



ENSCONET

Protocoles de conservation & recommandations

Traduction française de
ENSCONET Curation Protocols & Recommendations

Editeur général:
Royal Botanic Gardens, Kew

Version: 15 juin 2009



Le contenu de ce document est basé
sur une formation d'ENSCONET

“une revue critique des procédures clefs de conservation”

qui s'est tenue à

“Ecologia del Territorio” Department, University of Pavia,
Via S. Epifanio 14 - 27100 Pavia, Italy

du 22 au 26 octobre 2007

Traduction effectuée par: Constantinos Constantinou, Elisabeth Candussi, Nima Saedlou
& Sandrine Godefroid.

Egalement disponible en anglais, allemand, grec, hongrois, italien, polonais, espagnol
et **Portuguese**.



ENSCONET est une action de coordination financée par l'Union Européenne dans le cadre des activités intégrées du 6ème programme cadre. Ce texte reflète seulement les vues des contractants et l'Union européenne ne peut être tenue pour responsable de l'usage qui peut être fait des informations contenues dans ce document.

REMERCIEMENTS ET MEMBERS ENSCONET

Les acronymes utilisés dans ce document précèdent le nom et l'adresse de l'institution.

RBGK - Seed Conservation Department, Royal Botanic Gardens, Kew, Wakehurst Place, Ardingly, West Sussex RH17 6TN, UK

NKUA - Department of Botany, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis, Athens 15784, GREECE

IB SAS - Institute of Botany, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská cesta 14, 845 23 Bratislava, SLOVAKIA

BZBG - Budapest Zoo & Botanical Garden, P.O. Box 469, Állatkerti körút 6-12, H-1146 Budapest, HUNGARY

MAICh - Mediterranean Agronomic Institute of Chania, Alsyllion Agrokepion, P.O. Box 85, 73100 Chania (Crete), GREECE

JB Cordoba - IMGEMA - Jardín Botánico de Córdoba, Avda. de Linneo s/n, 14004 Córdoba, SPAIN

TCD - Trinity College Botanic Garden, Palmerston Park, Dartry, Dublin 6, IRELAND

Jardin Canario - Jardin Botanico Viera y Clavijo del Cabildo de Gran Canaria, Apdo 14, 35017 Tafira Alta, Las Palmas de Gran Canaria, SPAIN

CYARI - Agricultural Research Institute, P.O.Box 22016, 1516 Nicosia, CYPRUS

UPM - Departamento de Biología Vegetal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, SPAIN

NBGB - National Botanic Garden of Belgium, Domein van Bouchout, 1860 Meise, BELGIUM

MNHN - Muséum National d'Histoire Naturelle, Département des Jardins Botaniques et Zoologiques, Case postale 45, 57, rue Cuvier, 75231 Paris Cedex 05, FRANCE

UNI-PAV-CFA - Università degli Studi di Pavia, Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Via S. Epifanio, 14, 27100 Pavia, ITALY

Pisa Botanic Garden - Department of Biology, Pisa University, Via Luca Ghini 5, 56126 Pisa, ITALY

JB Soller - Jardí Botànic de Sóller, Ctra. Palma-Port de Sóller Km 30,5, Apartat de Correus 44, 07100 Sóller, SPAIN

MTSN - Museo Tridentino di Scienze Naturali Trento, Via Calepina 14, 38100 Trento, ITALY

UVEG - Jardí Botànic de la Universitat de València, C/ Quart, 80, 46008 Valencia, SPAIN

HBV - Department of Biogeography and Botanical Garden, University of Vienna, Rennweg 14, 1030 Vienna, AUSTRIA

BG-CBDC PAS - Botanical Garden, Center for Biological Diversity Conservation of the Polish Academy of Sciences, Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa 76, POLAND

FUB-BGBM - Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Freie Universität Berlin, Königin-Luise-Str. 6-8, 14191 Berlin, GERMANY

HUBG - Botanic Garden, P.O.Box 44 (Jyrängöntie 2), 00014 University of Helsinki, FINLAND

FUL - Jardim Botânico / Botanical Garden, Museu da Politécnica, R. Escola Politécnica 58, 1269-102 Lisboa, PORTUGAL

NHMOSLO - Botanical Garden, Natural History Museum, University of Oslo, P.O. Box 1172, Blindern, 0318 Oslo, NORWAY

IB-BAS - Department of Applied Botany, Institute of Botany, Bulgarian Academy of Sciences, 23, Acad. G. Bonchev Str., 1113 Sofia, BULGARIA

AS-BOKU - Institute of Botany and Botanical Garden, Department of Integrative Biology, University of Natural Resources and Applied Sciences, Gregor-Mendel-Str. 33, 1180 Wien, AUSTRIA

Luxembourg - Living plant collections, Musée national d'histoire naturelle, 25 rue Munster, 2160 Luxembourg, LUXEMBOURG

Geneva - Conservatoire et Jardin botaniques de la ville de Genève, 1 chemin de l'Imperatrice, Case postale 60, 1292 Chambésy/GE, SWITZERLAND

