockage des graines.

Banque de semences du sol

Persistance dans le sol d'un lieu donné de diaspores (semences ou spores) permettant la régénération naturelle d'espèces végétales lorsque les conditions naturelles deviennent favorables.

Biloculaire

Structure constituée de deux loges.

Biocénose

Cénose constituée d'espèces animales ou végétales caractéristique d'un territoire déterminé en équilibre avec le milieu.

Bioclimat

Représente l'unité de base dans le classement bioclimatique de la terre. Il s'agit d'un espace biophysique délimité des types déterminés de végétation en relation avec les valeurs climatiques correspondantes. Actuellement on connaît 27 types de bioclimats.

Biodiversité

Le concept biodiversité ou "diversité biologique" a été introduit par W.G. Rosen en 1988 (FRANKEL et al., 1995), il comprend l'ensemble et la variabilité de tous les organismes vivants de chaque origine et la nature qu'on trouve sur la biosphère. Le terme indique donc la variété des éléments d'un ensemble et pour cette raison, le nombre des éléments et leurs rapports quantitatifs sont d'une importance fondamentale (FERRARI, 2001). Plusieurs auteurs parmi lesquels LOVEJOY et al. (1984), GOMEZ-POMPA (1987), PRIMACK (1992) et WILSON (1992) ont commencé à parler de biodiversité à partir de la seconde moitié des années '80, sans cependant définir exactement sa signification. Ce fut NORSE (1993) qui donna la première définition formelle et qui distingua les deux concepts de "diversité génétique" et de "diversité écologique", ensuite, HEYWOOD (1995) différencia un troisième niveau dit de la "diversité des organismes" et considéra la "diversité culturelle" comme le résultat de l'interaction anthropique avec les trois niveaux précédents. Les trois niveaux de diversité sont considérés de manière équivalente par la Convention Internationale sur la Diversité Biologique (CBD).

Biologie de la conservation

Science qui vise à élaborer, faces aux crises environnementales, les principes d'une gestion conservatoire de la biodiversité dans les espaces naturels ou semi-naturels, en appuyant de telles pratiques sur les savoirs théoriques et expérimentaux de la biologie, de l'écologie et de la biogéographie, tout en tenant compte des savoirs et des pratiques des communautés locales concernées.

Boîte de Pétri

Récipient de verre plan, muni de couvercle, généralement employé pour la culture de microbes ou pour la germination (des graines, des pollens).

Bractée

Feuille transformée et souvent réduite, adaptée à des fonctions particulières (ex. fonction de protection, de réserve, de signalisation, etc.).

Bulbe

Organe souterrain situé entre l'appareil aérien (tiges et feuilles) et les racines, formé d'écailles charnues et

servant de réserves pour la croissance l'année suivante.

Bulbille

Petit bulbe aérien, servant à la reproduction végétative.

Butineur

Insecte qui se nourrit de nectar, pollen (ex. fourmis, abeilles ouvrières)

Caduc

Plante qui saisonnièrement perd les feuilles.

Caducifolié

Plantes arborescentes et arbustives qui perdent les feuilles au début des saisons défavorables (froide ou sèche).

Capacité germinative

Pourcentage de semences capables de germer dans des conditions bien définies correspondant à la germination maximale d'un lot appelée aussi faculté germinative.

Capitule

Type d'inflorescences au niveau duquel de petites fleurs sessiles sont insérées les unes à côté des autres sur un réceptacle élargi porté par la tige fleurie. (Astéracées).

Capsule

Fruit sec déhiscent bi ou pluricarpellé.

Caroncule

Petit corps charnu, de forme et de grosseurs variables situées autour du hile de certaines graines, notamment chez les Euphorbiacées (Jatropha, Ricin), spécialisé pour la dispersion entomochore.

Carpelle

Feuille transformée à des fins reproductives et portant les ovules.

Caryologie

Une partie de la cytologie qui étudie le noyau des cellules, en particulier les chromosomes.

Caryopse

Fruit sec indéhiscent, issu d'un carpelle unique et libre, renfermant une graine unique soudée au péricarpe. (Graminée)

Cataphylle

Feuille métamorphosée, sessile, privée de chlorophylle, de consistance charnue ou parcheminée qui a des fonctions de protections et de réserve.

Cépée

Défini soit une plante jeune vigoureuse, soit des branches terminales et peu ramifiées, munies de bourgeons apicaux et en mesure de régénération végétative.

Chambre de culture

Incubateur utilisé pour des études relatives à la biologie de la reproduction et en particulier de la germination, qui permet d'établir des valeurs différentes de thermopériodes et de photopériodes. Certaines chambres de culture ont en outre la possibilité de gérer l'humidité interne.

Chilling

Voir Stratification froide.

Cléistogamie

Faculté pour une fleur de produire des graines fertiles sans s'épanouir.

Climax

Type de végétation qui correspond à un état d'équilibre stable entre les différents éléments du complexe 'climat-sol-flore-faune' résultant d'une évolution dynamique en un lieu et en un temps donnés.

Clone

Population constituée par les produits de régénération végétative d'un individu unique servant de pied-mère.

Cohérence

Degré de cohésion du substrat pédologique et en particulier des horizons plus superficiels.

Hampe florale (scape florale)

Axes florifères allongés, feuillés ou non, qui sont directement séparées d'une structure végétative de réserve partant directement d'une structure végétative épigée de réserve (comme chez beaucoup de Liliacées) ou de racines (thérophytes) et se portent dans l'apex d'une fleur ou d'une inflorescence.

Collection à long terme

Ensemble de lots (accessions) contenus dans une banque destinés à la conservation à long terme au moyen de la cryoconservation, de la congélation ou de la lyophilisation.

Collection active

Ensemble de lots contenus dans une banque destinés à l'utilisation à brève échéance et stockés à des températures comprises entre 0-5°C.

Colorimétrie

Mesure quantitative de la couleur. Secteur de la physique qui a comme objet la détermination de grandeurs relatives à la couleur et de leur mesure univoque. Il se base sur la possibilité de réussir à reproduire, avec un mélange opportun de trois couleurs dites primaires (RGB), n'importe quelle sensation de couleur. Les paramètres qui caractérisent la couleur sont la chromatidité (teinte et pureté) et la brillance.

Commensalisme

Association entre deux espèces qui produit des bénéfices pour une espèce (commensale) pendant que la deuxième n'est pas influencée ni positivement ni négativement.

Compétition

En botanique, représente le complexe des actions réciproques entre les plantes d'un territoire donné (ex. : soustraction de lumière, d'eau, d'aliments). En écologie, constitue la manifestation d'antagonisme entre des individus ou des populations du même niveau trophique (peut être intra ou interspécifique).

Congélation

Stockage à températures généralement comprises entre -18°C et -25°C.

Conservation ex situ

Ensemble des stratégies adoptées au fin de la conservation de la diversité génétique et des organismes, réalisées en dehors des milieux naturels dans lesquels ceux-ci se trouvent. La conservation à long terme du matériel végétal, la multiplication sont des techniques de conservation *ex situ*.

Gestion d'éléments vivants de la biodiversité en dehors de leur habitat d'origine ou de leur environnement naturel.

Conservation in situ

Stratégies aptes à favoriser le rétablissement ou la sauvegarde en nature de la diversité génétique, des organismes et des écosystèmes. La gestion d'un habitat, des espèces ou de la population d'une seule entité taxonomique, sont des formes de conservation *in situ*. Les réintroductions d'une espèce ou le rétablissement d'un habitat sont considérées comme des techniques *in situ*.

Conservation de la biodiversité dans la dynamique évolutive des écosystèmes de l'habitat d'origine ou du milieu naturel.

Convergence écologique

Cas dans lequel, en devant s'adapter aux mêmes conditions de vie, les espèces animales et végétales non semblables, qui occupent la même niche écologique d'habitats semblables, développent des formes et des comportements semblables.

Cotylédon

Lobe charnu ou foliacé qui s'insère sur l'axe de la plantule, dans la graine. Les plantes à fleurs

(angiospermes) sont classées en deux sous-classes selon que la graine porte un ou deux cotylédons. Les gymnospermes ont plus de deux cotylédons. Ils ont des fonctions de réserves.

Cryoconservation

Conservation d'un quelconque matériel biologique, réalisé à des températures très en dessous du point de congélation et habituellement à la température de l'azote liquide (-196°C) ou de ses vapeurs (-150° C).

Cryovials

Contenant généralement en polypropylène adapté pour la cryoconservation du matériel biologique dans l'azote liquide à -196°C.

Cryptogame

Terme sans valeur taxonomique, qui indique les plantes dépourvues d'organes voyants liés à sa sexualité, c'est-à-dire dépourvues de fleurs et, qui se reproduisent au moyen de spores (ex. : Ptéridophyte et Bryophyte).

Cultivar

Ensemble de plantes cultivées présentant une variété d'intérêt agronomique et se distinguent par quelques caractères communs (forme, fonction organique, chimique) et, lorsqu'ils sont reproduits par voie sexuée, ils conservent leurs caractéristiques distinctives.

Cycle végétatif

Ensemble des phases de développement d'un végétal, il peut comprendre une période de latence ou de dormance.

Cyclophysis

Représente le procédé complexe de mûrissement, ontogénétique et physiologique, des sommets méristématiques.

Déhiscent

Se dit d'un fruit qui s'ouvre spontanément en libérant ses graines quand il est mûr.

Délai de germination

Temps nécessaire à la germination de semences placées dans des conditions favorables de germination.

Démographie

Etude des caractères principalement statistique des phénomènes concernant la population dans ses aspects statique et dynamique.

Densité de population

Nombre d'individu par unité de surface.

Désailer

Élimination des ailes pendant le nettoyage de la graine ; structures faisant partie de quelques types de graines (ex. : *Cedrus*, *Pinus*, *Abies*).

Déshydratation

Procédé d'élimination progressive, partielle ou totale, de l'eau contenue dans un organe ou une structure.

Dessèchement

Perte de liquides dans un organisme ou d'une de ses parties.

Desséchant artificiel

Produits capable d'adsorber l'eau disponible dans un milieu et/ou contenant comme par exemple le gel de silice.

Dessiccation

Procédé, de durée variable, qui peut se produire de manière naturelle ou artificielle à travers des équipements tels les étuves ou les fours. Sont soumis à une dessiccation les parts d'herbier (*exsiccata*), mais aussi les plantes médicinales.

Diaspore

Partie de l'appareil végétatif ou de l'appareil reproducteur, unité de dissémination naturelle susceptible

d'engendrer un nouvel individu (propagule, bulbille, spore, fruit, graine,...).

Diclina

Fleur caractérisée de la seule présence de l'androcée ou du gynécée, par conséquent unisexuée.

Dicotylédone

Terme générique pour indiquer quelconque membre de la classe des *Magnoliopsida* qui fait partie du phylum des *Magnoliophyta*. Il s'agit d'unités taxonomiques caractérisées par un embryon avec deux cotylédons, de feuilles avec des nervures réticulées, les fleurs présentent une symétrie d'ordre 4 ou 5, la fleur typique présente 4 verticilles, au niveau des tiges, la présence de cambium permettant la formation de bois secondaire vers l'intérieur et de liber vers l'extérieur.

Différenciation

Transformation d'une cellule embryonnaire en cellule spécialisée.

Dioïque

Se dit d'une espèce dont les spécimens ne comportent que des fleurs mâles ou femelles sur la même plante.

Diplochorie

Procédé de dissémination qui se réalise en deux phases distinctes à travers plusieurs vecteurs.

Diploïde

Individu avec un bagage chromosomique double (2n).

Dispersion

Le transfert ou le mouvement d'une aire à l'autre de graines, fruits ou autres propagules. Il représente le procédé au moyen duquel une espèce colonise un nouvel habitat.

Dissémination

Dispersion naturelle de la graine et, en général, de fruits, spores ou autres organes préposés à la multiplication sexuée.

Dormance

Activité ralentie d'un organe. État physiologique, dû à des causes physiques et/ou physiologiques intrinsèques, qui empêche la germination, même dans des conditions ambiantes favorables. C'est une caractéristique contrôlée génétiquement ou physiologiquement qui interagit de diverse manière avec les facteurs ambiants.

Drainage

Degré de perméabilité du substrat pédologique et/ou lithologique.

Drupe

Fruit charnu mono ou pluricarpellé avec un endocarpe ligneux (noyaux) contenant la graine et le mésocarpe charnu.

Duplication des collections

Réplique des collections auprès de différentes structures de la même institution ou auprès de structures d'institutions différentes, au fin d'assurer une concrète conservation *ex situ* des accessions même en cas de graves dommages ou d'incidents auprès des structures d'origine.

Echantillon

Partie d'une population qui représente adéquatement les caractéristiques de la population elle-même. Par exemple, un échantillon de graines, représentatif de tout le lot de graines dont on veut déterminer les caractéristiques.

Echantillonnage

Techniques utilisées sur le terrain et/ou laboratoire pour la détermination, la récolte, les analyses et la détermination d'un échantillon.

Ecosystème

Ensemble de plusieurs habitats présent dans un territoire géographique limité et défini, dans lequel se vérifie des conditions semblables : morphologique, lithostratigraphique, pédologique, bioclimatique et

biotique.

Ecotone

Zone de passage entre des cénozes (ex. : la lisière d'une forêt est le passage d'une cénoze au début d'une cénoze ouverte de type généralement herbacé).

Ecotype

Population végétale ou animale qui se caractérise par une adaptation à des conditions écologiques particulières ; pour les végétaux essentiellement de type pédodimatique.

Elaiosome

Dans les graines de certains fruits secs se trouve un appendice non impliquée dans la germination, sa fonction principale est d'attirer les animaux (généralement fourmis, oiseaux) qui trouvent une récompense comestible et entretemps pourvoient à la dissémination (Lisci et al. 1996). Cet appendice a été appelée "elaiosoma" de Semarder (1906) parce qu'il contient des lipides, mais aussi caroncule, strophiole, etc.

Embryon

Organisme en voie de développement. Chez les phanérogames, le terme d'embryon désigne les stades qui aboutissent à la formation de la plantule.

Endémique

Groupe taxonomique (forme, variété, espèce, genre etc.) qui se rencontre dans une région très limitée, et uniquement dans cette région.

Endosperme primaire

Tissu de réserve haploïde contenu dans la graine des Gymnospermes, qui se développe par la prolifération du gamétophyte femelle après la fécondation.

Endosperme secondaire

Tissu de réserve normalement triploïde contenu dans la graine des Angiospermes, qui est généré suite au procédé de la double fécondation.

Endozoochorie

Procédé de dissémination réalisé par les animaux qui prévoient l'ingestion des diaspores et de son expulsion avec les fèces.

Enfumage

Prétraitement qui prévoit l'exposition à une fumée ou l'emploi de solutions aqueuses de substances qui se dégagent pendant les incendies pour interrompre la dormance des graines de quelques taxa spontanées des zones sujettes à des incendies (ex. : quelques *Ericaceae*)

Enrobage

Travail qui consiste à revêtir la graine avec des substances inertes, parfois imprégnées de pesticides et de colles hydrosolubles jusqu'à obtenir un produit qui a généralement l'air d'une pilule. Celle-ci se délite ou se brise au contact de l'eau, en libérant la graine.

Entomophilie

Pollinisation effectuée par des insectes

Epicarpe

Partie la plus superficielle du péricarpe du fruit.

Epicotyle

Partie de l'axe embryonnaire ou de la plantule placée entre les cotylédons et la première feuille, destinée à former la tige.

Epiderme

Tissu tégumentaire qui revêt les parties ou les organes jeunes, donc primaires, d'une plante.

Epiphyte

Végétaux autotrophes qui vivent sur des plantes de grandes dimensions en les utilisant comme support ou soutien. (ex. : *Smilax aspera* L.). Généralement, ils n'apportent pas de dommages visibles à l'hôte.

Epizoochorie

Dissémination zoochore de graines et spores qui s'attachent extérieurement au corps d'animaux.

Estivation

Synonyme de stratification chaude (voir Stratification et Stratification chaude de la graine) et de warming.

Etamine

Structure reproductive mâle de la fleur des Angiospermes, composée de l'anthere, contenant le pollen, et le filament.

Etat phytosanitaire

Conditions dans lesquelles on trouve un organe ou une plante entière en rapport avec la contamination ou à l'attaque de la part de microorganismes pathogènes.

Exalbuminée

Voir Albumen.

Faculté germinative

La germination maximale d'un lot de graines est appelée 'capacité germinative' ou, plus fréquemment, 'faculté germinative'. Elle se définit comme le pourcentage de graines en mesure de germer dans des conditions particulières sur une période déterminée.

Fécondation

Dans la reproduction sexuée, union des gamètes mâles et femelles.

Fermentation anaérobie

Processus biologique de production d'énergie chimique en absence d'oxygène.

Follicule

Fruit sec formé à partir d'un carpelle unique et dont la déhiscence se fait par une fente longitudinale correspondant à la soudure des bords carpellaires.

Formaldéhyde

Composé (chimiquement : aldéhyde formique) utilisé, en solution diluée, pour la conservation à long terme d'échantillons biologiques.

Formazan

Composé azoté coloré, insoluble dans l'eau et dérivant de la réduction d'un sel de tétrazolium. Il est utilisé pour vérifier dans les tissus végétaux l'activité enzymatique oxydante.