FIT Nicosia - Frederick University Cyprus, Nature Conservation Unit, P.O.Box 24729, 1303 Nicosia, CYPRUS

Autres institutions ayant fourni de précieux commentaires

Hungarian Academy of Sciences, Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry Department of Soil Biology, Herman Ottó út 15, H-1022 Budapest, HUNGARY

Global Crop Diversity Trust, c/o FAO, Viale delle Terme di Caracalla, 00153 Rome, ITALY

SOMMAIRE

ENSCONET Conservation Recommandations.....	i
Introduction.....	1
Chapitre 1. Nettoyage des graines.....	4
Chapitre 1a. Equipements et opérations communes.....	5
Chapitre 2. Séchage des graines.....	11
Chapitre 2a. Hétérogénéité des échantillons et vitesse de séchage.....	11
Chapitre 2b. Circulation de l'air.....	12
Chapitre 2c. Suivi du séchage.....	13
Chapitre 2d. Conditions de température et d'humidité utilisées pour le séchage.....	13
Chapitre 2e. Equipement pour le séchage.....	15
Chapitre 3. Suivi de l'humidité.....	17
Chapitre 3a. Mesure de l'humidité relative à l'équilibre.....	17
Chapitre 3b. L'utilisation d'hygromètres pour le suivi de l'humidité des graines.....	19
Chapitre 4. Conditionnement.....	22
Chapitre 5. Conservation des graines à long terme: température.....	25
Chapitre 5a. Température de conservation.....	25
Chapitre 5b. Choix de l'infrastructure à basse température.....	26
Chapitre 6. Tests de base pour la germination.....	29
Chapitre 7. Spécimens et vérification.....	34
Chapitre 8. Données.....	35
Chapitre 9. Régénération des graines.....	36
Annexe 1. Sommaire sur les systèmes clefs de la reproduction des plantes.....	42
Annexe 2. Formulaire de données proposé pour les collections régénérées.....	44
Chapitre 10. Distribution des graines.....	46
Bibliographie.....	48

RECOMMANDATIONS ENSCONET POUR LA CONSERVATION

NETTOYAGE DES GRAINES

Pour plus de détails, voir Chapitre 1.

- Idéalement, tous les lots de graines doivent être nettoyés à fond jusqu'à ce que tous les échantillons de plantes aient été enlevés. Toutefois, dans certains cas, il peut être nécessaire de mettre en banque les collectes dès leur réception et d'enregistrer cela dans l'ordinateur.
- Les graines des espèces sauvages doivent être nettoyées manuellement tout en utilisant un équipement spécifique de nettoyage mécanique. Lorsqu'un équipement est utilisé, il doit être nettoyé avec précaution avant d'être utilisé pour chaque nouvelle collecte.
- L'équipe a besoin de connaissances sur la morphologie des graines et des fruits et doit savoir comment interpréter les structures vues au microscope.
- Il est conseillé d'effectuer les opérations de nettoyage des graines sous une hotte aspirante avec un filtre à poussière ou dans un espace confiné, par l'équipe portant des masques anti-poussière d'une qualité convenable.
- Pendant le nettoyage, les graines doivent être inspectées au microscope binoculaire pour voir les signes de dégâts.
- Les débris générés pendant le nettoyage devraient être détruits de préférence par incinération contrôlée.
- Des tests de coupe ou des analyses au rayon-X devraient être effectués pour évaluer le nombre de graines « vides » dans le lot de graines nettoyé.

SUIVI DU SECHAGE ET DE L'HUMIDITE

Pour plus de détails, voir Chapitres 2 & 3.

- Jusqu'à ce que de nouvelles données soient disponibles, il est recommandé que de sécher les graines jusqu'à l'équilibre avec environ 15 % d'HR (approximativement 3,5-6,5 % d'humidité suivant la teneur en huile de la graine) à 10-20 °C si elles sont ensuite conservées à des températures inférieures à zéro. L'ultra-séchage en dessous de ces taux d'humidité est recommandé si le stockage est prévu à une température au dessus de zéro. Le séchage par la chaleur ou le four n'est pas recommandé.
- Lorsque cela est possible, les graines et les fruits qui sont manifestement à différentes étapes de mûrissement doivent être séparés en sous lots et chaque sous lot séché une fois à maturité.
- Pour maximiser le taux de séchage, les graines doivent être étalées en couche fine et de l'air doit être dirigé au-dessus d'elles.
- Faire mûrir les graines et les fruits non mûrs pendant 2 ou 3 semaines dans des conditions semblables à celles où elles ont été récoltées.
- Laisser sécher graduellement les graines extraites de fruits charnus mûrs à conditions ambiantes (60-70 % d'HR, 20-25 °C, pendant 1 à 2 semaines) avant de les transférer dans les conditions de la chambre de séchage.
- Utiliser l'équilibre de l'humidité relative (eHR) pour suivre le séchage mais en prenant garde aux sources d'erreur potentielle. Cela peut être mesuré en utilisant des hygromètres, un système d'enregistrement de la température ou des témoins de silica gel (gel de silice).
- On recommande une chambre de séchage ajustable en HR pour une banque de graines moyenne à grande (c'est-à-dire de 100 à 1000 accessions par an). Pour des opérations de petite échelle impliquant de petites quantités d'accessions (c'est-à-dire moins de 100 par an) un séchage par silica gel ou l'utilisation d'un dessiccateur est recommandée.
- Les graines à haute teneur en humidité devraient être séchées d'abord à température ambiante pendant 2-3 jours pour enlever l'excès d'eau avant d'être séchées en dessiccateur. Si on utilise le silica gel, le ratio de 1:1 par volume de dessiccant pour les graines doit permettre aux graines d'être séchées à un taux sûr (<30% eHR).

CONDITIONNEMENT

Pour plus de détail, voir Chapitre 4.

- Pour un stockage à long terme, utiliser des contenants en verre transparent refermables si un accès régulier est requis ; Utiliser des contenants en verre qui peuvent être scellés à chaud ou des contenants double couche en verre refermable si l'accès n'est pas requis. Des sacs d'aluminium de haute qualité devraient convenir si bien scellés et de préférence en double couche.
- Ensacher les graines de préférence dans un environnement à humidité contrôlée.
- Inclure un sachet de silica gel indicateur d'humidité dans le contenant pour suivre la performance de la fermeture et protéger contre les catabolites. Ceux-ci doivent être équilibrés selon les conditions de séchage de la banque de graines (normalement 15% HR)
- Vérifier périodiquement et remplacer les cachets (si nécessaire).
- Tester l'étanchéité des contenants en utilisant un procédé standard d'essai d'étanchéité.

STOCKAGE

Pour plus de détail, voir Chapitre 5.

- Un stockage à une température sous 0 °C (normalement entre -18 et -20 °C) est recommandé pour une conservation à long terme de la plupart des graines orthodoxes.
- Pour un stockage conventionnel à des températures non cryogéniques, abaisser la température sous -35 °C ne semble pas améliorer la longévité des graines suffisamment pour justifier des coûts supplémentaires.
- Pour des espèces produisant des graines orthodoxes à durée de vie très courte, le cryo-stockage dans ou au-dessus de l'azote liquide peut être recommandé.
- Tous les échantillons doivent être dupliqués dans une seconde banque de graines. Cette seconde banque devrait être suffisamment loin pour ne pas être sujette aux mêmes catastrophes qui pourraient détruire la collection principale.

GERMINATION

Pour plus de détail, voir Chapitre 6.

- Il est recommandé d'effectuer les tests de germination sur le plus d'accessions possible une fois les graines séchées et traitées et, si possible, après leur mise en banque. Idéalement les tests de germination devraient être effectués avant et après séchage pour vérifier s'il existe des indications que la germinabilité a été affectée par la dessiccation. Si les ressources sont limitées et qu'un seul test initial peut être effectué, il est recommandé de le réaliser dans le premier mois après mise en banque.
- Le pourcentage de germination devrait être exprimé en terme de nombre de graines qui peuvent être physiquement capable de germer (nombre total de graines – graines endommagés ou vides).
- Quoiqu'une taille d'échantillon de 200 graines soit idéale, dans la plupart des cas deux répliques de 50 ou 25 graines sont acceptables.
- Afin d'éviter des dommages d'imbibition, les graines des espèces sensibles devraient être humidifiées avant le test.
- La germination des graines est un trait extrêmement plastique et les exigences peuvent varier considérablement entre les espèces, les populations, les années de récolte et même entre les intervalles de stockage. Utiliser la bibliographie ou des bases de données telle que RBGK's

Seed Information Database (Liu *et al.*, 2008: <http://data.kew.org/sid/sidsearch.html>) et LEDA traitbase (<http://www.leda-traitbase.org/tomcat/LEDAportal/index.jsp>) comme guide. S'il n'y a pas d'information (même à propos d'espèces proches), tenir compte du climat, de l'écologie et de la structure de la graine de l'espèce.

- Les graines de nombreuses espèces sauvages présentent une dormance. Des techniques appropriées de levée de dormance devraient être utilisées selon le type de dormance.
- Le substrat pour le semis peut être l'agar, le papier filtre ou le sable. L'agar (normalement 1 %) a les avantages suivants: requiert peu de maintenance ; a un faible risque de dommage lié à l'imbibition ; maintient les produits chimiques appliqués à une concentration constante ; permet aux radicelles blanches d'être visibles sur un fond sombre ; permet aux plants d'être déplacés pour transplantation.
- Dans tous les cas, utiliser de l'eau déminéralisée ou distillée.
- Les graines ne devraient pas se toucher les unes les autres sur le milieu de germination.
- Si possible, des températures constantes devraient être évitées excepté durant la plupart des traitements de stratification. Une lumière continue devrait être évitée à cause des risques d'inhibition de la germination.
- Pour les tests de germination, une graine germée pourrait être définie comme ayant une radicelle dépassant de 1-2 mm de long ou comme ayant une radicelle au moins aussi longue que la graine.