Forme biologique

Type de réponse des plantes supérieures aux mauvaises saisons, sur la base de la localisation des bourgeons et à leur distance du sol.

Fruit

Organe végétal qui se forme après la fécondation pour une modification structurelle de l'ovaire renfermant à maturité les graines. Qualifié de 'vrai' quand il dérive uniquement des carpelles d'une fleur fécondée (en particulier de la région ovarienne) et de 'faux' quand des parties accessoires se joignent aux carpelles.

Funicule

Filament constitué d'un faisceau conducteur enveloppé de parenchyme qui part du placenta et se termine à la base de l'ovule des Angiospermes pour en favoriser la nutrition.

Galbule

Strobile arrondi typique de quelques Cupressacées (ex. : *Juniperus* sp.pl.) constitué pour la plupart d'écailles ligneuses qui, soudées à l'origine, s'écartent et s'ouvrent de façon à favoriser la dispersion des graines.

Gamète

Cellules sexuelles mâles ou femelles qui chez les animaux et les plantes fusionnent pendant le processus d'amphimixie pour former le zygote.

Gamétophyte

Génération avec un nombre chromosomique haploïde (n) qui produit des gamètes. Chez les Spermatophytes le gamétophyte mâle a pour origine la mitose de la microspore produite dans les sacs polliniques (grain de pollen), le gamétophyte femelle a pour origine la mitose de la macrospore.

Gamique

Voir "Propagation sexuée ". Il concerne la fusion de deux gamètes.

Gel de silice

Substance amorphe, incolore et poreuse, capable d'absorber de l'eau et autres substances ; pour cette raison, il est utilisé comme déshydratant et décolorant.

Gemmule

Partie épigée d'une plante vasculaire, constituée d'une tige et de feuilles dans les premières phases de son développement à partir d'une graine ou d'un bourgeon.

Génotype

Individu génétiquement distinct (avec des gènes ou des caractères qui le distinguent d'autres) ; un génotype est la manifestation d'un allèle différent du même gène ou caractère.

Géophyte

Plantes pérennes avec des organes hypogés (ex : bulbes ou rhizomes) sur lesquels on trouve les bourgeons.

Germinabilité

Dans un sens général, représente la capacité de germer. Il s'emploie, parfois, comme synonyme de faculté germinative (ou capacité germinative).

Germination

Processus physiologique qui correspond à la reprise de la croissance active de l'embryon contenu dans la graine qui se manifeste avec l'émission de la radicule. Le processus germinatif est constitué de trois phases : pendant la première il se produit l'absorption d'eau, dans la seconde phase, considérée comme la plus importante, les réserves sont hydrolysées et commence la synthèse d'enzymes et de substances destinées au développement de la plantule pendant que la troisième phase débute avec l'émission de la radicule. La germination peut être considérée achevée lorsque la plantule a produit une surface photosynthétique en mesure de pourvoir aux besoins en hydrates de carbone.

Germination épigée

Germination dans laquelle les cotylédons sont soulevés par l'hypocotyle qui les amène au dessus du sol.

Germination hypogée

Germination dans laquelle les cotylédons restent dans la graine sous la surface du sol pendant que l'épicotyle s'allonge.

Germoplasme

C'est la base physique de l'héritage, le complexe héréditaire transmis d'une génération à l'autre. Somme totale des gènes et des facteurs cytoplasmiques qui gouvernent l'hérédité, couramment nommée pour l'information génétique présent dans l'effectif d'une espèce, dans son ensemble ou de particuliers écotype, race, clone ou variété.

Gibbérelline

Hormone végétale qui stimule la croissance et la germination en permettant dans certaines conditions d'éliminer la dormance de certaines graines.

Glycérine

Polyalcool utilisé pour conserver et stabiliser le matériel biologique frais.

Gousse

Fruit sec formé à partir d'un carpelle unique et dont la déhiscence se fait par deux fentes longitudinales, l'une correspondant à la zone de soudure des bords carpellaires, l'autre suivant la nervure du carpelle. (Légumineuses)

Grain de pollen

Élément reproducteur mâle des Spermatophytes, correspondant initialement à une microspore qui a la fonction de transporter le gamétophyte mâle à proximité du gamétophyte femelle (Voir pollen).

Graine

Provient de la transformation de l'ovule fécondé.

Graine intermédiaire

Graine capable de supporter une légère dessiccation, son comportement est intermédiaire entre les graines orthodoxes et récalcitrantes.

Graine orthodoxe

Graine capable de résister à la dessiccation.

Graine récalcitrante

Graine qui ne survit pas à la dessiccation ni à la congélation.

Gymnosperme

Spermatophytes avec un appareil reproducteur unisexué, dont les graines nues ne sont pas à l'intérieur d'un carpelle, mais portées par des écailles ou des feuilles spécialisées en strobiles.

Gynécée

Organe reproducteur femelle formé du pistil qui occupe le verticille le plus interne de la fleur.

Habitat

Lieu qui permet la vie d'un ou plusieurs organismes et/ou biocénose, caractérisé par des propriétés physiques et biotiques déterminées.

Halophytes

Végétaux capables de prospérer en milieux saumâtres et salés.

Haploïde

Cellule dont le noyau ne présente qu'une série unique de chromosomes.

Héliophile

Préférence de quelques plantes dites aussi photophiles, pour le rayonnement élevé et direct du soleil.

Herbivore

Organisme animal qui se nourrit de plantes.

Hermaphrodite

Fleur bisexuée, qui présente à la fois les structures reproductrices mâles et femelles.

Hile

Cicatrice présente sur les graines suite au détachement du funicule.

HLS

Le modèle HLS (tonalité, luminance, saturation) utilise les concepts de tonalité, de luminosité et de saturation pour la caractérisation colorimétrique d'un échantillon. La tonalité indique le type de couleur ; la saturation décrit la pureté de la teinte ; la luminosité est liée à l'intensité de la lumière, traduite en niveaux de gris : à forte luminosité correspond la plus grande proximité du blanc.

Humidité relative

Exprimée en pourcentage, est définie comme le rapport entre le poids de vapeur d'eau contenue dans 1 kg de matière et le poids de vapeur d'eau contenu dans 1 kg de matière saturée, à une température donnée:

Hybridation

Croisement entre deux individus appartenant à des taxa génétiquement différents.

Hybride

Individu qui s'est formé de la fusion entre des gamètes appartenant à des entités taxonomiquement

différentes.

Hydrochorie

Dissémination par l'eau, des fruits, graines, et toutes diaspores en général.

Hydrophyte

Plantes aquatiques généralement avec des bourgeons submergés pendant les saisons défavorable. Elles peuvent être plus ou moins enracinées au substrat.

Hygroscopique

Qui a tendance à absorber l'humidité de l'air.

Hypocotyle

Axe embryonnaire qui relie la radicule avec les cotylédons.

Imbibition

Absorption d'eau liquide par les graines. Phénomène mécanique précédant la germination.

Incubateur

Appareil utilisé dans les essais de germination qui permet d'évaluer la réponse à des températures constantes et généralement à l'obscurité.

Indéhiscence

Se dit d'un fruit à maturité qui ne s'ouvre pas pour libérer ses graines.

Index Seminum

Liste des graines d'un jardin botanique ou d'une banque de semences disponible pour des échanges à profit mutuel avec autres institutions, toujours dans des buts scientifiques et sans but lucratif.

Indigo carmin

Composé chimique permettant de réaliser un test de coloration indiquant la vitalité des graines. Les parties saines ne se colorent pas, les tissus morts se colorent en bleu.

Individu

Entité biologique caractérisée par un patrimoine génétique spécifique, physiquement indépendant et capable de vie autonome.

Inflorescence

Ensemble de fleurs disposées dans une structure commune. (ex : corymbe, ombelle, cyme, etc.).

Infrutescence

Ensemble de fruits disposés dans une structure unique qui sont issus d'une inflorescence compacte, en nombre variable sur un axe principal, simple ou ramifié.

Inquilinisme

Type particulier de symbiose dans laquelle une espèce animale coexiste avec une espèce différente en occupant un espace commun.

Insolation relative

Indique le rapport entre les heures effectives d'ensoleillement et celles qui seraient possibles dans un lieu et un laps de temps donnés.

Lavage des semences pour lever la dormance

Prétraitement consistant en un lavage pendant quelques heures dans de l'eau ou avec un autre liquide à une température donnée, visant à éliminer des inhibiteurs de germination contenus dans la graine.

Locule

Une des loges dans laquelle s'est subdivisée une structure compartimentée.

Loculicide

Déhiscence d'un fruit qui s'ouvre avec des fentes correspondant à la ligne dorsale médiane de chaque carpelle.

Locus génique

Sur la chaîne d'ADN, indique la position d'un gène déterminée. Voir aussi Allèle'.

Lot

Quantité spécifique de matériel végétal de qualité raisonnablement uniforme. Issu de la récolte, dans une population déterminée, pour une donnée unique (Voir Accession).

Macération

Opération consistant dans le traitement avec de l'eau ou tout autre solvant liquide, les fruits charnus pour séparer les parties pulpeuses des dures (ex. : les semences du tissu charnu des baies).

Macrobioclimat

Représente l'unité de plus haut rang dans la classification bio-climatique. Il s'agit de modèles biophysiques déterminés par l'effet de valeurs latitudinales, climatiques et de végétation. Sur la Terre on reconnaît 5 macrobioclimats : tropical, méditerranéen, tempéré, boréal et polaire.

Macrosporophylle

Feuilles fertiles spécialisées supportant les structures reproductrices femelles chez les fougères.

Manipulation (des semences)

Ensemble des opérations (propreté, évaluation, sélection, etc.), lorsque la semence est transférée de l'entrée en banque à son stockage.

Maturation

Moment où le fruit commence à avoir la couleur définitive de maturité.

Maturation des semences

Processus physiologique qui amène les semences présentes sur la plante à l'état optimal pour la dispersion. Au moment de la maturation les semences sont dans les conditions appropriées pour pouvoir être indépendantes de la plante mère et pour pouvoir, successivement, donner naissance à de nouveaux individus. La maturation n'est pas toujours le moment où les semences présentent la germinabilité maximale, ainsi, elles peuvent présenter une dormance ou avoir besoin de post-maturation.

Méiose

Division cellulaire (appelée aussi division réductionnelle), qui à partir d'une cellule diploïde donne quatre cellules haploïdes. Elle est composée de deux divisions successives avec la reproduction de matériel génétique. Elle se produit dans une cellule spécialisée représentée par la cellule mère pour les spores dans les cycles haplodiplontes, par les zygotes dans les cycles haploïdes, par les gamétophytes dans les cycles diplontes.

Membrane cellulaire

Double couche lipidique dans laquelle sont submergés des complexes protéiques et qui délimite la cellule vivante en réglant ses échanges avec l'extérieur.

Méricarpe

Parties individuelles venant de la division d'un schizocarpe à maturité, qui est issu d'un ovaire pluricarpellé apocarpique ou syncarpique. Un méricarpe correspond à un akène.

Mésocarpe

Couche médiane parenchymateuse interposé entre l'épicarpe et l'endocarpe, habituellement charnu.

Métapopulation

Ensemble de sous-populations séparées spatialement, mais connexes fonctionnellement par la capacité dispersive de leurs composantes.

Microclimat

Ensemble des conditions climatiques caractéristiques d'une portion réduite de territoire (ex. : microclimat d'une grotte).

Micropyle

Ouverture apicale de l'ovule permettant le passage du tube pollinique qui peut ainsi rejoindre le sac embryonnaire.

Microsporophylle

Feuilles fertiles modifiées portant les structures reproductrices mâles supportant un ou plusieurs microsporanges d'où sortiront après méiose des microspores.

Mitose

Division nucléaire d'une cellule eucaryotique pendant laquelle chacune des deux cellules filles reçoit un bagage chromosomique égal à celui de la cellule mère.

Moelle

Tissu parenchymateux qui occupe la partie centrale du tronc et de la racine dans les structures secondaires.

Monitoring

Chaque forme d'observation systématique et de relevé exercés sur un ou plusieurs organismes vivants, populations ou phénomènes naturels.

Monocarpique

Plante, annuelle ou pérenne, qui fleurit et fructifie une seule fois pendant sa vie (ex. : *Agave* sp. pl., *Verbascum* sp. pl.).

Monocline

Fleur dotée soit de l'appareil sexuel mâle soit femelle. Plante monoïque à fleurs bisexuelles ou hermaphrodites.

Monocotylédoné

Terme générique se réfèrent au groupe d'Angiospermes caractérisés par un embryon avec un seul cotylédon, de feuilles à nervures parallèles, de fleurs trimères, d'atactostèle et de l'absence de changement interfascial.

Monoïque

Espèce dont chaque plante porte des fleurs mâles et femelles unisexuées. Voir Dioïque.

Morphométrie

Etude quantitative des caractères morphologiques d'organismes vivants ou de leurs parties.

Morphotype

Types taxonomiques qui ne sont pas bien définis mais morphologiquement bien diversifiés.

Multiplication du matériel végétal

Processus avec lequel on développe le nombre d'individus à partir d'un pool limité de ceux-ci (matériel de multiplication). Dans quelques secteurs (ex. Horticulture) la propagation asexuée des plantes est particulièrement répandue, elle est indiquée aussi comme multiplication, en position contraire à la reproduction (propagation sexuée).

Mutualisme

Association entre des individus d'espèces différentes qui comporte des avantages pour tous les deux, mais qui ne constitue pas un avantage obligatoire.

Mycorhize

Associations mutualistes entre les racines de la plupart des espèces végétales (environ 90%) et les champignons du sol qui donnent lieu à des rapports symbiotiques avec un avantage réciproque. On distingue les endo et les ectomycorhizes.

Mycose

Pathologie causée par des champignons.

Myrmécochorie

Processus de dissémination assuré par les fourmis.

Naturalisée

Espèce étrangère introduite avec des cultures ou accidentellement, qui devient spontanée car elle est capable de se reproduire de façon autonome et donc d'accomplir entièrement son cycle biologique.

Niche écologique

Portion d'habitat caractérisé par des conditions abiotiques particulières (ex. : microclimat) adaptées et/ou nécessaires pour la survie et le déroulement d'une partie ou du cycle vital complet d'une ou plusieurs espèces végétales et/ou animales.

Nucelle

Portion interne de l'ovule des Spermatophytes, constituée de tissu diploïde dont elle se diversifie la cellule mère du macropore. Il correspond au mégasporange.

Nucule ou noix

Akène dont le péricarpe est fibreux ou ligneux. (Bétulacées)

Ombrotype

Unité qui exprime le rapport entre les précipitations moyennes (mm) et la somme en degrés centigrades de ces mois où la température moyenne est supérieure à 0°C.

Origine

Il est ainsi décrit dans le D. Leg. 386/2003 : pour un territoire ou une source de semences autochtones, l'origine est le lieu où on trouve les arbres. Pour un territoire ou une source de graines non autochtones, l'origine est le lieu où les graines ou les plantes ont été à l'origine introduites. Les origines d'un territoire ou d'une source de graines peuvent être méconnues.

Ornementation

Dessins, taches ou structures qui caractérisent le tégument des graines.

Ornithochorie

Dissémination des fruits, semences ou spores effectuée par les oiseaux.

Orophyte

Plante qui préfère les zones montagneuses et en particulier les aires culminantes.

Ortet

Un ortet est un individu qui se développe à partir d'une graine, donc de deux parents par voie sexuée et ensuite, par clonage, donne de nouveaux individus génétiquement identiques (clones).

Ovaire

Partie basale du pistil contenant les ovules ; il peut être supère (c'est-à-dire positionné dans la partie plus haute du réceptacle), infère (c'est-à-dire plongé dans le réceptacle ou complètement enveloppé par celui-ci) ou semi - infère (lorsque il s'insère sur un réceptacle légèrement concave). Il donne des fruits après les fécondations.

Ovule

C'est la structure reproductive qui donne son origine à la graine après la fécondation ; elle est formée d'un ou de deux téguments, du nucelle et du gamétophyte femelle qui occupe la partie la plus interne.

Paillage

Lorsque le terme se réfère aux opérations de semis, il indique la protection du sol réalisée avec différents matériaux durables ou dégradables ou, choisit en fonction du coût et non pas de la facilité à les enlever (sciure, paille, feuillage, nattes, film en plastique, "tissu non tissé", etc.) dans le but exclusif de protéger la graine du froid et de la déshydratation du sol.

Papier filtre

Papier absorbant de laboratoire qui est utilisé comme un filtre à usage unique, ainsi que comme substrat dans la plupart des essais de germination.

Pappus

Structure formée de poils, soies ou de squames insérées à une extrémité des graines (Apocynacées) ou des fruits (Composées) permettant la dissémination par anémochorie.

Parasitisme

C'est une forme d'association biologique entre deux espèces d'organismes dans laquelle l'une a l'avantage (ex. nourriture, protection, etc.) au dépend de l'autre. La première espèce est dite parasite, la

seconde hôte.

Parthénogénèse

Développement asexué d'un gamète (ou gamétange) sans l'union avec un autre gamète. Il peut être haploïde ou diploïdes.

Parthénocarpie

Formation de fruits sans qu'il y ait fécondation.

Pathogène

Micro-organisme provoquant une maladie.

Pédologie

Science qui étudie les origines, la formation, la composition chimique, l'évolution des sols et les effets induits des biocénoses qui interagissent entre elles.

Péricarpe

Paroi du fruit.