SPECIMENS ET VERIFICATION

Pour plus de détail voir Chapitre 7.

- Excepté dans les cas où les populations sont bien connues, un spécimen d'herbier devrait être récolté pour représenter la population d'où viennent les graines. Evidemment, un soin particulier devrait être apporté aux populations rares ou en danger impliquées.

DONNÉES

Pour plus de détail voir Chapitre 8.

- En enregistrant les données de chaque collection de graines, il est essentiel de se rappeler que ces données seront significatives pour leurs utilisateurs, maintenant et pendant toute la vie de la collection (peut-être 200 ans). Les données doivent donc être objectives et vérifiées selon des normes agréées.

RÉGÉNÉRATION

Pour plus de détail voir Chapitre 9.

- La régénération est une opération coûteuse qu'il est difficile de mettre en place ; si possible, il est préférable de la remplacer par la récolte de grande et de haute qualité de collections de graines dans la nature. Dans certains cas, ce serait mieux de récolter de nouveau directement dans la nature (lorsque cela est encore possible) au lieu de réaliser une régénération.
- L'équipe de la banque de graines devrait faire de son mieux pour réduire les risques de sélection, de dérive génétique ou d'hybridation avec du matériel très proche bien qu'il faille accepter que la perfection puisse rarement être atteinte. L'équipe devrait utiliser tous les savoirs disponibles à propos des systèmes de reproduction des espèces pour documenter la méthode de pollinisation (e.g., si allogamie ne pas les forcer à se croiser et s'assurer de l'isolement génétique de collections similaires). De plus, les plantes faibles ou non caractéristiques ne devraient pas être écartées puisqu'elles pourraient contenir du matériel génétique différent.

- Une haute qualité horticole est essentielle pour minimiser les pertes d'individus (en poussant dans des conditions similaires à la nature) et maximiser la production de graines (en réduisant la compétition et en optimisant la floraison et la fructification).
- Idéalement, les plantes devraient être croisées comme croisements réciproques en paire, en acceptant que dans la plupart des cas cela demandera beaucoup trop de temps et en croisant en autant de combinaisons que possible sera nécessaire ; la contribution du pollen des différents parents devrait être similaire.
- La pollinisation manuelle à différentes périodes couvrira la floraison précoce et tardive.
- Quand cela est possible, les lots de graines de différentes plantes mères devraient être gardés séparés et des quantités égales pour chaque usage pour créer la génération suivante. Quand cela n'est pas possible, les quantités de graines égales devraient être récoltées de chaque parent maternel et renforcées ; la génération suivante devrait être sélectionnée au hasard et devrait consister en pas moins d'individus que la génération précédente pour éviter le goulot d'étranglement.
- Les conditions de croissance et les résultats de la régénération devraient être entièrement documentés.

DISTRIBUTION DE GRAINES

Pour plus de détail voir Chapitre 10.

- Les listes de graines devraient être composées de collections avec des quantités de graines adéquates, des niveaux de germination acceptables et une identité vérifiée ; elles ne devraient pas contenir des collections avec des accords de restriction de collecte ou appartenir à des espèces connues pour être fortement invasives.
- Il est important que les banques de graines maintiennent un stock de base des graines, qui ne sont pas distribuées. Cela peut être réalisé soit en séparant physiquement les échantillons pour la conservation (collection de base) des échantillons utilisés (collection active), soit en ayant un système de contrôle du stock de sécurité sur la base de donnée de la banque de graines.
- A cause de la souveraineté nationale et les problèmes de propriété relatifs aux ressources génétiques, les échantillons de graines sont normalement envoyés sous les termes d'un accord juridique de transfert de matériel (MTA) qui contrôle à quoi les graines peuvent être utilisées, si elles peuvent être passées à un tiers et comment les avantages résultant de l'utilisation seront partagés.
- L'aspect phytosanitaire, la CITES et la directive Habitat doivent être considérés quand le matériel doit traverser des frontières nationales.
- Les échantillons devraient être envoyés dans un paquet en aluminium et accompagnés d'un passeport pertinent et des données de germination.
- La banque de graines devrait garder des enregistrements des destinataires et des usages des échantillons distribués. Cette information est essentielle car elle démontre la valeur immédiate des collections de banque de graines. Si possible, les responsables de banque de graines devraient discuter des sortes de collections demandées par les utilisateurs potentiels ; cela aiderait à optimiser l'utilisation des collections.

INTRODUCTION

Objectif de ce document

L'objectif de ce document est de fournir le meilleur conseil disponible à ceux qui sont impliqués, ou commencent, dans la conservation à long terme d'échantillons de graines collectées dans la nature particulièrement en Europe mais également plus largement. C'est un guide plutôt qu'un manuel descriptif. Pour des manuels plus détaillés, les responsables de conservation peuvent se référer à (Crop seed -Rao *et al.*, 2006; tree seed -Schmidt, 2000; wild species – CPC, 1986; Bacchetta *et al.*, 2008; Offord & Meagher, 2009); Pour un texte de fond détaillé voir Smith *et al.*, (2003) et plus spécialement le chapitre de Terry *et al.* (2003). Pour chaque thème, des recommandations sont données pour les banques de graines détenant des espèces sauvages. Comme tel, le guide est construit sur les standards de banque de gènes produits par FAO/IPGRI (1994). Enfin, c'est aussi l'occasion de mettre en évidence les futurs axes de recherche.