Périsperme

Tissu dérivé du parenchyme nucellaire après la double fécondation et accumulant la plus grande partie des réserves de certaines graines.

Phénologie

Branche de l'écologie qui étudie les rapports entre les facteurs climatiques (humidité, température, photopériode) et la manifestation saisonnière de quelques phénomènes de la vie végétale (croissance, floraison, maturité des fruits, perte des feuilles).

Phénotype

Ensemble des caractères morphologiques issus de l'influence directe du milieu.

Photopériode

Durée de la période d'éclairage journalier, facteur qui influe sur la physiologie des plantes et en particulier sur la germination.

Phylum

En terme taxonomique c'est un regroupement de classes et représente la "Division" (pluriel phyla).

Phytocénose

Voir Association.

***Pierrosité**

Présence en pourcentage de pierre sur une surface déterminée.

Pionnière

Espèce douée de capacité colonisatrice en milieux fortement sélectifs (ex. : dunes sableuses), et en mesure de préparer le terrain pour la colonisation de la part d'espèces plus exigeantes.

Placenta

Partie du carpelle où sont insérés les ovules ; généralement elle est renflée.

Plantule

Plante juvénile obtenue par semis.

Pluricarpique

Plante qui fructifie plusieurs fois pendant sa vie.

Poids cible

Poids de l'accession qui correspond à une valeur déterminé du contenu d'humidité interne (mc%).

Poids frais de l'accession

Poids de l'accession au moment de l'arrivée à la banque, sans qu'il ait subi aucun processus de

déshydratation ou de nettoyage.

Poids frais des semences

Poids des graines sélectionnées et nettoyées avant qu'elles ne subissent des procédés de déshydratation.

Pollen

Grains minuscules produits par les anthères des plantes à fleurs, porteurs des gamètes mâles. Voir pollinisation.

Pollenkit

Substance composée de lipides, protéines et pigments qui recouvrent les structures (ou ornements) des grains de pollen avec une fine couche huileuse ou avec des villosités afin de permettre une meilleure adhésion aux poils des insectes.

Pollinisation

Transport du pollen des appareils reproducteurs mâles aux femelles.

Pollinisation croisée

Transfert du pollen entre des fleurs différentes de la même plante ou entre des fleurs de plantes différentes de la même espèce.

Pollinisation directe

Transfert du pollen d'une fleur sur les stigmates de la même fleur, synonyme d'autogamie (Voir Autopollinisation).

Polychorie

Procédés de dispersion non spécialisés qui se réalisent à des stades différents par différents vecteurs.

Polycormique

Qui présente de nombreux fûts plutôt qu'un seul principal.

Polymorphisme

Présence de plusieurs formes sous lesquelles se présente un même organisme (ex. une espèce) ; le polymorphisme peut dériver de causes génétiques (variabilité génétique) ou environnementales (formes saisonnières).

Population

Groupe d'individus ayant des ancêtres communs qui sont plus susceptibles de se reproduire entre eux qu'avec des individus d'une autre population.

Post maturation

Processus de développement des graines après leur récolte ou leur abscission, pendant lequel elles continuent leur développement pour arriver à leur maturité physiologique.

Potentiel hydrique

Il représente l'énergie potentielle de l'eau et, est donné par le déplacement des molécules d'eau d'un lieu à un autre grâce aux différences entre les potentiels d'énergie, que ce soit dans le monde vivant ou non. Ce paramètre indique le sens du mouvement de l'eau dans les graines et dans le sol, de manière que l'eau se déplacera toujours du potentiel hydrique maximal (moins négatif) vers le minimal (plus négatif).

Preheating

Voir stratification chaude.

Prétraitement

Action permettant de lever la dormance et de préparer les graines à la germination et à la levée quand elles seront germées.

Propagation végétative ou agamique

Production de nouvelles plantes en dehors du processus gamique, avec la formation d'individus ayant des caractéristiques génétiques identiques à celui de départ ; elle se réalise par des bouturages, greffes, propagules, divisions de souche, micropropagations, bulbilles, etc.

Propagule

Mode de propagation végétative dans laquelle la formation des racines du nouvel individu se produit sur une partie de la plante (généralement une branche souple) encore attachée à la plante mère.

Protocole de germination

Ensemble d'action ou de procédé visant à aboutir à une germination optimale pour une espèce et un lot de semence donné.

Provenance

Le peuplement où a été prélevé la graine. On entend comme provenances d'origines celles pour lesquelles le matériel de base est autochtone. On entend comme provenances artificielles celles d'espèces exotiques qui sont employées, pour leur valeur, comme peuplement pour les graines. Tous les deux types peuvent fournir du matériel sélectionné et/ou éprouvé, lorsque sont effectuées des expérimentations.

Psammophile

Espèce adaptée aux milieux sableux côtiers (ex.: dune).

Pureté des semences

Dans un lot de graines c'est le pourcentage en poids de graines nettoyées, intactes de l'espèce considérée. Les graines étrangères et les matières inertes sont considérées comme des impuretés.

Quarantaine

Période de sûreté pendant laquelle les lots destinés à la banque sont stockés dans des locaux réservés et séparés, au fin d'évaluer la présence de parasites ou d'éventuelles pathologies (ex. : moisissure).

Racine pivot

Racine principale parfois divisée. Originaires du col, en opposition à la tige, elle a un développement prédominant sur les autres racines secondaires.

Ramet

Réplique végétative, génétiquement identique, donnée à partir d'un individu ancestral (ortet). Simple élément ou ensemble de fûts facilement identifiable et comparable, issu du même individu fonctionnel.

Rang écologique

Ensemble des différentes conditions écologiques (ex. : rang altimétrique) dans lequel une espèce peut s'adapter, croître et se reproduire.

Réhabilitation (renaturalisation)

Opération de rétablissement d'un milieu artificialisé permettant de ramener à leur état originel dans des temps variables et dépendant soit des conditions ambiantes (ex. climat), soit d'arrêt du ou des facteurs de perturbation.

Rejets

Rameaux qui se développent suite à la coupe de fûts ou branches. On distingue des rejets vrais (de bourgeons de fûts et de branches) et de rejets radicaux (de bourgeons radicaux).

Repos végétatif

C'est la période où le développement de la plante est ralenti jusqu'à la quiescence, pour permettre le passage des saisons difficiles (ex. : froid hivernal, sécheresse estivale).

Reproduction sexuée

Fusion gamétique qui aboutit à la graine, organisme nouveau et différent génétiquement des deux parents.

Résilience écologique

C'est la capacité d'un système qui a subi un impact négatif (ex. : incendies ou coupe de bois) de rétablir un équilibre homéostatique. Elle reflète les possibilités que le système a de revenir à des niveaux de qualités acceptables. Nombreuses sont les caractéristiques qui décrivent la résilience, parmi lequel la plasticité et l'ampleur de la riposte. Dans le premier cas cela signifie la vitesse avec laquelle le système est en mesure de rétablir son état initial après la perturbation ; dans la seconde, par contre, on fait référence au niveau de modification par rapport à la condition initiale que le système peut supporter tout

en étant par la suite en mesure de revenir à l'état initial.

Résistance écologique

C'est la capacité d'un système à réagir en évitant des modifications par rapport à l'état d'origine pendant un épisode de perturbation ou d'impact négatif.

RGB

Acronyme anglais, Red Green Blue (rouge vert bleu). En informatique, il codifie la couleur, établie comme combinaison des 3 couleurs primaires rouge, vert et bleu. En variant les pourcentages de chacune des couleurs, on obtient la gamme du blanc (dans lequel le pourcentage de chacune des couleurs est le zéro) au noir, et on obtient avec les trois couleurs en même temps le 100%. La technologie RGB est utilisée dans les téléviseurs et dans les moniteurs, et est réalisée au moyen d'une série de points, dont chacune est composée d'autres trois points plus petits qui correspondent aux trois couleurs primaires. Le mécanisme est dit de synthèse additive, contrairement à la synthèse soustraite utilisée dans la presse et dans la photographie.

Rhizome

Tige souterraine, ordinairement horizontale, sans chlorophylle et dont les feuilles sont des écailles, chargée de réserves, sur laquelle naissent les tiges aériennes, les feuilles et les racines.

Samare

Akène ailé. (Acéracées)

Scarification

Prétraitement créant des lésions au tégument et permettant de lever des inhibitions tégumentaires à la germination.

Schizocarpe

Fruit sec qui se divise à maturité en plusieurs méricarpes. (Diakènes des Ombellifères)

Sciaphile

Espèce végétale en mesure de tolérer ou même de préférer des conditions d'éclairage faible.

Sclérophylle

Plantes avec des feuilles riches en tissus sclérenchymateux, par conséquent dures et avec peu de contenu en eau.

Ségrégation

Il indique la transmission indépendante à la progénie des caractères déterminés des gènes portés sur chaque copie des chromosomes. C'est la transmission indépendante qui peut représenter, même après plusieurs générations, un caractère précédemment masqué par l'interaction du gène responsable avec le reste de l'ADN.

Sélection des semences

Dans le cadre des opérations liées au travail des semences on signifie : l'extraction de la graine des fruits, le nettoyage des impuretés, la séparation des graines vides et le calibrage.

Semence prégermée

Graine dans les toutes premières phases de la germination, généralement se trouvant dans cette situation suite à quelque traitement. Elle montre normalement les téguments rompus et/ou la radicelle. Terme utilisé dans la pratique horticole, lorsqu'il est utilisé pour la semence qui a déjà commencé à germer. Parfois il est utilisé comme synonyme "de semence germée prématurément" dans la terrine de stratification.

Semis

Procédé qui place la graine dans des conditions propices à sa germination.

Semis à la volée

Il s'effectue en semant la graine de manière uniforme mais fortuite (à la main ou avec des machines adéquates).

Semis en ligne

Disposition des semis en ligne selon une distance prédéterminée.

Semis en poquet

Disposition des semences en petit groupe en distances régulières.

Semis naturel

Peuplement d'arbre avec des caractéristiques phénotypiques moyennement supérieures à celles d'autres populations végétales en conditions semblables. Employé pour la récolte de graines. Il peut être simplement sélectionné ou même contrôlé.

Siliceux (terrain)

Dérivant de roche riche en silice.

Site de récolte

Lieu où est récolté le matériel végétal.

Spermatophyte

Plantes vasculaires qui se reproduisent et se disséminent par des graines.

Spore

Chez les végétaux, cellule haploïde issue de la méiose.

Station

Localité caractérisée par des paramètres physiques et géographiques où, sont effectuées les récoltes de matériel végétal.

Stigmate

Partie supérieure du carpelle, en général expansée, destiné à la capture du pollen.

Stockage

Indique l'accumulation et la conservation dans des conditions et des paramètres ambiants définis de structures végétales, comme les graines, par des conditions aptes à maintenir le plus longtemps possible leurs caractéristiques initiales.

Stolon

Tige aérienne grêle à internœuds, rampants sur le sol, capable de différencier de loin en loin tout à la fois des racines et des bourgeons feuillés, permettant la multiplication de l'individu.

Stratification

Prétraitement visant à lever des dormances et à rendre un lot de semences apte à germer. Les graines sont placées au froid humide pendant plusieurs semaines.

Stratification chaude

Stratification des graines menée autour de + 20°C.

Stratification froide

Stratification (voir Stratification des graines) menée à des températures généralement comprises entre + 2°C et + 5°C.

Stratification sans substrat

Stratification de la graine avec, généralement après immersion dans l'eau pendant 24-48 heures avec agitation. Ensuite les graines sont généralement rangées dans des sacs de plastique, ne fermant pas hermétiquement pour permettre les échanges gazeux, en ambiance thermiquement contrôlé (réfrigérateur). Il est conseillé de ne pas placer plus de 10-12 Kg de semences imbibées par sac et de remuer périodiquement. L'émanation d'odeur alcoolique après une période de vernalisation indique une respiration anaérobie qui est la conséquence d'une aération limitée. De nombreuses espèces (*Pseudotsuga menziesii*, *Alnus cordata*, etc.) donnent de bonnes réponses à ce type de traitement, sans avoir de problèmes d'ordre sanitaire. Il est évident que la stratification de la graine sans substrat permet un gain considérable d'espace et une simplification des opérations manuelles, ce qui est préférable aux systèmes traditionnels, avec un résultat efficace. La stratification de graines nues doit être effectuée à des températures plus basses (+ 3°C environ) que la vernalisation traditionnelle (+ 5°C environ) et donne généralement de meilleurs résultats et des traitements plus courts.

Strobile

Structure reproductive caractéristique des Gymnospermes, constituée de l'ensemble des micros ou des macrospores ou écailles fertiles disposés sur un axe allongé. Il est appelé aussi cône ou pigne.

Strophiole

Partie charnue de la semence dérivant du funicule.

Style

Structure cylindrique et fine de liaison entre le stigmate et l'ovaire.

Succession

Ensemble des divers stades de l'évolution de la végétation en un lieu donné.

Suffrutescente

Plante pérenne à souche ligneuse avec des tiges herbacées qui se renouvellent chaque année.

Symbiote

Désignation de chacun des deux partenaires (Microorganismes tels les bactéries, champignons et algues) vivants en symbiose (communauté) avec un organisme supérieur (plante).

T50

Paramètre utilisé pour déterminer la vitesse de germination exprimé en nombre de jours correspondant au temps nécessaire pour obtenir le 50% de la capacité germinative du lot de semences.

Table densimétrique

Machine équipée d'un plan oscillant et vibrant sur laquelle les graines se séparent en gradients différents de poids spécifique.

Talle

Partie de branche ou de racine employée pour propager végétativement plante.

Taux de mortalité

Indice de régression d'une population.

Taux de natalité

Indice de croissance d'une population.

Taxon

Unité de classification dénommée et regroupant des individus ou des ensembles d'espèces. Plante qui a ses caractères propres. Ce peut être une espèce, un hybride ou un cultivar.

Tégument (de la graine)

Enveloppe de l'ovule constitué d'une ou deux couches ayant la fonction de protection et d'isolation de l'environnement extérieur. Après la fécondation, elle s'épaissit et modifie sa structure pour une meilleure protection des parties internes de la graine.

Température optimale

La température à laquelle la croissance de la plante ou, en général, la manifestation d'un phénomène se produit le plus rapidement possible.

Temps Moyen de Germination (TMG)

C'est un moyen pour exprimer la vitesse de la germination. Il se définit comme la somme (de 1 à n) des produits entre des graines germées et le jour où s'est produit leur germination, le tout divisé par le nombre total de graines germées à la fin de l'essai. Une germination rapide est caractérisée par un TMG bas.

Teneur en humidité interne des semences (mc%)

Se réfère aux graines, c'est le poids d'eau contenu, exprimé en pourcentage, par rapport au poids frais de l'échantillon.

Testa

Tégument externe de la graine pouvant porter pointes, crochets, poils, aile, jouant un rôle dans la dissémination de cette graine.

Test à froid

Il s'agit d'un test utilisé pour estimer la vigueur des graines de blé et de soja. Les graines sont semées en terrine ou sur du papier absorbant et exposées au froid pour une période spécifique où elles subissent l'influence de la température, des imbibitions et des microorganismes. Suite à ce traitement les graines sont transférées en conditions optimales pour leur germination.

Test au diacétate de fluorescéine

Représente un type de test colorimétrique et une estimation rapide de la vitalité des graines. À l'intérieur des cellules vitales ayant des membranes intactes les enzymes estérases transforment le diacétate de fluorescéine en un produit fluorescent. Par l'utilisation de microscopes à fluorescence et de filtres, il est possible de quantifier les embryons vitaux de ceux endommagés

Test de conductibilité

Il évalue l'intégrité des tissus et des membranes cellulaires, donc indirectement la qualité de la graine. La graine ayant des membranes endommagées, soumise à une imbibition subit une perte de contenus cellulaires (ioniens, hydrates de carbone, etc.) qui conditionne les valeurs de la conductibilité électrique.

Tétrakène

Fruit sec indéhiscent composé de quatre méricarpes (ex. Boraginacées et Lamiacées).

Tétrazolium

Composé chimique (chlorure ou bromure de 2,3,5-triphényl tétrazolium) permettant de réaliser un test biochimique indiquant la vitalité des graines. Les parties saines se colorent en rouge.

Thermo-balance

Analyseur électronique d'humidité qui pèse et déshydrate les graines en même temps, en calculant la différence en poids en pourcentage. Il représente une méthode de mesure de l'humidité de type destructif.

Thermopériode

Facteur influençant le développement d'une plante par l'alternance de température entre le jour et la nuit.

Thermotype

Unité qui exprime un concept de sommes des valeurs relatives aux températures maximales, moyennes et minimales mensuelles ou annuelles. Chaque type de thermotype prévoit un horizon inférieur et supérieur.

Thérophyte

Plantes annuelles monocarpiques dont seules les semences subsistent à la mauvaise saison.

Tissu méristématique

Ensemble de cellules indifférenciées qui ont maintenu inaltérée la capacité de se diviser et dont la fonction principale est de proliférer en donnant de nouvelles cellules qui vont alors se différencier. Ils sont dits aussi tissus embryonnaires.

Tomographie axiale informatisée de la semence

C'est une technique radiographique particulière appliquée à l'analyse des graines qui fournit des images unidimensionnelles de la densité des tissus, obtenues par des sections virtuelles chaque 0.5 mm des différents niveaux de densité, colorés conventionnellement, et donnent des indications sur la qualité du matériel soumis à des analyses. Une série de sections unidimensionnelles peuvent être élaborés pour obtenir des images tridimensionnelles.

Topophysie

Phénomène par lequel les bourgeons, les germes ou les boutures maintiennent pour un laps de temps variable la forme et la phase végétative qu'ils avaient sur la plante où a été effectué le prélèvement.

Tourbe

Matériel extrait de dépôts organiques constitués de restes de végétaux actuels ou récents au premier stade de carbonisation, largement employé en pépinière pour la préparation de terreau.

Traitement des semences

Souvent employé comme synonyme de prétraitement des semences (voir).

TTC

Voir Tétrazolium

Tubercule

Racine renflée servant de réserve, ou excroissance que présentent certaines plantes sur les feuilles, l'écorce ou les fruits.

Tubéreux

Organe de réserve des plantes constitué d'un fût ou une branche souterraine avec un fort épaissement au niveau de la moelle. La pomme de terre est un tubercule. On dit tubérisé lorsqu'une racine présente les mêmes caractéristiques que le tubercule.

Type chorologique

Il détermine les aires géographiques où on retrouve un taxon donné (ex. : *Quercus suber* L. est une espèce ouest-Médit.)

Type de semences

Selon la capacité des graines à tolérer la déshydratation (même à des niveaux plus bas que ceux normalement atteints en conditions naturelles) et selon la conservation on distingue les graines en orthodoxes, intermédiaires et récalcitrantes.

Unisexué

Fleur avec des organes uniquement masculins ou uniquement féminins, c'est-à-dire qu'elle porte, respectivement, seulement des étamines ou un pistil.

Unité taxonomique

Entité hiérarchique du monde vivant qui comprend des individus entre eux plus ou moins semblables et en second lieu certains critères de classement. Synonyme de taxon.

Validation du protocole

Confirmation expérimentale des résultats obtenus par l'application de protocoles de germination déterminés au moyen d'expérimentation ou élaborés par d'autres institutions.

Variabilité génétique

Présence dans les espèces de différentes formes du ou des mêmes caractères. Dans la nature, grâce à la recombinaison permanente de l'information génétique au cours des différentes générations, elle permet aux espèces de s'adapter aux variations ambiantes ; l'homme peut l'employer pour sélectionner les caractères les plus utiles.

Variété

Pour beaucoup d'espèces forestières, il s'agit simplement de clones ou de cultivars, comme par exemple pour le châtaignier ou pour les variétés greffées de noyer.

a. cultivar : terme agronomique pour indiquer une population de clones ou des semences définies avec des noms ou des sigles non latins à but pratique. Pour les plantes forestières, en traitant du même matériel du point de vue génétique, le nom peut changer selon la localité.

b. variété taxonomique ou géographique : il s'agit d'entité de rang variétal, habituellement typique d'aires géographiques et distinguables par quelques caractères, identifiés officiellement avec des noms latins de la Nomenclature Botanique Internationale.

Vernalisation

Procédé par lequel une période de basses températures va promouvoir un phénomène biologique (ex. floraison, ouverture des bourgeons, germination des graines) qu'il ne se produirait pas autrement. Dans le cas des graines, le terme est synonyme de stratification froide ou chilling.

Virage

Changement de couleur.

Vitalité

Une graine se définit vitale lorsque elle présente toutes les caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques essentielles à sa germination.

Warming

Voir Stratification chaude.

Xérophyte

Plante qui s'adapte avec facilité ou même à une préférence pour les lieux arides et secs.

Zoochorie

Procédé de dispersion des semences ou des fruits effectué par des animaux.

Zygote

Cellule diploïde qui dérive de l'union de deux gamètes suite à la fécondation.

12. ADRESSES UTILES

12.1. Réseau Italien de Banque de Germoplasme pour la Conservation *Ex Situ* de la Flore Spontanée Italienne (RIBES)

Banca del Gemoplasma CODRA Mediterranea S. r. l.
CODRA Mediterranea S. r. l.
Centro operativo per la difesa e il recupero ambientale
C. da Sciffra
85010 Pignola (PZ)

Banca del gemoplasma del CNR di Bari
Istituto di Genetica Vegetale IGV,
Consiglio Nazionale delle Ricerche
Via G. Amendola 165/ A
70126 Bari (BA)

Banca del gemoplasma del Molise
Dipartimento di Scienze e Tecnologie dell'Ambiente e del Territorio
Università degli Studi del Molise
Via Mazzini, 8
86170 Isemia

Banca del gemoplasma dell'Orto Botanico di Catania
Dipartimento di Botanica
Università degli Studi di Catania
Via A. Longo, 19
95125 Catania (CT)

Banca del gemoplasma dell'Orto Botanico di Padova
Centro di Ateneo Orto Botanico
Università degli Studi di Padova
Via Orto Botanico, 15
35123 Padova (PD)

Banca del gemoplasma dell'Orto Botanico di Palermo
Dipartimento di Scienze Botaniche
Università degli Studi di Palermo
Via Archirafi, 38
90123 Palermo (PA)

Banca del gemoplasma dell'Orto Botanico di Pisa
Orto Botanico, Dipartimento di Scienze Botaniche,
Università degli Studi di Pisa
Via Luca Ghini 5
56126 Pisa (PI)

Banca del gemoplasma dell'Orto Botanico di Roma

Orto Botanico, Dipartimento di Biologia Vegetale
Università degli Studi di Roma "La Sapienza"
Via Cristina di Svevia, 24
00165 Roma (RM)

Banca del gemoplasma dell'Orto Botanico di Viterbo
Centro Interdipartimentale dell'Orto Botanico
Università degli Studi della Tuscia
Strada Santa Caterina s. n. c.,
01100 Viterbo (VT)

Banca del gemoplasma della Majella
Parco Nazionale della Majella,
67030 Campo di Giove (AQ)

Banca del Germoplasma della Sardegna (BG-SAR)
Centro Conservazione Biodiversità (CCB)
Dipartimento di Scienze Botaniche
Università degli Studi di Cagliari
Viale Sant'Ignazio da Laconi,
13 09123 Cagliari (CA)

Banca del Germoplasma dell'Appennino Centrale
Centro Ricerche Floristiche dell'Appennino (C. R. F. A.)
c/o Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga
S. Colombo - via prov. le km 4,2
67021 Barisciano (AQ)

Banca del gemoplasma delle Alpi Sud-Occidentali
CBV – Centro per la Biodiversità Vegetale
Ente Gestione Parchi e Riserve Naturali Cuneesi
Via Santa Anna 34,
12013 Chiusa Pesio (CN)

Banca del gemoplasma per la conservazione delle specie anfiadriatiche
Centro Orto Botanico Interdipartimentale di Servizi
Università Politecnica delle Marche
Via Brecce Bianche s. n.
60131 Ancona (AN)

Banca di gemoplasma del Mediterraneo ®, ONLUS
Via Pietro Florida, 2
90129 Palermo (PA)

Banche del Gemoplasma Livornesi
Museo di Storia Naturale del Mediterraneo e Conservatorio delle specie vegetali di
Rosignano
c/o Provincia di Livorno,
P. zza del Municipio 4
57128 Livorno

Laboratorio per la conservazione della diversità vegetale ligure
Centro universitario di Servizi Giardini Botanici Hanbury Università degli Studi di Genova

Corso Montecarlo, 43, La Mortola
18039 Ventimiglia (IM)

Lombardy Seed Bank LSB
c/o Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri Università degli
Studi di Pavia
Via S. Epifanio 14
27100 Pavia (PV)

Trentino Seed Bank TSB
Museo tridentino di scienze naturali
Via Calepina, 14
38100 Trento (TN)

12.2 Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français (FCBN)

Fédération Conservatoires Botaniques Nationaux Français
Keramenez
29470 Plougastel-Daoulas (France)

Conservatoire Botanique National Alpin
Domaine de Charance
05000 Gap (France)

Conservatoire Botanique National de Bailleul
Hameau de Haendries
59270 Bailleul (France)

Conservatoire Botanique National du Bassin Parisien
61, rue Buffon
75005 Paris (France)

Conservatoire Botanique National de Brest
52, allée du Bot
29200 Brest (France)

Conservatoire Botanique National de Mascarin
RD 12, Domaine des Colimaçons
97436 Saint-Leu, Ile de la Réunion (France)

Conservatoire Botanique National du Massif Central
Le Bourg
43230 Chavaniac – Lafayette (France)

Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles
76 A avenue Gambetta
Résidence l'Aureto
83400 Hyères (France)

Conservatoire Botanique National de Midi-Pyrénées
Vallon de Sault, BP 315
65203 Bagnères-de-Bigorre cedex (France)

Conservatoire National des plantes médicinales, aromatiques et industrielles

Route de Nemours
91490 Milly-la-Forêt (France)

Conservatoire Botanique de Franche-Comté
Porte Rivotte
25000 BESANCON (France)

Mission Conservatoire Botanique Aquitaine, Poitou/Charente
Direction de l'Environnement, Conseil Général de la Gironde, Esplanade Charles De
Gaulle 33074 Bordeaux cedex (France)

Mission Conservatoire Botanique des Antilles Françaises
Antenne de la Martinique, Parc Floral, BP 4033
97254 Fort-de-France (Antilles Françaises) Antenne de la Guadeloupe

12.3 Réseau Espagnol de Banques de Germoplasme de Plantes Sylvestres

(Redbag)

Banco de gemoplasma del Jardín Botánico de Córdoba
Avda. de Linneo s/n
14004 Córdoba (Spain)

Banc de gemoplasma del Jardí Botànic de la Universitat de València
C/ Quart, 80
46008 Valencia (Spain)

Banco de gemoplasma del Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo
Apartado de Correos 14 de Tafira Alta
35017 Las Palmas de Gran Canaria (Spain)

Banco de gemoplasma del Real Jardín Botánico de Madrid
Plaza de Murillo, 2,
28014 Madrid (Spain)

Banc de llavors del Jardí Botànic Marimurtra
Passeig Carles Faust, 9
Apartat Correus 112
17300 Blanes – Girona

Banc de llavors del Jardí Botànic de Sóller
Ctra. Palma - Sóller, km. 30,5
Apartado de correos 44.
07100 Sóller (Spain)

Banco de semillas del Real Jardín Botánico Juan Carlos I
Universidad de Alcalá de Henares – Comunidad de Madrid
Ciudad Residencial Universitaria, Bloque A3-p.7. Campus de la Universidad de Alcalá.
28805 Alcalá de Henares (Spain)

12.4 Banque de *Germoplasme* et Centre pour la conservation internationale

Seed Conservation Department
Royal Botanic Gardens
Kew, Wakehurst place
RH176TN Ardingly, Haywards Heath (England, UK)

Seed Room, Kirstenbosch NBG
Private Bag X7 CLAREMONT,
Cape Town 7735 (South Africa)

Centro Agronomico Tropical de Investigaciòn y Ensenanza CATIE
Banco de semillas forestales Turrialba, Costa Rica

Banc de germoplasma del Jardí Botànic de Barcelona
C/ Dr. Font i Quer, 2. Parc de Montjuic.
08038 Barcelona (Spain)

Banc de llavors forestals – Generalitat Valenciana
Avda. Comarques del País Valencià, 114
46930 Quart de Poblet (Spain)

Centro Nacional de Mejora Forestal El Serranillo
Dirección General para la Biodiversidad - Ministerio de Medio Ambiente
Ctra. de Fontanar, Km.2 Apdo. de Correos, 249
19080 Guadalajara (Spain)

National Center for Genetic Resources Preservation
Department of Agriculture, Agriculture Research Services.
1111 South Mason
Fort Collins, Colorado 8052 1-4500 (USA)

Institut des Régions Arides
Laboratoire d'Ecologie Pastorale
4119 Médenine (Tunisie)

Instituto Universitario de Investigación CIBIO
(Centro Iberoamericano de la Biodiversidad)
Universidad de Alicante
30008 Alicante (Spain)

Mediterranean Agronomic Institute of Chania (MAICh)
Adresse: B.P. 85
73100 Chania – Crete (Grece)

12.5. Sites web

<http://www.apat.it>

Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici

<http://www.ars.usda.gov/is/AR/>

Agricultural Research Service

<http://www.aosaseed.com>

Association of Seed Analysts (AOSA)

<http://www.agraria.org/coltivazioniforestali.htm>

Atlante delle piante forestali

<http://www.anbg.gov.au/anpc/>

Australian Network for Plant Conservation

<http://www.tufts.edu/~cchester/biodiversity.html>

Biodiversity links

<http://digilander.libero.it/alberitaliani/boschi.htm>

Boschi italiani

<http://www.bgci.org.uk/>

Botanic Gardens Conservation International (BGCI)

<http://www.rbg.ca/cbcn/>

Canadian Botanical Conservation Network

<http://www.centerforplantconservation.org/>

Center for Plant Conservation

<http://www.ccb-sardegna.it>

Centro Conservazione Biodiversità – Università di Cagliari

<http://www.cibio.org>

Instituto Universitario de Investigación CIBIO (Centro Iberoamericano de la Biodiversidad). Universidad de Alicante (España)

<http://www.lib.berkeley.edu/EART/vegmaps.html>

Checklist of online vegetation and plant distribution maps

<http://www.compagniadelleforeste.it/>

Compagnia delle Foreste

<http://www.cbnmed.fr>

Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles

<http://www.cbn-alpin.org>

Conservatoire Botanique National Alpin de Gap-Charance

<http://www.cbnbrest.fr/>

Conservatoire Botanique National de Brest

http://inpn.mnhn.fr/cbnbp_new/

Conservatoire Botanique National Bassin Parisien

<http://www.cbnbl.org/>

Conservatoire Botanique National de Bailleul

<http://www.corpoforestale.it/wai/serviziattivita/CITES/index.html>

Convenzione di Washington C.I.T.E. S.

<http://www.corpoforestale.it/wai/index.html>

Corpo Forestale dello Stato

<http://www.dfsc.dk/>

Danida Forest Seed Centre

<http://botit.botany.wisc.edu/images/veg/>

Distribuzione di piante in base all'habitat

<http://www.bioplatform.info/>

European Platform for Biodiversity

<http://www.ecnc.nl/doc/ecnc/saxifrag/euroflor.html>

European Centre for Nature Conservation

<http://www.fs.fed.us/database/feis/>

Fire Effect Information System

<http://www.fao.org>

Food and agriculture organization of the United Nations

<http://forests.org/links/>

Forest Conservation Links

<http://www.forestscience.info>

Forest Science Database

<http://gemoplasma.arsia.toscana.it/Gemo/home.htm>

Il germoplasma della Toscana

<http://www.itis.usda.gov>

Integrated Taxonomic Information System

<http://www.ippc.int>

International Phytosanitary Portal (IPP): the official web site for the International Plant Protection Convention (IPPC)

<http://www.ipgri.org>

International Plant Genetic Resources Institute

<http://www.ipni.org/index.html>

International Plant Names Index

<http://seedtest.org/en/home.html>

International Seed Testing Association (ISTA)

<http://www.usd.edu/iss/>

International Society for Seed Science

<http://www.iucn.org/>

International Union for the Conservation of Nature (IUCN)

<http://www.botany.net/IDB/botany.html>

Internet Directory for Botany

<http://www.jardibotanic.pcn.es>

Jardí Botànic de Barcelona - Spain

<http://www.step.es/jardcan/>

Jardín Botánico Canario Viera y Clavijo - Spain

<http://www.jardinbotanicodecordoba.com/>

Jardín Botánico de Córdoba - Spain

<http://www.jardibotanicodesoller.org>

Jardí Botànic de Sóller – Spain

<http://www.jardibotanic.org>

Jardí Botànic de la Universitat de València - Spain

<http://www.jbotanicmarimurtra.org>

Jardí Botànic Marimurtra

<http://www.forgen.net/main/bds.asp>

Libro nazionale dei boschi da seme

<http://www.ecologie.gouv.fr>

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable

<http://www.mnhn.fr>

Muséum national d'Histoire naturelle

<http://www.nsl.fs.fed.us>

National Seed Laboratory (USA)

<http://www.nativeseeds.org/>

Native Seed/SEARCH – USA

<http://www.atl.cfs.nrcan.gc.ca/seedcentre/seed-center-e.htm>

National Tree Seed Centre (Canada)

<http://www.nativeplantnetwork.org/network/general.asp>

Native Plants Propagation Protocol Database

<http://www.nature.nps.gov/biology/endangeredspecies/>

Natural Parks Service, Endangered Species

<http://www.cof.orst.edu/coops/htc/ntc.htm>

Nursery Technology Cooperative

<http://plants.usda.gov/>

Plants database, USDA Natural Resources Conservation Service

<http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/>

Plant Species Life Form

http://www.ricercaforestale.it/riselvitalia/BIODIVERSITA/Riselvitalia1.1/sottoprogetto_1.1.htm

Progetto Riselvitalia, produzione materiale forestale di propagazione

<http://www.rjbalcala.com>

Real Jardín Botánico Juan Carlos I

<http://www.rjb.csic.es>

Real Jardín Botánico de Madrid – Spain

<http://www.rngr.net/>

Reforestation, Nursery and Genetic Resources

<http://www.reteortibotanicilombardia.it/>

Rete degli Orti Botanici della Lombardia

<http://www.rbgkew.org.uk>

Royal Botanic Gardens, Kew

<http://www.sanbi.org/products/seeds.htm>

Seed Room, Kirstenbosch National Botanical Garden Private Bag X7 CLAREMONT, Cape Town 7735 South Africa

<http://www.genmedoc.org/>

Sito ufficiale del Progetto Interreg III B “Genmedoc”: Création d’un réseau d’un centre de conservation du matériel génétique de la flore des régions méditerranéennes de l’espace MEDOCC

<http://www.granicoltura.it>

Stazione Sperimentale di Granicoltura per la Sicilia

<http://www.ensconet.com>

The “European Native Seed COnservation NETwork”

<http://www.nerium.net/plantaeuropa/main.htm>

The Global Strategy for Plant Conservation in Europe

<http://www.rngr.net/Publications/ttsm>

Tropical Tree Seed Manual

<http://www.seedcentre.nl/>

Wageningen Seed Centre

<http://www.calflora.org/index0.html>

Wild Plants in California

<http://www.nsl.fs.fed.us/wpsm/>

Woody Plant Seed Manual

<http://stort.unep-wcmc.org/imaps/gb2002/book/viewer.htm>

World Atlas of Biodiversity

<http://www.populus.it/xilo.php>

XILOGLOS - Glossario multilingue dei termini utilizzati in tecnologia del legno

<http://redlist.org>

2003 IUCN Red List of Threatened Species

<http://www.rbgkew.org.uk/data/sid>

FLYNN S., TURNER R. M. and DICKIE J. B., 2004 – Seed information Database (release 6.0, October 2004).