THÈMES COUVERTS

Le séchage des graines, le suivi de l'humidité des graines, le conditionnement, la conservation, la germination, le nettoyage des graines, la vérification de l'identité, le traitement des données de conservation, la régénération des graines et la distribution des échantillons de graines (voir Figure 2 pour la séquence des activités dans une banque de graines d'espèces sauvages, et la Figure 3 pour ces activités en relation avec l'agencement des équipements de la banque de graines).



Figure 1 Les graines en conservation à long terme. (© RBGK)

Figure 2	Les éléments clés de la procédure générale de la conservation en banque de graines (Smith <i>et al.</i> , 2003)
Organisation et Collectes	<p>Organisation et recherche de permission.</p> <p>↓</p> <p>Mise en place de collecte sur le terrain de graines étiquetées et de part d'herbier (pressé) plus l'enregistrement de données de nature.</p> <p>↓</p> <p>Expédition rapide de la graine vers la banque.</p>
Traitement et tests	<p>↓</p> <p>Déballage de l'expédition, vérification des problèmes, séchage/support des parts d'herbier.</p> <p>↓</p> <p>Création d'enregistrement de données pour chaque accession.</p> <p>↓</p> <p>Évaluation des caractéristiques probables de stockage de graine (si inconnu)</p> <p>↓</p> <p>Nettoyage des graines¹</p> <p>↓</p> <p>Analyses aux rayons X et cut-test</p> <p>↓</p> <p>Détermination de la quantité des graines</p> <p>↓</p> <p>Séchage</p> <p>↓</p> <p>Détermination du statut d'humidité des graines</p> <p>↓</p> <p>Test de germination initial²</p>
Conservation et utilisation	<p>↓</p> <p>Emballage et duplication de sécurité³</p> <p>↓</p> <p>Conservation sous conditions de froid</p> <p>↓</p> <p>Caractérisation et évaluation⁴</p> <p>↓</p> <p>Distribution des sous-échantillons caractérisés aux utilisateurs (tout le temps)</p> <p>↓</p> <p>Re-Tests de germination (tout le temps)</p> <p>↓</p> <p>Régénération / multiplication des collections (si requis)⁵</p>

- 1 Le nettoyage est parfois précédé par une période de séchage. Les petits échantillons peuvent être multipliés à ce niveau avec un procédé après récolte pour du matériel collecté en nature.
- 2 Cette étape est parfois laissée jusqu'à après la mise en banque de graines si on veut avoir la confirmation que les graines survivent aussi bien à la dessiccation qu'à la congélation. Cela requiert un contenant pouvant être facilement re-scellé.
- 3 Les duplications devraient être
- 4 Comme approprié.
- 5 Procédé après récolte comme pour du matériel collecté en nature.

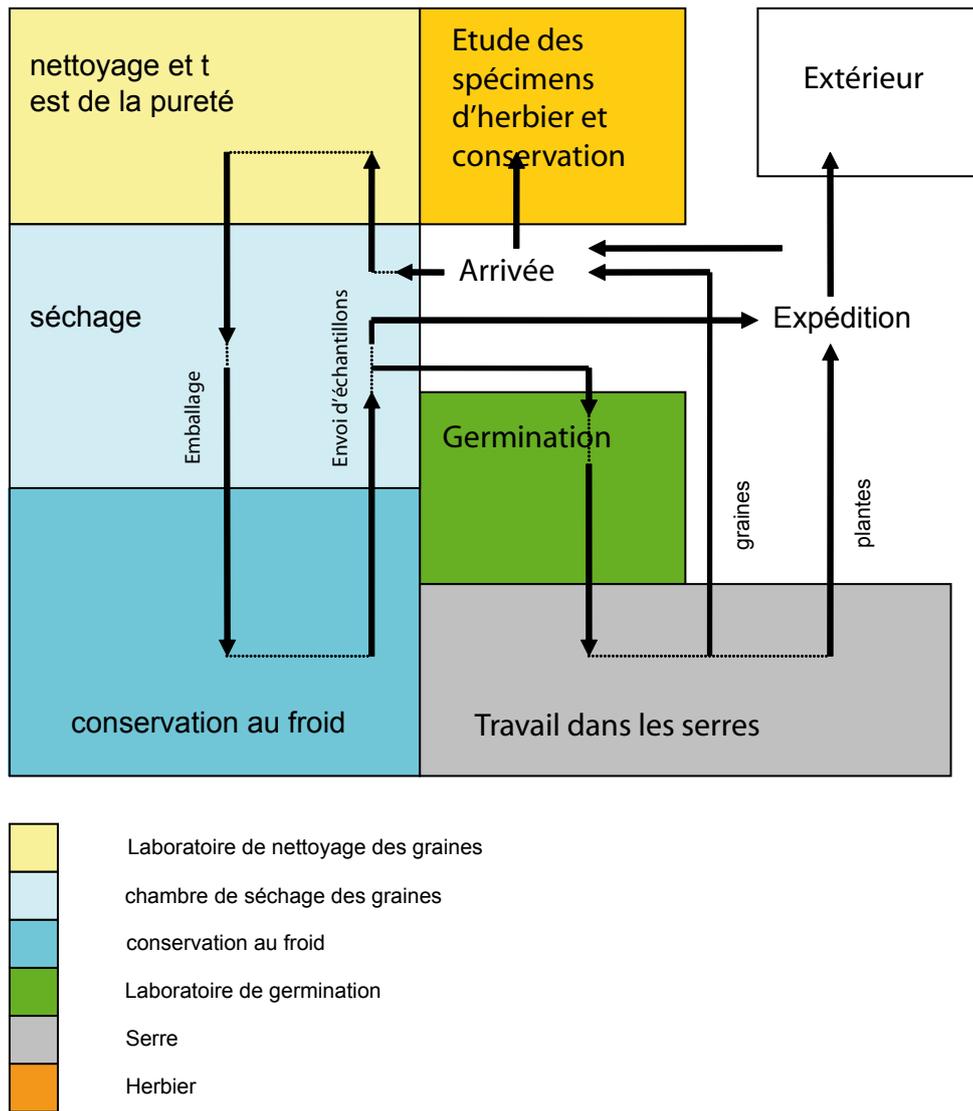


Figure 3 Diagramme des principaux équipements et procédés de la banque de graines

CHAPITRE 1 NETTOYAGE DES GRAINES

Résumé rédigé par Gianni Bedini (Jardin Botanique de Pise) en s'appuyant sur les expériences de UVEG, MNHN, RBGK et du Jardin Botanique de Pise, et sur les discussions associées.

Commentaires généraux

Le nettoyage des graines est l'acte de supprimer toutes les parties et les tissus entourant les graines, ainsi que tout matériel n'appartenant pas à la plante (comme par exemple les insectes associés ou les particules du sol) et les graines des autres espèces (voir Information Technique du MSBP 14 <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/14-Seed%20cleaning.pdf>). Bien que demandant beaucoup de temps et nécessitant de l'expertise, un espace de laboratoire conséquent et des équipements spécifiques pour être mené de manière efficace et minutieuse, le procédé est bénéfique de plusieurs manières :

- Cela économise de l'espace dans la conservation à froid. Si le nettoyage est effectué avant le séchage, cela économise également l'espace et réduit le séchage requis dans la chambre de séchage/ cabinet.
- Cela aide l'inspection visuelle des lots de graines pour les graines vides, immatures, endommagées ou infestées (qui sont inutiles dans un but de conservation) et leur élimination ultérieure.
- Cela supprime les pathogènes (champignons, bactéries et virus) qui sont plus souvent transportés dans les débris de la plante que dans la graine. Cela est en accord avec les réglementations phytosanitaires simplifiées quand les graines sont envoyées aux utilisateurs.
- La quantité de graines peut être plus correctement déterminée avec des lots de graines nettoyés que non nettoyés.

Idéalement, tous les lots de graines devraient être nettoyés minutieusement jusqu'à ce que toutes les parties de plantes accompagnante aient été supprimées. Dans la pratique, ceci n'est pas possible pour toutes les espèces spécialement celles avec certains types de fruits et les petites graines. Les fruits déhiscentes et les grandes graines sont relativement faciles à nettoyer. Séparer des graines minuscules des fragments de péricarpe de taille, forme et densité comparables peut se révéler être trop difficile pour être réalisé dans un temps donné. De la même façon, extraire des graines de fruits indéhiscent (samares, akènes et amandes) peut prendre trop longtemps ou peut provoquer des dommages à la graine. Dans ces cas, il peut être nécessaire de mettre en banque les récoltes aussitôt reçues et de les enregistrer dans l'ordinateur.

Les graines d'espèces sauvages devraient être la plupart du temps nettoyées manuellement mais l'usage d'équipement de nettoyage mécanique est acceptable. Les procédés automatiques, communs aux traitements des graines agricoles, horticoles et forestières ne sont pas appropriés pour le nettoyage d'un grand nombre de collections de graines sauvages petites et variables (en taille et en morphologie). Le temps pris à nettoyer l'équipement automatique entre les échantillons pour éviter la contamination croisée n'est pas rentable avec de grands nombres de petits échantillons. Certaines collections, spécialement celles provenant de populations d'espèces menacées, peuvent avoir seulement un faible nombre de graines. De plus, l'équipement peut avoir besoin d'être calibré pour chaque différente espèce et ne peut pas faire face à beaucoup de variabilité dans les formes de fruits/ graines, taille et poids à l'intérieur des échantillons. En s'appuyant sur les études réalisées avec les graines d'espèces cultivées, certains types d'équipements peuvent causer des dommages mécaniques à la graine tels que la longévité est réduite.