12.6. Revues scientifiques spécialisées

Crop Science

The Crop Science Society of America, Inc. Madison, WI. USA

<http://crop.scijournals.org/>

Journal of New Seeds

The Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. USA

<http://www.haworthpress.com/>

Native Plants Journal

USDA Forest Service, SRS

1221 South Main Street

Moscow, Idaho 83843–4211, USA

<http://www.nativeplantnetwork.org/journal/>

Plant Physiology

<http://www.plantphysiol.org>

Seed Abstracts

CAB International, Wallingford, UK

<http://www.cabi-publishing.org/>

Seed Info

Official Newsletter of the WANA Seed Network, ICARDA, Aleppo, Syria

<http://www.icarda.cgiar.org>

Seed Science and Technology

Proceedings of the International Seed Testing Association (ISTA)

<http://www.seedtest.org>

Seed Science Research

CAB International, Wallingford, UK

<http://www.cabi-publishing.org/>

<http://hort.cabweb.org/>

Seed Technology

Association of Seed Analysts, INC (AOSA). Las Cruces, NM. USA

<http://www.aosaseed.com/>

Seed Testing International

ISTA News Bulletin

<http://www.seedtest.org>

Semillero América Latina

Bollettino elettronico mensile pubblicato da New Forests Project, Washington DC 20003 USA

<http://www.newforestsproject.com>

Cryobiology

Society for Cryobiology

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/622814/description#description

Cryoletters

The Royal Veterinary College, Royal College Street, London NW1 0TU, UK

<http://www.cryoletters.org/>

13. FICHES ANNEXES

Pour l'élaboration des fiches annexées au volume, les oeuvres de référence suivantes ont été consultées : Albert *et al.* 2003; Badescu, 1997; Brullo *et al.*, 1996; Braun-Blanquet, 1951; CORINE 1993; Flynn *et al.*, 2004; Gardin *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 1998; IPGRI, 1982 e 1985a; ISTA, 2006; Marion *et George*, 2001, Martin, 1946; Martin *et Barkley*, 1961; Mossa *et al.*, 2004; Pinna, 1977; Pignatti, 1982; Pignatti, 1995; Raunkiaer, 1934; Rivas-Martínez *et al.*, 2002; Royal Botanic Gardens Kew; Soil Survey Staff - USDA, 1998; Thomsen *et Kiklev*, 2000; Ubaldi, 2003; Zangheri, 1942.

13.1 Récolte du matériel végétal

FICHE DE RECOLTE DU MATERIEL VEGETAL		ID progressif:	Date d'entrée:
N.	Taxon:		Opérateur:
Flore utilisée pour la détermination		Données de la population:	
Nom du collecteur/code:		Code Population:	
Organisme d'appartenance/code:		Pays: Région: Département:	
Programme :		Commune:	
Propriété du matériel:		Localité:	
Objectif de la récolte :		Propriété: Cartographie: " Y () ' ' "	
!_! Banque de semence ____ %		Appareil utilisé: Degrés de précision:	
!_! Semis ____ %		Alt.: moyenne (min max)	
!_! Autre: ____ % Spécifier _____		Inclinaison: moyenne (min max)	
Date et heure de la récolte :		Exposition: moyenne (de à)	
Temp. (T°C):	Humidité Relative (%):	Lithologie:	
P.atmosphérique (hPa-mbar)		Pierrosité (%) :	
Conditions météo:		Classif. pédologique:	
		Horizon: !_! Echantillon pH: ____	
		Drainage: 1 2 3 4 5 Cohésion: 1 2 3 4 5	
		Bioclima:	
		Thermotype:	
		Ombrotype:	
		Type de végétation:	
		Code Corine: Code Habitat:	
		Code SIC:	
Méthode d'échantillonnage:		Aire échantillonnée m2: Aire population m2:	
!_! Régulièrement réparti dans la station		Macropopulation !_! Dimensions (m2):	
!_! Au centre de la station		Nbre Micropopulations !_! Fiche relevé démographique: Oui Non	
!_! Le long d'une ligne transversale		Structure de la population:	
!_! En bordure de la station		!_! individu isolé (1)	
!_! Autre:		!_! petit groupe (2)	
		!_! groupe (3)	
		!_! colonie (4)	
		!_! peuplement (5)	
Nbre d'individus présents :		Cartographie: Oui Non	
1-5!_! 6-10!_! 11- 50!_! 51-100!_! 101-250!_! 251-500!_! 501-1000!_! 1001-2500!_! 2501-5000!_! 5001-10000!_! >10000!_!		Nbre de lot/sachets liés à cette fiche:	
Matériel prélevé:		Stade phénologique dominant	
!_! Semences !_! Bulbilles		!_! 000 sans fleur	
!_! Fruits !_! Bulbes		!_! +00 avec seulement des fleurs en boutons	
!_! Pollen !_! Rhizomes		!_! ++0 avec des fleurs en boutons et en anthèse	
!_! Spore !_! Tubercules		!_! +++ avec des fleurs en boutons, anthèses et fanées	
!_! Boutures !_! Autre:		!_! 0++ avec fleurs en anthèse et fanées	
Nbre de semences par fruit:		!_! 00+ avec seulement des fleurs fanées	
Nbre de semences par individu:		!_! 00+b avec fleurs fanées et baies non mures	
Nbre de graines récoltées par individu:		!_! 00+fr avec fleurs fanées et fruits immatures	
Nbre d'individu sur lesquels a été effectué la récolte		!_! 000b avec baies mûres	
% d'individus producteur de graines:		!_! 000fr avec fruits mûrs	
Récolte de: Plante !_! Sol !_!		!_! 000sd semences dispersées	
Etat des semences: Humides !_! Seches !_! Autre:		!_! autre:	
Nbre de semences pour le test de la coupe: % résultat positif:		Inflorescence ou fleur avec:	
Données morphométriques:		floraison simultanée !_!	
		floraison échelonnée !_!	
		!_! centripète	
		!_! centrale	
		!_! basale	
		!_! apicale	
Dissémination:		Type de matériel récolté:	
Autochorie !_! Barochorie !_! Anémochorie !_! Zoochorie !_! Hydrochorie !_! Balistochorie !_!		Echantillon d'herbier: Oui !_! Non !_!	
Polychorie !_! Autre !_!:		Plante en pot: Oui !_! Non !_!	
Protection légale:		Fruits pour test préalable: Oui !_! Non !_!	
Etat et mesures de conservation Actuelles		Mat. biologie moléc.: Oui !_! Non !_!	
Potentielles		Mat. caryologie: Oui !_! Non !_!	
Conditions phytosanitaires de la population: 1 2 3 4 5		Banque de semences du sol: Oui !_! Non !_!	
Etat de conservation de la population: 1 2 3 4 5		Autre:	
Risques et facteurs de menaces:			
Actuels			
Potentiels			
Pré-traitement:		Note:	
!_! Récolte manquée			
!_! Nécessité d'une nouvelle récolte			
!_! Nécessité d'une régénération pour détermination			

13.2 Relevé phénologique

FICHE DE RELEVÉ PHÉNOLOGIQUE		ID progressif:	Date d'entrée:
N.	Taxon:		Opérateur:
Observateur			Date:
			Numéro du jour calendaire
Données populationnelles et écologiques:			
Code Population:			
Pays:	Région:	Département:	Commune: Localité:
Feuille IGN: N ° " E ° ' "			
Appareil utilisé:		Précision des données:	
Alt.: moy	(min max)		
Inclina.: moy	(min max)	Esposit.: moy	(de à)
Lithologie:			
Pierrosité (%):			
Classif. pédologique:			
Horizon:	!_! Echant. pH: _____	Drainage: 1 2 3 4 5	Cohésion: 1 2 3 4 5
Bioclima:			
Thermotype:			
Ombrotype:			
Type de végétation:			
Code Corine:		Code Habitat:	
Type chorologique:			
DONNÉS BIOLOGIQUES			
Forme _____	Sous forme _____	!_! Monocarpique !_! Pluricarpique	
!_! Caducifolié		Etat du cycle végétatif:	
!_! Semicaducifolié		!_! INON	
!_! Persistant		!_! IOUI	
		Durée _____	
PHASE VEGETATIVE			
Bourgeons	!_! Absents !_! Présents	!_! Formés !_! Peu développés !_! Complètement formés	Couleur _____ Forme _____
		Largeur _____ Longueur _____	
		Structure/Dessin _____	
Pousses	!_! Absentes !_! Présentes	!_! rares !_! peu nombreuses !_! nombreuses	Taille moy _____ Taille min _____ Taille max _____
Feuilles	!_! Absentes !_! Présentes	!_! immatures !_! matures !_! senescentes	
FLORAISON			
!_! Absente !_! Présente		% individus fleuris _____	
!_! simultanée !_! échelonnée		!_! _____% +00 seulement fleurs en bouton !_! _____% ++0 fleurs en bouton et anthèse !_! _____% +++ fleurs en bouton, en anthèse et fanées !_! _____% 0++ fleurs en anthèses et fanées !_! _____% 00+ seulement fleurs fanées	
Ebauches florales	!_! Absentes !_! Présentes	!_! Stériles !_! Fertiles	
FRUCTIFICATION			
!_! Absente !_! Présente		!_! fleurs et fruits contemporains	
		!_! fruits immatures _____% !_! fruits mûrs _____% !_! fruits déhiscents _____%	
		!_! semences absentes !_! semences présentes	
		!_! vides !_! pleines	
Dissémination:		!_! Autochorie !_! Barochorie !_! Anémochorie !_! Zoochorie	
		!_! Hydrochorie !_! Balistochorie !_! Polychorie !_! Autre: _____	
Facteurs biotiques et abiotiques de perturbations/menaces:			
NOTE			

13.3 Relevé démographique

FICHE DE RELEVÉ DEMOGRAPHIQUE						ID progressif:	Date d'entrée:																																																																																																																																																																																
N.		Taxon:				Opérateur:																																																																																																																																																																																	
Code Population				Observateur:		Date																																																																																																																																																																																	
Données de la population: Pays: Région: Département: Commune: Localité: Propriété: Cartographie: X () ° ' " Y () ° ' " Appareil utilisé: Degrés de précision: Alt.: moyenne (min max) Inclinaison: moyenne (min max) Esposit.: moyenne (de à) Lithologie: Pierrosité (%): Classif. pédologique: Horizon: Echantillon !__! pH: Drainage: 1 2 3 4 5 Cohésion: 1 2 3 4 5 Bioclima: Thermotype: Ombrotype: Type de végétation: Code Corine: Code Habitat: Code SIC:						Coordonnées périmétrales: Point Coordonnées																																																																																																																																																																																	
Sup. population réelle _____ m2 Sup. population estimée _____ m2 Sup. population recensée _____ m2 Nbre individus estimés _____ Nbre individus réels _____ Densité réelle (individu/m2) _____ estimée (individu/m2) _____		Structure par âge Nbre plantules _____ Taux de natalité _____ Nbre juvéniles _____ Nbre adultes _____ Nbre mâles _____ Nbre femelles _____ Nbre morts _____ Taux de mortalité _____ cause _____		Distribution spatiale !__! punctiforme !__! linéaire !__! uniforme !__! non uniforme !__! spatiale !__! uniforme !__! non uniforme																																																																																																																																																																																			
Nbre fleurs Nbre fruits Nbre de semences		Echantillon d'herbier !__! Oui !__! Non Collecteur: _____ Herb.: _____																																																																																																																																																																																					
Micropopulations <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>X () ° ' "</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Y () ° ' "</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Superficie réelle</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Lithologie</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Alt (de-à)</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Inclinaison moy</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Exposition moy</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Nbre plantules</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Nbre juvéniles</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Nbre adultes</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Nbre morts</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Nbre tot indiv.</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Nbre fleurs</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Nbre fruits</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Nbre semences</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>									1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	X () ° ' "											Y () ° ' "											Superficie réelle											Lithologie											Alt (de-à)											Inclinaison moy											Exposition moy											Nbre plantules											Nbre juvéniles											Nbre adultes											Nbre morts											Nbre tot indiv.											Nbre fleurs											Nbre fruits											Nbre semences										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10																																																																																																																																																																													
X () ° ' "																																																																																																																																																																																							
Y () ° ' "																																																																																																																																																																																							
Superficie réelle																																																																																																																																																																																							
Lithologie																																																																																																																																																																																							
Alt (de-à)																																																																																																																																																																																							
Inclinaison moy																																																																																																																																																																																							
Exposition moy																																																																																																																																																																																							
Nbre plantules																																																																																																																																																																																							
Nbre juvéniles																																																																																																																																																																																							
Nbre adultes																																																																																																																																																																																							
Nbre morts																																																																																																																																																																																							
Nbre tot indiv.																																																																																																																																																																																							
Nbre fleurs																																																																																																																																																																																							
Nbre fruits																																																																																																																																																																																							
Nbre semences																																																																																																																																																																																							
Autres taxa présents		Faune associée																																																																																																																																																																																					
Risques et facteurs de menace																																																																																																																																																																																							
Actuels																																																																																																																																																																																							
Potentiels																																																																																																																																																																																							
				Echelle: = _____ m Photo(s) de l'aire OUI !__! NON !__!																																																																																																																																																																																			
Note																																																																																																																																																																																							

13.4 Relevé floristique et sociologique

FICHE DE RELEVÉ FLORISTICO-SOCIOLOGIQUE		ID progressif:	Date d'entrée:		
Code population:		Opérateur:			
Observateur:		Date:			
Relevé n°					
Coordonnées	N				
	E				
Quota (m s.l.m.)					
Exposition (°)					
Inclinaison (°)					
Lithologie					
Pierrosité (%)					
Cohésion (1-5)					
Drainage (1-5)					
Sup. relevé (m2)					
Couverture (%)					
Couverture lichénico-muscinale (%)					
Hauteur Moy végétation (m)					
Diamètre maximum des troncs (m)					
Type de végétation					

					Liste Floristique	N°ACC/ RELEV	N°

13.5 Etude de la faune associée

FICHE DE RELEVÉ DE LA FAUNE ASSOCIÉE		Données population :						Dissemination Zoochore	
ID programme :	Code Population: _____							Myrmémochorie	
Date d'entrée:	Code Région: _____							Métochorie	
N°	Taxon :	Département: _____		Commune: _____		Localité: _____		Saurochorie	
		X () * . Y () * . *		Degrés de précipitation: _____				Ornithochorie	
Date:	Observateur	Alt: _____		E exposition: moy (de à)				Mammalochorie	
		Indications: moy						Endozochorie	
		Lithologie: _____		Drainage: 1 2 3 4 5		Cobésion: 1 2 3 4 5		Stizochorie	
		Teneur en humidité (%): _____		Thermotype: _____		Code SIC: _____		Epi-zochorie	
		Horizon: _____		Code Habitat: _____					
		Type de végétation: _____							
		Code Corine: _____							

N°	Taxa animal associé	Heure	Quantité	Partie de la plante concernée	Comportement - Action sur la plante	Effets sur la plante	Photo ou échantillon	Type de relation

Note:

13.6 Etude climatique et météorologique

FICHE METEO-CLIMATOLOGIQUE		ID progressif:	Date d'entrée:
N.	Taxon:	Opérateur:	
Observateur:		Date:	
Données population: Code Population: Pays: Région: Département: Commune: Localité: Feuille IGN: N ° ' " E ° ' "			
Appareil utilisé: Précision des données: Alt.: moy (min max) Inclinaison: moy (min max) Exposition: moy (de à) Lithologie: Pierrosité (%) : Classif. pédologique: Horizon: !_! Echant.pH: ____ Drainage: 1 2 3 4 5 Cohésion: 1 2 3 4 5 Bioclima: Thermotype: Ombrotype: Type de végétation: Code Corine: Code Habitat:			
Calcul de l'insolation relative		Calcul du cône d'ombre	
Aire du relevé (m2)			
Hauteur de la mesure depuis le sol (m)			
Hauteur moyenne de la végétation (m)			
Observations:			
Température (°C)	Pression atmosphérique (hPa - mbar)	Humidité relative (%)	
Vents Direction dominante _____ Vitesse moyenne _____			
Conditions météo			
Disponibilité de l'eau dans la station		Etat hygroscopique de l'horizon superficiel du sol	
!_! Glace Quantité: cm: _____ !_! Grêle cm: _____ !_! Givre cm: _____ !_! Neige cm: _____ !_! Rosée !_! Pluie cm: _____		!_! Mouillé !_! Humide !_! Sec !_! Déséché Note:	