Le nettoyage de graines d'espèces sauvages requiert une plus grande compétence que beaucoup pourraient s'y attendre. L'équipe a besoin de quelques connaissances sur la morphologie des fruits et des graines au niveau de la famille et de savoir comment interpréter les structures sous le microscope tel que les techniques appliquées au nettoyage des graines suppriment les structures qui ne sont pas nécessaire pour la conservation et ne causent pas de dommages. L'adaptation des techniques pour différents types de fruits/graines est donc la clef d'un bon nettoyage des graines.

La plupart des nettoyages des graines sont facilités par le séchage. Les exceptions sont les fruits charnus pour lesquels l'extraction des graines avant séchage est recommandée.

Bien que des procédures de nettoyage simple puissent être mises en œuvre dans la nature juste après la récolte, la plupart des opérations seront mieux accomplies en laboratoire avec une paillasse adéquate, une protection contre la poussière et les équipements suivants :

Tamis, pilon & brosses

Système d'extraction de la poussière

et/ ou masques

Gants en caoutchouc

Aspirateur à graines (souffleuse)

Binoculaire & matériel de dissection

Equipement de lavage

Poubelle à débris



Figure 4 Laboratoire général de nettoyage de graines. (© RGBK)

CHAPITRE 1A. ÉQUIPEMENT ET OPÉRATIONS COMMUNES

commentaires généraux

Tamis, pilons & brosses

Des tamis d'acier inoxydable de diverses tailles de maillage métallique sont généralement utilisés dans les banques de graines. Ils permettent la séparation des graines des impuretés associées en deux fractions ou plus. Les objets plus grands que la taille de la maille resteront dans le tamis alors que les autres passeront au travers. Si les débris sont plus grands que les graines, alors une taille de maille légèrement supérieure aux graines peut être utilisée pour récolter les débris dans le tamis et les graines propres dans le plateau placé dessous. Si, à contrario, les débris sont plus petits que les graines, alors une taille de maille légèrement inférieure aux graines peut être utilisée pour récolter les graines nettoyées dans le tamis et les débris en dessous. Une combinaison de différentes tailles de tamis peut être utilisée pour séparer les graines de petits ou grands débris. Cette méthode ne fonctionne pas si les débris sont de la même taille que les graines. Dans ce cas, les graines doivent être conservées avec les débris ou séparées par une autre méthode e.g. en faisant rouler la collection sur une surface inclinée, ou en utilisant une souffleuse (voir ci-dessous).



Figure 5 Nettoyage des graines en utilisant le tamis et le pilon. (© RGBK)

Les lots de graines non nettoyés peuvent être doucement frottés contre le tamis avec un pilon en caoutchouc. Le frottement aide en cassant les débris fragiles, les amenant à tamiser à travers la maille, mais le frottement vigoureux peut endommager les graines en les serrant ou en rompant contre la maille. Si les graines sont fragiles, elles peuvent être frottées à la main : dans ce cas, le technicien devrait porter des gants en Latex ou PVC pour protéger les doigts tout en gardant une sensibilité suffisante pour sentir les graines sous le bout des doigts.

Les graines doivent être inspectées avec un microscope binoculaire pour voir les dommages : si des dommages tels qu'une abrasion excessive de l'enveloppe de la graine ou rupture des caryopses de Poaceae ou des akènes ovales d'Asteraceae sont notés, alors un frottement léger devrait être appliqué. Il est également important de vérifier les différentes fractions : s'il y a un mélange de débris et de graines intactes, alors les faire passer de nouveau à travers le tamis.

Les tamis, plateaux et plans de travail/bancs doivent être nettoyés avec soin entre les différents lots de graines pour éviter les contaminations croisées. Une brosse en acier est la meilleure des options pour nettoyer les tamis.

Systemes d'extraction des poussières ou masques

Spécialement pour les graines tamisées/soufflées ou les fruits secs, un lot de poussières est produit, composé de fines particules qui peuvent être inhalées par les techniciens et déposées sur l'équipement de laboratoire. Certaines de ces poussières peuvent causer une irritation pulmonaire ou une allergie. Par conséquent, les opérations de nettoyage de graines devraient avoir lieu sous une hotte aspirante avec un filtre à poussière ou dans un espace fermé et réalisées par une équipe portant des masques anti-poussière (dans un standard approprié e.g. EN 149: 2001 FFP3). Bien sûr, la protection étant assurée par le filtre, les filtres des hottes et les masques anti-poussière devraient être régulièrement remplacés.

Aspiration des graines (souffleuse)

Cet équipement permet la séparation des graines des débris en se basant sur la différence de densité. Il génère un courant d'air ajustable qui passe à travers le lot de graines placé sur un fin grillage installé dans un cylindre creux. Le courant d'air capture les matériaux « légers » qui s'envolent le long du cylindre et sont récoltés dans le piège à déchets sur le dessus du cylindre, pendant que les matériaux « lourds » resteront dans le cylindre. Cela est basé sur le même principe qu'en soufflant, mais c'est plus fiable car le courant d'air peut être ajusté à la valeur désirée.