13.8 Test initial

FICHE TEST INITIAL		ID progressif:	Date d'entrée:
N.	Taxon		Opérateur:

Date	Précision de la pesée		
Nombre total de fruits	Poids frais de l'accession		g
Etat des fruits	Type de fruit		

POIDS DES FRUITS			
	X: Réplique (nbre fruits)	A: Poids tot (g)	B: Poids moyen des fruits par réplique
1			
2			
3			
4			
Poids moyen des fruits			
Nombre de fruits par Kg			
Note			

VOLUME DES FRUITS		
	A: Réplique (nbre de fruits dans 100 ml)	B: nbre de fruits par litre
1		
2		
3		
4		
Volume des fruits		
Procédure		
Note		

SEMENCES PAR FRUIT					
	X: Réplique (nbre fruits)	A: nbre fruits vides	B: nbre de semences	C: nbre moyen de semences par fruit	Note
1					
2					
3					
4					
Nbre moyen de semences par fruit					
Nbre de semences par Kg de fruits					
Pourcentage de fruits vides					

POIDS FRAIS DES SEMENCES			
	X: Réplique (nbre semences)	A: Poids tot. (g)	B: Poids moyen de semences par réplique
1			
2			
3			
4			
Poids frais moyen des semences			
Note			

Observations

Responsable:

13.9 Nettoyage et conservation du matériel végétal – A

FICHE DE NETTOYAGE ET DE CONSERVATION DU MATERIEL VEGETAL		ID progressif:	Date d'entrée:	
N.	Taxon	Opérateur:		
Précautions à prendre pour la manipulation du matériel:			Nbre de semences pour le test de coupe: % résultat positif:	
Catégorie de réponse à la conservation		<input type="checkbox"/> ! Orthodoxe <input type="checkbox"/> ! Intermédiaire <input type="checkbox"/> ! Récalcitrante		Source:
Test initial:				
Poids du fruit: Poids moyen: _____g Nbre fruits/Kg: _____		Volume du fruit Nbre moyen fruits/litre: _____		Nbre moyen de semences par fruit: _____ Nbre de fruits comptés: _____ Poids moyen semences fraîches: _____g Poids frais total: _____g
Premier nettoyage (fruits charnus): <input type="checkbox"/> ! Manuel <input type="checkbox"/> ! Mécanique <input type="checkbox"/> ! Chimique Date: ___/___/___			Quarantaine: Date initiale: ___/___/___	
Traitements:			T. ambiante (15-20°C) _____ °C Humidité relative: ≤60% _____ % Note: _____	
Postmaturation:		Essai de germination en cours:		
Date initiale ___/___/___ Date finale ___/___/___ Durée: _____ J T. ambiante (15-20°C) _____ °C Humidité r.: ≤40% _____ %		<input type="checkbox"/> ! OUI Date initiale ___/___/___ Date finale ___/___/___ % de germination: _____ % <input type="checkbox"/> ! NON Motif: _____ _____ _____ _____ _____		
Nettoyage: <input type="checkbox"/> ! Manuel <input type="checkbox"/> ! Mécanique <input type="checkbox"/> ! Chimique Date ___/___/___		Contenu en huile: _____ %	Contenu en protéine: _____ %	MC initiale: _____ %
Traitements:		source: _____	source: _____	Méthode: _____
Poids moyen des semences (mg)		Essai de tenue du contenant et de son joint :		
Poids total de l'accession (g)		Date initiale ___/___/___ Type de contenant: _____		
Nbre de semences nettoyées		Date finale ___/___/___ Type de joint: _____		
Diamètre moyen (mm):		Conditions: _____		
		Température: _____ °C		
		Humidité: _____ %		
		Résultats: _____		
Echantillon produit:				
Code échantillon	Date de fermeture	Essai de tenue	Date stockage	Localisation:
				Tests qualitatifs exécutés:
				Vitalité:
				<input type="checkbox"/> ! Test de germination (TG)
				<input type="checkbox"/> ! Test au tétrazolium (TTC)
				<input type="checkbox"/> ! Test de conductibilité (PC)
				<input type="checkbox"/> ! Test avec le diacétate de fluoresceïne (PDF)
				<input type="checkbox"/> ! Indigo Carmin (IC)
				<input type="checkbox"/> ! Résonance magnétique (RM)
				<input type="checkbox"/> ! Rayons X (RX)
				<input type="checkbox"/> ! Autre (AA):
				<input type="checkbox"/> ! Vigueur et Performance (VP):
Note:				
Responsable:				

Nettoyage et conservation du matériel végétal – B

OBSERVATION DE L'ECHANTILLON :		
Téguments		
Albumen		
Embryon		
Cotylédons		
TEST SUIVANTS:		
CODE	DATE	RESULTATS ET OBSERVATIONS
PHOTO		

13.10 Suivi de la déshydratation

FICHE DU SUIVI DE DESHYDRATATION		ID progressif:	Date d'entrée:	Opérateur:
N°	Taxon		Localisation	
Date initiale		Date finale		

CALCUL DE L'HUMIDITE INTERNE INITIALE DES SEMENCES (mc %)

Date Contenu en huile %

Méthode

X poids des semences fraîches en g
A poids souhaité (tare) en g
B poids des semences fraîches + poids souhaité en g
C poids des semences déshydratées + poids souhaité en g
D mc % sur le poids frais initial des semences:
E Calcul automatique
F Temps (min)

	X	A	B	C	D	E	F
1							
2							
3							
4(n)							

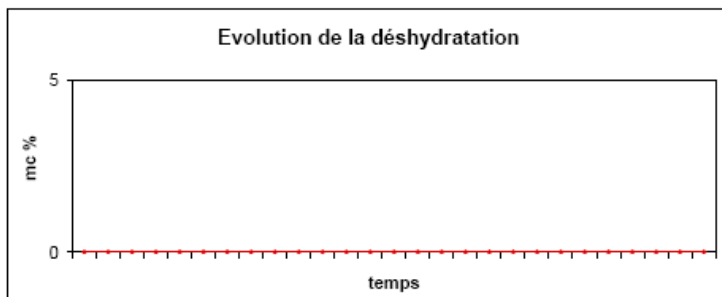
mc % moyen des semences

CALCUL DU POIDS SOUHAITE

mc initial % POIDS INITIAL g
mc final % POIDS SOUHAITE g

SUIVI DU POIDS

Date	Poids (g)	mc%	T (°C)	h. r. (%)



COMPTAGE INITIAL

Nbre semences	Poids	Poids/Nbre semences
Poids moyen des semences		
Poids total de l'accession		
Nombre de semences		

COMPTAGE FINAL

Nbre semences	Poids	Poids/Nbre semences
Poids moyen des semences déshydratées		
Poids total de l'accession		
Nombre de semences		

NOTE

Responsable:

13.11 Test de germination - A

FICHE TEST DE GERMINATION													ID progressif:				Date d'entrée:	
N.			Taxon										Opérateur:					
Code test de germination:								Date initiale et finale du test:										
Périodicité test: ____ ans prochain test: ____/____/____								du ____/____/____ au ____/____/____										
Origine du matériel: !__! T amb. (T °C) ____ !__! Chambre froide (T °C) ____ !__! congélation (T °C) ____																		
!__! Autre _____												Date de récolte:						
Type de matériel végétal																		
Pré-traitement	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Pre-chilling (T°C)																		
Pre-chilling (J)																		
Test en condition stérile !__!					Méthode:													
Conditions de germination	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
Nbre semences par réplique:																		
Température (°C) :																		
Humidité (%) :																		
Photopériode (h) :																		
Papier filtre																		
Agar:																		
GA3 (ppm):																		
KNO3 (%)																		
Observation et évolution de la germination																		
Date	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
GERMEES																		
IMBIBEES																		
NON IMBIBEES																		
MORTES																		
AUTRE CATEGORIE																		
vide																		
contaminée																		
% DE GERMINATION																		
% MOYEN DE GERMINATION						DELAI DE GERMINATION (J)					T50 (J)							
Responsable:																		

13.12 Test colorimétrique

FICHE DE TEST COLORIMÉTRIQUE (ITC)		ID progressif:	Date d'entrée:	Opérateur:
N.	Taxon			
Code de référence du test de germination:		Date initiale et finale de l'épreuve: du ____/____/____ au ____/____/____		
Préparation du test				
Origine des semences:				
Réplique				
Nbre de semences par réplique (n):				
Concentration (%):				
Température (°C):				
Temps (min):				
Type de coupe:				
Observations				
Axe embryonnaire				
Cotylédons				
Albumen				
Téguments				
% semences viables				
Évaluation:				
Note:				
Responsable:				

13.14 Gestion des semis

FICHE DE GESTION DES SEMIS		ID progressif:	Date d'entrée:
N.	Taxon	Code du semis	Opérateur:
	ETAPE DU PRE-TRAITEMENT	ETAPE DU REPIQUAGE	ETAPE DE CROISSANCE
Nombre de semences ou poids (g)	ETAPE DU SEMIS	Date initiale	Date initiale
Date initiale/finale	Date du semis	Date finale	Nombre de plantes
Type de prétraitement	Date du début de l'émergence des plantules	Nombre de plantules repiquées	Conditions
	Conditions	Conditions	Autres
	Substrat	Substrat	
	Conteneur	Conteneur	
	Température et humidité	Température et humidité	
	Autres	Autres	
Responsable du prétraitement	Localisation	Localisation	Localisation
	Responsable du semis	Responsable du repiquage	Responsable de l'étape de la croissance
Date	Contrôle/traitements		
Observations			
Compte final et date			

14. BIBLIOGRAPHIE

- ALBERT M.J., BAÑARES Á., DE LA CRUZ M., DOMÍNGUEZ F., ESCUDERO A., IRIONDO J.M., GARCÍA M.B., GUZMÁN D., MARRERO M., MORENO J.C., SAINZ H., TAPIA F., TORRES E., 2003 - Manual de Metodología de Trabajo Corológico y Demográfico. Versión 4.2. In: BAÑARES Á., BLANCA G., GÜEMES J., MORENO J.C., ORTIZ S., (eds.) 2003 – Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculare Amenazada de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid, 1069 pp.
- ARONNE G., WILCOCK C.C., 1994 - First evidence of myrmecochory in fleshy – fruited shrubs of the mediterranean region. *New Phytol.*, 127: 78 1-788.
- ARRIGONI O., 1974 - Elementi di biologia vegetale. CEA, Milano.
- ATICI Ö., NALBANTOGLU B., 2003 - Antifreeze proteins in higher plants. *PHYTOCHEMISTRY*, 64: 1187-1196.
- BACCHETTA G., 2006 – Conservare la natura. In: TAFFETANI F. (eds.), 2006 – Manuale sugli erbari. Edagricole, Bologna, in press.
- BADESCU V., 1997 - Verification of some very simple clear and cloudy sky models to evaluate global solar irradiance. *Solar Energy*, 61(4): 25 1-264.
- BAÑARES A., BLANCA G., GÜEMES J., MORENO J.C., ORTIZ S., 2003 - Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España: táxones prioritarios. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Ministerio de Medio Ambiente, Madrid. 1070 pp.
- BARNABAS B., RAJKI E., 1981 - Fertility of deep-frozen maize (*Zea mays* L.) pollen. *Ann. Bot.*, 48: 861-864.
- BASKIN C.C., BASKIN J.M., 1998 – Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, San Diego, USA.
- BASKIN C.C., BASKIN J.M., 2003 - When breaking dormancy is a problem. Try a move-along experiment. *Native Plants Journal*, 4(1): 17-21.
- BEATTIE A.J., LYONS N., 1975 - Seed dispersal in *Viola* (*Violaceae*): adaptations and strategies. *Am. J. Bot.*, 62: 714–722.
- BEDINI G., ROSSI G., BONOMI C., 2005 – RIBES, la Rete Italiana di Banche del gemoplasma per la conservazione *Ex Situ* della flora spontanea. *Inform. Bot. Ital.*, 37 (1 parte a): 114-115.
- BEGON M., HARPER J.L., TOWNSEND C.R., 1989 – Ecologia: individui, popolazioni, comunità. Zanichelli, Bologna.
- BENSON E.E., 1999 - Cryopreservation. In: BENSON E.E. (ed.), 1999 - Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis, Ltd..
- BENSON E.E., KRISHNAPILLAY B., MARZALINA M., 1996 - The potential of biotechnology in the in vitro conservation of Malaysian forest gemplasm: an integrated approach. In: NORHARA H., BACON P.S., KHOO K.C. (eds.), 1996 - Proceedings of the 3rd conference on Forestry and Forest Products Research, FRIM, 1: 76-90.
- BERJAK P., PAMMENTER N.W., 2002 – Orthodox and recalcitrant seeds. In: VOZZO (ed.). Tropical tree seed manual. USDA Forest Service. Agriculture Handbook.

- BERJAK P., WALKER M., MYCOCK D.J., WESLEY-SMITH J., WATT M.P., PAMMENTER N.W., 2000 - Cryopreservation of recalcitrant zygotic embryos. In: ENGELMANN F., TAKAGI H. (eds.), 2000 - Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm. IPGRI, Rome.
- BESNIER F., 1989 - *Semillas, Biología y Tecnología*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- BIANCHINI M., PACINI E., 1996 - The caruncle of *Ricinus communis* L. (castor bean): its development and role in seed dehydration, rehydration and germination. *Int. J. Plant Sci.*, 40: 40-48.
- BISOFFI S., CAGELLI L., VIETTO L., 1999 - Risorse genetiche di pioppo per la conservazione e il miglioramento genetico. Atti Workshop S.I.S.E.F. 'Analisi e conservazione delle risorse genetiche forestali italiane', Roma 14 Dicembre 1998.
- BLACK M., PRITCHARD H.W. (eds.), 2002 - Dessication and survival in plants, drying without dying. CABI Publishing, Oxon, UK.
- BRAUN-BLANQUET J., 1951 - Pflanzensoziologie. Grundzüge der vegetationskunde. Springer-Verlag, Wien.
- BREWBACKER J.L., KWACK B.H., 1963 - The essential role of Calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *Am. J. Bot.*, 50: 859-864.
- BROWN A.H.D., MARSHALL D.R., 1995 - A basic sampling strategy: theory and practice. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon, UK.
- BRULLO S., GRILLO M., GUGLIELMO A., 1996 - Considerazioni fitogeografiche sulla Flora Iblea. *Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat.*, 29: 45-111.
- BULGARINI F., ARDUINO S., TEOFILI C., 2003 - ERC (Ecoregional Conservation) Il processo di Conservazione Ecoregionale e la sua applicazione in Italia. WWF Italia.
- BURGARELLA C., LORA GONZALEZ A., FICI S., 2004 - Conservation of genetic diversity in artificially regenerated holm oak (*Quercus ilex* L) populations. In: *Proceedings of the 4th European Conference on the Conservation of Wild Plants: A workshop on the implementation of the Global Strategy for Plant Conservation in Europe*. Valencia (Spain) 17-20th September 2004.
- CAGELLI L., 1997 - Guidelines for seed and pollen storage. In: TUTOK J., LEFÉVRE F., DE VRIES S., TOTH B. (eds.), 1997 - *Populus nigra* Network Report of the Third *Populus nigra* Network meeting, Sàrvàr, Hungary, 5-7 October 1996. IPGRI, Rome.
- CAGELLI L., 1998 - Il Pioppo nero (*Populus nigra* L.). *Sherwood - Foreste ed Alberi Oggi*, 4-37: 43-47.
- CANULLO R., FALIŃSKA K., 2003 - Ecologia vegetale. La struttura gerarchica della vegetazione. Liguori Editore, Napoli.
- CAPPELLETTI C., 1975 - Botanica, 1. UTET, Torino.
- CASTAGNA R., MONTELEONE I., FERRAZZINI C., CALVO E., BELLETTI P., 2005 - Seme di farnia ad elevato valore genetico. *Sherwood*, 111: 5-9.
- CERABOLINI B., CERIANI R.M., CACCIANIGA M., DE ANDREIS R., RAIMONDI B., 2003 - Seed size, shape and persistence in soil: a test on Italian flora from Alps to Mediterranean coasts. *Seed Sci. Res.*, 13: 75-85.
- CERCEAU M.T., CHALLE J., 1986 - Biopalynologie and maintenance of germination capacity of stored pollen in some angiosperm families. In: BLACKMERE S., FERGUSON I.K. (eds.), 1986 - Linnean Society Symposium Series, 12: 151-164.

- CERVELLI C. (ed.), 2005 – Le specie arbustive della macchia mediterranea, un patrimonio da valorizzare. Collana Sicilia Foreste n. 26, Regione Siciliana, Agrigento. 222 pp.
- CÔME D., 1970 – Les obstacles à la germination. Masson & CIE, Paris.
- CÔME D., CORBINEAU F., 1992 – Les semences et le froid. In: COME D., 1992 - Les végétaux et le froid. Hermann Editeur des sciences et des arts, Paris.
- COMUNITÀ ECONOMICA EUROPEA, 1982. Decisione 82/72/CEE del Consiglio, del 3 dicembre 1981, concernente la conclusione della Convenzione relativa alla conservazione della vita selvatica e dell'ambiente naturale in Europa (Convenzione di Berna). Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee L. 38, 10.02.1982.
- COMUNITÀ EUROPEA, 2001. Regolamento (CE) n. 1808/2001 della Commissione del 30.08.2001 recante modalità d'applicazione del regolamento (CE) n. 338/97 del Consiglio, relativo alla protezione di specie della flora e della fauna selvatiche mediante il controllo del loro commercio. Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee L. 250, 19.9.2001.
- CONTI F., ABATE G., ALESSANDRINI A., BLASI C. (eds.), 2005 – An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. Palombi Editori, Roma.
- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1992 - Libro rosso delle piante d'Italia. Associazione italiana per il World Wildlife Fund, Roma.
- CONTI F., MANZI A., PEDROTTI F., 1997 - Liste rosse regionali delle piante d'Italia. Dipartimento di Botanica ed Ecologia, Università degli Studi di Camerino, Camerino.
- COOLBEAR P., GRIERSON D., HEYDECKER W., 1980 – Osmotic pre-sowing treatments and nucleic acid accumulation in tomato seeds (*Lycopersicon lycopersicum*). Seed Sci. and Technol., 8: 289-303.
- CORINE 1993: CORINE land cover, technical guide. European Commission.
- COUR P., LOUBLIER Y., 1980 - Contrôle d'identité et de pureté des lots de pollens destinés à la préparation d'extraits allergéniques à usage diagnostique ou thérapeutique. Rev. Franc. Allergol., 20: 197-201.
- CROSTI R., LADD P.G., DIXON K.W., PIOTTO B., 2006 – Post-fire germination: The effect of smoke on seed of selected species from the central Mediterranean basin. Forest Ecology and Management, 221: 306-312.
- DAFNI A., PACINI E., NEPI M., 2004 - Pollen and stigma biology. In: DAFNI A., KEVAN P. (eds.), 2004 - Methods in Pollination Ecology. Enviroquest, Cambridge, Canada.
- DE LIÑÁN C., 2004 – Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. 20ª edición. Ediciones Agrotécnicas, S.L. Madrid.
- DE MONTMOLLIN B., STRAHM W. (eds.), 2005 - The Top 50 Mediterranean Island Plants: Wild plants at the brink of extinction, and what is needed to save them. IUCN/SSC Mediterranean Islands Plant Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- DICKIE J.B., PRITCHARD H.W., 2002 – Systematic and evolutionary aspects of desiccation tolerance in seeds. In: BLACK M., PRITCHARD H.W. (eds.), 2002 – Desiccation and survival in plants, drying without dying. CABI Publishing, Oxon, UK.
- DON R., 2003 – ISTA Handbook on seedling evaluation, 3rd Edition. ISTA. Bassersdorf, Switzerland.

- DUCCI F., 2003 - Criteri ed indirizzi per la raccolta del materiale forestale di propagazione. In: AA.VV., 2003 - Biodiversità e vivaistica forestale – Aspetti normativi, scientifici e tecnici, Manuali e linee guida APAT, 18: 38-48.
- DUCCI F., MALTONI A., TANI A., 2001 - La raccolta del seme di specie forestali. *Sherwood*, 70: 57-62.
- ELLIS R.H., 1988 – The viability equation, seed viability nomographs, and practical advice of on seed storage. *Seed Science and Technology*, 16: 29-50.
- ELLIS R.H., ROBERTS E.H., 1980 – Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45: 13-30.
- ELLIS R.H., ROBERTS E.H., 1981 – An investigation into the possible effects of ripeness and repeated threshing on barley seed longevity under six different storage environments. *Annals of Botany*, 48: 93-96.
- ENGELMANN F., 2004 - Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 40: 427-433.
- EUROPEAN COMMISSION DG ENVIRONMENT Nature and Biodiversity, 2003 – Interpretation Manual of European Union Habitats – EUR25.
- EUROPEAN COMMUNITIES, 1992 - Council Directive 92/43 EEC of 22.7.92. Official Journal of the European Communities, L 206/7.
- FABRE J., DEREUDDRE J., 1990 - Encapsulation-dehydration: A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot tips. *Cryo Letters*, 11: 413-426.
- FAGUNDEZ J., IZCO J., 2003 – Seed morphology of *Erica* L. Sect. *Callicodon* Benth. Taxonomic implications. *Plant Biosystems*, 137(1): 111-116.
- FAO, 1995 - Collecting woody perennials. In: *Collecting Plant Genetic Diversity. Technical Guidelines*. CAB International, Wallingford, UK.
- FAO, 2001 - International Standards for Phytosanitary Measures Publication No. 12: Guidelines for phytosanitary certificates. FAO, Roma.
- FAO/IPGRI, 1994 - Genebanks standards. FAO/IPGRI, Roma.
- FENNER M., THOMPSON K., 2005 – The Ecology of seeds. Cambridge University Press. Cambridge, U.K.
- FERRARI C., 2001 – Biodiversità dall'analisi alla gestione. Zanichelli Editore, Bologna.
- FLYNN S., TURNER R.M., DICKIE J.B., 2004 – Seed information Database (release 6.0, October 2004)
- FONT QUER P., 1993 - Diccionario de Botánica. Editorial Labor, S.A. - Escoles Pies, Barcelona.
- FRANCHI G.G., BELLANI L., NEPI M., PACINI E., 1996 - Types of carbohydrate reserves in pollen: localization, systematic distribution and ecophysiological significance. *Flora*, 191:143-159.
- FRANCHI G.G., NEPI M., PACINI E., 2002 - Partially hydrated pollen: taxonomic distribution, ecological and evolutive significance. *Plant Syst. Evol.*, 234: 211-227.
- FRANKEL O.H., BROWN A.H.D., BURDON J.J., 1995 – The conservation of plant biodiversity. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRISON E.A., JACKSON G.V.H., 1995 – Plant health and gemplasm collectors - Collecting Plant Genetic Diversity. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon. UK.
- FRISON G., 1996 – Propagazione del pioppo. Edizioni L'Informatore Agrario, Verona.

- FU J.R., XIA Q.H., TANG L.F., 1993 - Effects of desiccation on excised embryonic axis of three recalcitrant seeds and studies on cryopreservation. *Seed Sci. Tech.*, 21: 85-95.
- GARCÍA M.A., 2002 - Interés de los estudios demográficos en la conservación. Catalogación de especies amenazadas. In: *Biología de la conservación de plantas amenazadas*. Organismo Autónomo Parques Nacionales, Madrid.
- GARDIN L., COSTANTINI E.A.C. NAPOLI R. (eds.), 2002 – Guida alla descrizione dei suoli in campagna e alla definizione delle loro qualità. ISSDS, Firenze.
- GEROLA F.G., 1997 - *Biologia vegetale - Sistematica filogenetica*. UTET, Torino.
- GEROLA F.M. (ed.), 1995 - *Biologia e diversità dei vegetali*. UTET, Torino.
- GÓMEZ-CAMPO C., 2001 – La práctica de la conservación de semillas a largo plazo. In: GÓMEZCAMPO C. (ed.), 2001 - *Conservación de especies vegetales amenazadas en la región mediterránea occidental*. Centro de estudios Ramon Areces, Madrid, Spain.
- GÓMEZ-POMPA A., 1987 - On Maya silviculture. *Mexican Studies*, 3(1): 1-17.
- GONZÁLEZ-BENITO M.E., 1998 - Cryopreservation as a tool for preserving genetic variability : its use with Spanish wild species with possible landscaping value. *Acta Hort.*, 457: 133-142.
- GORIAN F., 2001 – La lavorazione disementi di alberi e arbusti. In: PIOTTO B., DI NOI A. (eds.) *Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea*. ANPA Roma.
- GRAUDAL L., KJAER E.D., CANGER S., 1995 - A systematic approach to the conservation of genetic resources of trees and shrubs in Denmark. *Forest Ecology and Management*, 73: 117-134.
- GRIFFITH M., YAISH M.W.F., 2004 - Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in Plant Science*, 9: 399-405.
- GROSS K.L., 1990 – A comparison of methods for estimating seed number in the soil. *J. Ecol.*, 78: 1079-1093.
- GUDIN S., ARENE L., CHAVAGNAT A., 1992 – Relation entre imbibition, densité, taux de remplissage et faculté germinative chez l'akène de *Rosa hybrida* L. *Agronomie*, 12: 123-126.
- HARTMANN H.T., KESTER D.E., 1983. - *Plant propagation: principles and practices*, 4th Edition. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
- HARTMANN H.T., KESTER D.E., 1990 - *Propagazione delle piante*. Edagricole, Bologna.
- HARVENGT L., MEIER-DINKEL A., DUMAS E., COLLIN E., 2004 – Establishment of a cryopreserved gene bank of European elms. *Canadian Journal of Forest Research*, 34:43-55.
- HENDRIX S.D., 1984 – Variation in seed weight and its effects on germination in *Pastinaca sativa* L. (*Umbelliferae*). *American Journal of Botany*, 71: 795–802.
- HERNÁNDEZ BERMEJO J.E., HERRERA MOLINA F., 2005 – REDBAG: the Spanish Network of genebanks for wild plants. *BGjournal*, 2(2): 18-20.
- HESLOP-HARRISON J.S., HESLOP-HARRISON Y., SHIVANNA K.R., 1984 - The evaluation of pollen quality and further appraisal of the fluorochromatic (FCR) test procedure. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 367-375.
- HEYWOOD V.H. (ed.), 1995 - *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- HIRANO T., GODO T., MII M., ISHIKAWA K., 2005 - Cryopreservation of immature seeds of *Bletilla striata* by vitrification. *Plant Cell Reports*, 23: 534-539.
- HOEKSTRA F.A., 1995 - Collecting pollen for genetic resources conservation. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - *Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines*. CABI. Wallingford, Oxon, UK.
- HONG T.D., ELLIS R.H., 1996 - A protocol to determine seed storage behaviour. IPGRI Technical Bulletin No. 1. (ENGELS J.M.M., TOLL J., vol. eds.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- HONG T.D., LININGTON S., ELLIS R.H., 1998 - Compendium of information on seed storage behaviour, I: A-H. Royal Botanic Gardens, Kew.
- HULME P.E., 1994 - Post-dispersal seed predation in grassland - Its magnitude and sources of variation. *J. Ecol.*, 82: 645-652.
- HULME P.E., 1998 - Post-dispersal seed predation: consequence for plant demography and evolution. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.*, 1: 32-46.
- IBPGR, 1982 - The design of seed storage facilities for genetic conservation. *Handbooks for genebanks: n. 1*. Revised 1985 and 1990. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- IBPGR, 1985a - Handbook of seed technology for genebanks. Vol. I. Principles and Methodology. *Handbooks for genebanks: n. 2*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- IBPGR, 1985b - Handbook of seed technology for genebanks. Vol. II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. *Handbooks for genebanks: n. 3*. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- ISTA, 2004 - International rules for seed testing. Edition 2004. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.
- ISTA, 2006 - International rules for seed testing. Edition 2006. The International Seed Testing Association (ISTA), Bassersdorf, CH-Switzerland.
- IUCN, 1994 - IUCN Red List Categories. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- IUCN, 2001 - IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- IUCN, 2003 a - Guidelines for Using the IUCN Red List Categories and Criteria. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- IUCN, 2003b - Guidelines for Application of IUCN Red List Criteria at Regional Levels: Version 3.0. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland and Cambridge.
- JIMENEZ R., CABALLERO M., 1990 - El cultivo industrial de plantas en maceta. Ediciones de Horticultura SL. Reus.
- JONES S., GOSLING P., 1994 - Target moisture content prechill overcomes the dormancy of the temperate conifer seeds. *New Forests*, 8: 309-321.
- KOO B., PARDEY P., WRIGHT B., 2004 - Saving seeds. IPGRI and IFPRI. CABI Publishing, Wallingford, UK. P. 1.
- LAHIRI A.N., KHARABANDA B.C., 1961 - Dimorphic seeds in some arid zone grasses and the significance of growth differences in their seedlings. *Sci. and Cult.*, 27(9): 448-450.
- LAMBARDI M., 2002 - Biotechnology in agriculture and forestry, 50. In: TOWILL L.E., BAJAJ Y.P.S. (eds.), 2002 - *Cryopreservation of Plant germplasm II*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- LANDIS T., LUCCI S., PIOTTO B., 2004 - Propagazione delle *Salicaceae*, conservazione della biodiversità nel ripristino ambientale. *Sherwood*, 88: 31-33.
- LECK M.A., 1989 - Wetland seed banks. In: LECK M.A., PARKER V.T., SIMPSON R.L. (eds.), 1989 - Ecology of Soil Seed Bank. Academic Press, San Diego.
- LEE T.D., 1988 - Patterns of fruit and seed production. In: LOVETT DOUST J., LOVETT DOUST L. (eds.), 1988 - Plant reproductive ecology: patterns and strategies. Oxford University Press, New York.
- LÉFÈVRE F., BARSOUM N., HEINZE B., KAJBA D., ROTACH P., DE VRIES S.M.G., TUROK J., 2001 - *In situ* conservation of *Populus nigra*. IPGRI, International Plant Genetic Resources, Rome.
- LININGTON S.H., 2003 - The Design of Seed Banks. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W., PROBERT R.J. (eds.), 2003 - Seed Conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LISCI M., BIANCHINI E., PACINI E., 1996 - Structure of the elaiosome in some angiosperm species. *Flora*, 191: 131-141.
- LISCI M., PACINI E., 1997 - Fruit and seed structural characteristics and seed dispersal in *Mercurialis annua* L. (*Euphorbiaceae*). *Acta Soc. Bot. Pol.*, 66: 379-386.
- LOVEJOY T.E., RANKIN J.M., BIERREGARD R.O., BROWN K.S., EMMONS L.H., VAN DE VOORT M.E., 1984 - Ecosystem decay of Amazon Remnants. In: NITECKI M.H. (ed.), *Extinctions*. University of Chicago Press, Chicago.
- LUBRANO L., 1992 - Micropropagation of poplars (*Populus* spp.). *Biotechnology in agriculture and forestry*, 18. In: BAJAJ Y.P.S. (ed.), *High tech and micropropagation II*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- MABBERLEY D.J., 1997 - The plant book: a portable dictionary of the vascular plants, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- MACDONALD B., 1987 - Practical woody plant propagation for nursery growers. Timber Press, Portland, Oregon.
- MARION W., GEORGE R., 2001 - Calculation of solar radiation using a methodology with worldwide potential. *Solar Energy*, 71(4): 275-283.
- MARSHALL D.R., BROWN A.H.D., 1983 - Theory of forage plant collection. In: MCIVOR J.G., BRAY R.A. (eds.), 1983 - Genetic Resources of Forage Plants. CSIRO, Melbourne.
- MARTIN A.C., 1946 - The comparative internal morphology of seeds. *American Midland Naturalist*, 36: 513-660.
- MARTIN A.C., BARKLEY W.D., 1961 - Seed identification manual. University of California Press, Berkeley.
- MARTIN C., MARTINEZ-LABORDE J.B., PEREZ C., 1998 - The use of X-ray radiography in the assessment of conserved seeds of six halophytic species of *Limonium*. *Journal of Arid Environments*, 38: 245-253.
- MARZALINA M., KRISHNAPILLAY B., 1999 - Recalcitrant seed biotechnology applications to rain forest conservation. In: BENSON E.E. (ed.), 1999 - *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis, Ltd.
- MAUSETH J.D., 2000. *Botanica - Fondamenti di biologia delle piante*. Nuova Editoriale Grasso, Bologna.
- MERRIT D.J., KRISTIANSEN M., FLEMATTI G.R., TURNER S.R., GHISALBERTI E.L., TRENGOVE R.D., DIXON K.W., 2006 - Effects of a butenolide present in smoke

- on light-mediated germination of Australian Asteraceae. *Seed Science Research*, 16 : 29-35.
- MEZZALIRA G., PIOTTO B. (eds.), 2003 – Biodiversità e vivaistica forestale: aspetti normativi, scientifici e tecnici. APAT Manuali e Linee Guida 18/2003, Roma. 122 pp.
- MILLER M., 2000 – Fire autoecology. In: BROWN J.K., SMITH J.K., 2000 - Wildland fire in ecosystems, effects on fire and flora. Gen.Tech. Rep. RMRS-42, 2. Ogden UT, USDA Forest Service, Rocky Mt. Res. St.
- MINISTERO DELL'AGRICOLTURA E DELLE FORESTE, 1993 – Metodi Ufficiali di Analisi delle Sementi. Decreto Ministeriale 22 dicembre 1992. Supplemento ordinario n. 2 del 4 gennaio 1993. Gazzetta Ufficiale Serie Generale, Parte Prima.
- MONTELEONE I., FERRAZZINI D., CAMERANO P., GRIECO C., PIOTTO B., BELLETTI P., 2005 - Definizione di regioni di provenienza per il frassino maggiore. *Sherwood*, 115: 5-10.
- MONTELEONE I., GORIAN F., BELLETTI P., 2005b - Strategie di conservazione e gestione della biodiversità nella filiera di produzione di materiale forestale di propagazione. Atti IV Convegno SISEF, Pignola (PZ), 7-10 ottobre 2003.
- MOSSA L., GUARINO R., FOGU M.C., 2004 – La componente terofitica della flora della Sardegna: forme di crescita, ecologia, corologia e sinsistemica. *Rend. Sem. Fac. Sci. Univ. Cagliari*, 73 (suppl. n. 2).
- MUSMARRA A., 1996 – Dizionario di Botanica. Edagricole, Bologna.
- NAMKOONG G., 1988 - Sampling for germplasm collections. *HortScience*, 23:79-81.
- NEPI M., FRANCHI G.G., PACINI E., 2001 - Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma*, 216: 171-180.
- NEPI M., PACINI E., 1993 - Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. *Annals of Botany*, 72: 526-536.
- NIKOLAEVA M.G., 1969 – Physiology of deep dormancy in seeds. Israel Programme for Scientists Translations, Jerusalem.
- NORMAH M.N., MARZALINA M., 1996 - Achievements and prospects of in vitro conservation for tree germplasm. In: NORMAH, M.N. (ed.), 1996 - In vitro Conservation of Plant Genetic Resources, UKM.
- NORSE E.A. (ed.), 1993 - Global marine biodiversity. Island press, Washington, DC.
- OGAWA K., IWABUCHI M., 2001 – A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant Cell Physiology*, 42(3): 286-291.
- ORTEGA M., LEVASSOR C., PECO B., 1997 - Seasonal dynamics of Mediterranean pasture seedbanks along environmental gradients. *J. Biogeogr.*, 24: 177-195.
- PACINI E., 1981 - L'impollinazione: una recente rassegna. *Informatore Bot. Ital.* 13: 103-117.
- PACINI E., 1990 - *Mercurialis Annu*a L. (Euphorbiaceae) Seed Interactions With The Ant *Messor Structor* (Latr.), Hymenoptera: Formicidae. *Acta Bot. Neerl.*, 39: 253-262.
- PACINI E., 1996 - Types and meaning of pollen carbohydrate reserves. *Sex. Pl. Reprod.*, 9: 362-366.
- PACINI E., 1997 - Tapetum character states: analytical keys for tapetum types and activities. *Can. J. Bot.*, 75: 1448-1459.
- PACINI E., 2000 - From anther and pollen ripening to pollen presentation. *Plant Syst. Evol.*, 222:19-43.

- PACINI E., FRANCHI G.G., 1998 - Pollen dispersal units, gynoeceum and pollination. In: OWENS S.J., RUDALL P.J. (eds.), 1998 - Reproductive Biology. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PACINI E., FRANCHI G.G., LISCI M., NEPI M., 1997 - Pollen viability related to type of pollination in six angiosperm species. *Ann. Bot.*, 80: 83-87.
- PACINI E., GUARNIERI M., NEPI M., 2006 - Pollen carbohydrates and water content during development, presentation and dispersal: a short review. *Protoplasma*, in press.
- PACINI E., HESSE M., 2004 - Cytophysiology of pollen presentation and dispersal. *Flora*, 199:273-285.
- PACINI E., HESSE M., 2005 - Pollenkitt - its composition, forms and functions. *Flora*, 200: 399-415.
- PÁLFI G., MIHALIK E., 1985 - Proline staining as a new method for determining the viability of pollen in wind and insect pollinated plants. *Acta Bot. Hung.*, 31: 315-321.
- PANIS B., SWENNEN R., ENGELMANN F., 2001 - Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Hort.*, 560: 79-86.
- PARKER V.T., KELLY V.R., 1989 - Seed banks in California chaparral and other Mediterranean climate shrublands. In: LECK M.A., PARKER V.T., SIMPSON R.L. (eds.), 1989 - Ecology of Soil Seed Bank. Academic Press, San Diego.
- PARKER V.T., LECK M.A., SIMPSON R.L., 1989 - Pattern and process in the dynamics of seed banks. In: LECK M.A., PARKER V.T., SIMPSON R.L. (eds.), 1989 - Ecology of Soil Seed Bank. Academic Press, San Diego.
- PECO B., LEVASSOR C., ORTEGA M., 1998 - Similarity between seed banks and vegetation in Mediterranean grassland: a predictive model. *J. Veg. Sci.*, 9: 8 15-828.
- PERRINO P., TERZI M., 2003 - Importanza della conservazione del germoplasma. In: BRESSAN M., MAGLIARETTA L., PINO S. (eds.), 2003 - Cereali del Veneto. Regione Veneto/Prov. Di Vicenza/Veneto Agricoltura.
- PIGNATTI S., 1982 - Flora d'Italia. Edagricole, Bologna.
- PIGNATTI S. (ed.), 1995 - Ecologia Vegetale. UTET, Torino.
- PIGNATTI S., MENEGONI P., GIACANELLI V. (eds.), 2001 - Liste rosse e blu della flora italiana. ANPA, Roma.
- PINNA M., 1977 - Climatologia. UTET, Torino.
- PIOTTO B., 1992 - Semi di alberi e arbusti coltivati in Italia. Società Agricola e Forestale - Gruppo E.N.C.C. 78 pp.
- PIOTTO B., 1997 - Nuove tecniche per preservare la variabilità dei caratteri genetici in alberi e arbusti con semi dormienti. *EM Linea Ecologica*, 29(2): 5 1-54.
- PIOTTO B., 2005 - La propagazione per seme. In: CERVELLI C. (ed.): Le specie arbustive della macchia mediterranea, un patrimonio da valorizzare. Collana Sicilia Foreste, 26. Regione Siciliana, Agrigento.
- PIOTTO B., AMADEI M., 2004 - Conserviamo i semi per difendere la natura. *Alberi e Territorio*, 10-11.
- PIOTTO B., CROSTI R., 2005 - Metodo per individuare le esigenze ecofisiologiche per la germinazione. *Alberi e Territorio*, 12: 41-44.
- PIOTTO B., DI NOI A. (eds.), 2003 - Seed propagation of Mediterranean trees and shrubs. APAT, Roma.

- PIOTTO B., DI NOI A., 2001 – Manuale ANPA - Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. ANPA, Roma.
- PIOTTO B., FALLERI E., BRUNORI A (eds.) 2005 - Propagazione di specie vegetali di particolare valore ecologico dell'Appennino Umbro-Marchigiano. APAT, Rapporti, 52: 1-103.
- PIOTTO B., FALLERI E., PORTA-PUGLIA A., 2001 – La qualità del seme. In: PIOTTO B., DI NOI A. (eds.) Propagazione per seme di alberi e arbusti della flora mediterranea. ANPA, Roma.
- PRIMACK R.B., 1992 - Tropical community dynamics and conservation biology. *BioScience*, 42: 818-821.
- PRITCHARD H.W., DICKIE J.B., 2003 – Predicting Seed Longevity: the use and abuse of seed viability equations. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W, PROBERT R.J. (eds.), 2003 – Seed Conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PROBERT R.J., 2003 – Seed Viability under Ambient Conditions, and the Importance of Drying. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W, PROBERT R.J. (eds.), 2003 – Seed Conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.
- PUPILLO P., CERVONE F., CRESTI M., RASCIO N., 2003 - *Biologia vegetale*. Zanichelli, Bologna.
- RAJORA O.P., ZUFFA L., 1986 – Pollen viability of some *Populus* species as indicated by in-vitro pollen germination and tetrazolium chloride staining. *Can. J. Bot.*, 64: 1086-1088.
- RAUNKIAER C., 1934 - *The life forma of plants and statistical plant geography*. Univ. Oxford, Oxford.
- RAVEN P.H., EVERT R.F., EICHORN S.E., 2002 - *Biologia delle Piante*. Zanichelli, Bologna.
- RAY PETER M., STEEVES TAYLOR A., FULTS SARA A., 1985 – *Botanica*. Zanichelli, Bologna.
- RAYMOND A.T.G., 1989 - *Producción de semillas de plantas hortícolas*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid.
- RICE K.J., 1989 - Seed aging, delayed germination and reduced competitive ability in *Bromus tectorum*. *Plant Ecol.*, 155: 237-243.
- RIVAS-MARTÍNEZ S., DÍAZ T.E., FERNÁNDEZ-GONZÁLES F., IZCO J., LOIDI J., LOUSÁ M., PENAS A., 2002 - Vascular plant communities of Spain and Portugal. Addenda to the syntaxonomical checklist of 2001. *Itinera Geobot.*, 15(1): 5-432.
- ROBERTS E.H., 1973 - Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, 1: 499-514.
- ROBERTS H.A. -1981- Seed banks in soil. *Advances in Applied Biology*, 6: 1-55.
- ROYAL BOTANIC GARDENS KEW – WAKEHURST PLACE - A field manual for seed collectors. Wakehurst Place. UK
- RUANO R., 2003 - *Viveros Forestales*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- SAKAI A., KOBAYASHI S., OIYAMA I., 1990 - Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.*, 9: 30– 33.
- SCHMIDT L., JØKER D., 2001 – Technical note no. 59 – Glossary of seed biology and technology. Danida Forest Seed Centre. Humlebaek, Denmark.

- SCHOENIKE R.E., BEY C.F., 1981 - Conserving genes through pollen storage. In: FRANKLIN E.C. (ed.), 1981 - Pollen management hand book. United States Department of Agriculture. Forest Service Agriculture Handbook, 287: 72-73.
- SCOPPOLA A., SPAMPINATO G., (eds.) 2005 – Atlante delle specie a rischio di estinzione. In: SCOPPOLA A., BLASI C. (eds.) 2005 - Stato delle conoscenze sulla flora vascolare d'Italia. Palombi Editore, Roma.
- SERNARDER R., 1906 - Entwurf einer Monographie der Europäischen Myrmekochoren. Kungl. Svensk. Veternsk. Handlingar, 41: 1-410.
- SIMAK M., 1980 – Germination and storage of *Salix caprea* L. and *Populus tremula* L. seeds. IUFRO Working party on seeds problems, Proceedings of the International Symposium on Forest Tree Seeds Storage, Petawawa Nat. For. Inst, Canada.
- SMITH R.D., 1995 – Collecting and handling seeds in the field - Collecting Plant Genetic Diversity. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon. UK.
- SOIL SURVEY STAFF, 1998 - Keys to Soil Taxonomy, 8th edition. USDA-NRCS. Washington D.C.
- SPERANZA A., CALZONI G.L., PACINI E., 1997 - Occurrence of mono- or disaccharides and polysaccharide reserves in mature pollen grains. Sex. Pl. Reprod., 10: 110-115.
- STANTON B.J., VILLAR M., 1996 – Controlled reproduction of *Populus*. In: STETTLER R.F., BRADSHAW H.D., HEILMAN P.E., HINCKLEY T.M. (eds.), 1996 - Biology of Populus and its implications for management and conservation. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada.
- STEARNS W.T., 1980 - Botanical Latin. David & Charles Publishers, London.
- STRASBURGER E., 1995 - Trattato di Botanica: parte generale e parte sistematica. Antonio Delfino Editore, Roma.
- SUSZKA B., MULLER C., BONNET-MASIMBERT M., 1994 – Graines des feuillus forestiers, de la récolte au semis. INRA Editions, Paris.
- TERRY J., PROBERT R.J., LININGTON S.H., 2003 – Processing and Maintenance of the Millennium Seed Bank Collections. In: SMITH R.D., DICKIE J.B., LININGTON S.H., PRITCHARD H.W., PROBERT R.J. (eds.), 2003 – Seed Conservation: turning science into practice. Royal Botanic Gardens, Kew.
- THANOS C.A., GEORGHIOU K., DOUMA D.J., MARANGAKI C.J., 1991 – Photoinhibition of seed germination in Mediterranean maritime plants. Ann. Bot., 68: 469-475.
- THANOS C.A., GEORGHIOU K., DELIPETROU P., 1994 - Photoinhibition of seed germination in the maritime plant *Matthiola tricuspidata*. Ann. Bot., 73: 639-644.
- THANOS C.A., DOUSSI M.A., 1995 – Ecophysiology of seed germination in endemic *Labiates* of Crete. Isr. J. Plant Sci., 43: 227-237.
- THOMPSON K., 1986- Small-scale heterogeneity in the seed banks of an acidic grassland. J. Ecol., 74: 733-738.
- THOMPSON K., 1993: Persistence in soil. In: HENDRY G.A.F., GRIME J.P. (eds.), 1993 - Methods in Comparative Plant Ecology. A Laboratory Manual. Chapman & Hall, The Netherlands.
- THOMPSON K., BAND S.R., HODGSON J.G., 1993 – Seed size and shape predict persistence in the soil. Funct. Ecol., 7: 236-241.

- THOMSEN K., KIKLE V.S., 2000 – Technical note no. 57 – Laboratory manual for basic tree seed studies. Danida Forest Seed Centre. Humlebaek, Denmark.
- THOMSON, J.R., 1979 - Introducción a la Tecnología de las semillas. Ed. Acribia, Zaragoza.
- TOKUHARA K., MII M., 1993 - Micropropagation of Phalaenopsis and Doritaenopsis by culturing shoot tips of flower stalk buds. Plant Cell Rep., 13:7–11.
- TONZIG S., MARRE' E., 1971 - Botanica generale. CEA, Milano.
- TOOLE V.K., BAILEY W.K., TOOLE E.H., 1964 – Factors influencing dormancy of peanut seeds. Plant physiol., 39(5): 768-772.
- UBALDI D., 2003 – Flora, fitocenosi e ambiente. Clueb, Bologna.
- URAGAMI A., SAKAI A., MAGAI M., 1990 - Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown in vitro. Plant Cell Rep., 9: 328-331.
- URAGAMI A., SAKAI A., NAGAI M., TAKAHASHI T., 1989 - Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* L. cryopreserved by vitrification. Plant Cell Rep., 8: 418-421.
- VANDEN BROECK A., JOCHEMS H., STORME V., VAN LOY K., 2002 – Strategies for restoration of natural populations of Black Poplar (*Populus nigra* L.) along the Maas valley. Vlaams Impulsprogramma Natuurontwikkeling. Eindrapport 0010.
- VENORA G., GRILLO O., 2006 - Application of an image analysis system to differentiate bean cultivars. Computers and Electronics in Agriculture, in press.
- VENORA G., GRILLO O., SHAHIN M.A., SYMONS S.J., 2006 - Identification of Sicilian landraces and Canadian cultivars of lentil by image analysis system. Genetic Resources and Crop Evolution, in press.
- VESPRINI J.L., NEPI M., CRESTI L., GUARNIERI M., PACINI E., 2002 - Changes in cytoplasmic carbohydrate content during *Helleborus* pollen presentation. Grana, 41: 16-20.
- VIEGI L., EVANGELISTI R., PACINI E., 2003 - The achene pappi and elaiosomes of *Centaurea* L.: dispersal and germination in some Italian species. Israel J. Pl. Sci., 51: 45-54.
- VIETTO L., CHIARABAGLIO P.M., 2004 – Restoration of floodplain woodlands with native Poplars (*Populus nigra* and *Populus alba*): some case of study along the Po river. River Restoration 2004. Principles, Processes, Practices. Proceedings 3rd ECRR International Conference on River Restoration in Europe. Zagreb, Croatia, 17-21 May 2004.
- VIETTO L., BIANCO B., 2005 – Progress on national activities on gene conservation of Black poplar (*Populus nigra* L.) and White poplar (*Populus alba* L.) in Italy. European Forest Genetic Resources Programme (EUFORGEN) *Populus nigra* Network. Report of the seventh (25-27 October 2001, Osijek, Croatia) and eighth (22-24 May 2003, Treppeln, Germany). (J. Koskela, S.M.G. de Vries, D. Kajba and G. von Wuelish, compilers). International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- VILARNAU A., GONZÁLEZ J., 1999 - Planteles, semilleros, viveros. Compendios de horticultura, 13. Ediciones de Horticultura SL, Reus.
- VON BOTHMER R., SEBERG O., 1995 – Strategies for the collecting of wild species - Collecting Plant Genetic Diversity. In: GUARINO L., RAMANANTHA RAO V., REID R. (eds.), 1995 - Collecting Plant Genetic Diversity - Technical guidelines. CABI. Wallingford, Oxon. UK.

- WALTERS C., 2004 – Guidelines for seed storage. In: GUERRANT E., HAVENS K., MAUNDER M. (eds.), 2004 - Ex situ plant conservation, supporting species survival in the wild. Island Press.
- WERKER E., 1997 - Seed Anatomy. Encyclopedia of plant anatomy, 10. Gebr der Borntraeger, Berlin.
- WILLIAMS C., DAVIS K., CHEYNE P., 2003 - The CBD for Botanists: An Introduction to the Convention on Biological Diversity for people working with botanical collections. Royal Botanic Gardens, Kew.
- WILSON E.O., 1992 – The diversity of life. Cambridge University Press, Cambridge.
- WILSON S.M.G., SAMUEL C.J.A., 2003 - Genetic conservation of native trees. Forest Research Annual Reports and Accounts 2002-2003: 56-61.
- WITHERS L.A., KING P.J., 1980 - A simple freezing unit and routine cryopreservation method for plant cell cultures. Cryo Letters, 1: 2 13-220.
- WITT S., 1985 - Biotechnology and Genetic Diversity. California Agricultural Lands Project, San Francisco.
- ZANGHERI P., 1942 - Flora e vegetazione dei calanchi argillosi pliocenici della Romagna. Romagna Fitogeografica, 2: 159-190.