Il est important de vérifier que la séparation est aussi efficace que pratiquement possible, laissant toutes les graines bien formées sur la maille et tous les débris (i. e. dépourvu des graines potentiellement viables) dans le capteur de débris. Ceci peut être obtenu via un ajustement précis du courant d'air, établi par essais erreurs. Avec un petit échantillon dans le panier, le courant d'air est



Figure 6 Hotte d'air pur pour le nettoyage des graines. (© RBGK)

initialement réglé à faible vitesse, juste assez pour soulever quelques débris jusqu'au capteur de débris, comme peut être jugé en regardant dans le cylindre, généralement fabriqué dans un matériau transparent. Les débris dans le capteur sont alors vérifiés sous loupe binoculaire pour voir les graines viables. S'il n'y a pas de graines transportées dans les débris, alors l'intensité du courant d'air peut être augmentée par de petits incréments et la procédure répétée. Lorsque les graines bien formées sont retrouvées dans le capteur de débris, le courant d'air doit être remis au précédent réglage. Souffler les graines peut être très efficace une fois appliqué après le tamisage.



Figure 7 Microscope binoculaire. (© RBGK)

Comme avec les autres techniques, les équipements (panier, cylindre, collecteur de débris) doivent être soigneusement nettoyés entre les différents lots de graines pour éviter la contamination croisée d'un échantillon par un autre. L'électricité statique peut se constituer, spécialement dans le cylindre, à cause de la friction générée par le courant d'air. Pour cette raison, des vêtements et des vaporisateurs antistatiques sont recommandés.

Microscope binoculaire & équipement de dissection

Un microscope binoculaire est utile dans beaucoup de tâches associées au nettoyage de graines, incluant la vérification de la pureté des échantillons, la vérification de la fraction des débris pour voir la présence de graines intacts, viables et pour des tests de coupé efficaces.

Les tests de coupé seront réalisés pour évaluer le nombre de graines « vides » (i.e. avec un manque ou une désorganisation de l'endosperme et/ou de l'embryon). Comme c'est un test destructif, il est exécuté sur un sous-échantillonnage (e.g. 50 graines) du lot de graines (voir également l'analyse au rayon X). Les graines dans le sous-échantillonnage sont coupées avec un scalpel ou un autre outil de dissection approprié et on vérifie la présence d'endosperme intact et d'embryon bien formé, il en résulte l'évaluation du ratio graines pleines/ vides. Si la proportion de graines vides est très haute e.g. >50 %, alors l'échantillon pourrait être nettoyé à nouveau, dans le cas où cela est réalisable, e.g., si l'équipe a du temps disponible.

Équipement de lavage

Les graines extraites de fruits charnus peuvent nécessiter un lavage rapide pour retirer les résidus du péricarpe encore attachés après extraction (voir ci-dessous). L'eau peut également être utilisée pour séparer les graines par flottaison : les graines vides flotteront alors que les pleines couleront. Cette méthode n'est généralement pas recommandée pour une utilisation en banque de graines car les graines séchées pourraient être affectées par une imbibition rapide.

Élimination des débris

Les déchets peuvent contenir des pathogènes et des graines viables d'espèces envahissantes. Si la banque de graines traite des matériaux exotiques, les deux points peuvent être une sérieuse menace aux écosystèmes natifs s'ils s'échappent de la banque de graines. Par conséquent tous les déchets devraient être précisément confinés dans



Figure 8 Poubelle de déchets de plantes pour incinération. (© RBGK)

la banque de graines : une bonne option est de les placer dans un sac en plastique clairement étiqueté « poubelles à débris ». Quand il est rempli, le sac peut être fermé hermétiquement et envoyé dans une aire autorisée de destruction des ordures. L'incinération médicale standard est le plus sûr moyen d'éviter la diffusion de matériel vivant, et il devrait être appliqué à chaque fois que cela est possible.

Nettoyage de fruits charnus

Les fruits immatures devraient être matures sous des conditions de haute HR avant que les graines soient extraites et séchées. Les graines peuvent être extraites en coupant, en cassant, en pressant le fruit ou en l'écrasant à travers le tamis. Un lavage à l'eau tiède devrait suivre si besoin pour enlever les résidus collants du péricarpe. Les graines sont alors étalées en une fine couche et placées dans la chambre de séchage. Si une couche de mucilage couvre les graines, le séchage permet de l'enlever facilement par une friction douce des mains.

Cas spécial 1 : chair de fruits collant

Daphne alpina subsp. *alpina* produit de petites drupes à chair très fine et collante. Lorsque les drupes sont écrasées à travers le tamis, les noyaux sont extraits entourés de résidus de péricarpe qui les font coller ensemble en formant des gros grumeaux. La chair collante ne se dissout pas et n'est pas enlevée par l'eau. Dans ce cas, une solution plus pratique consiste à faire rouler les noyaux dans de la cendre jusqu'à ce qu'ils soient complètement enduits. Alors, la chair devient moins collante et peut être enlevée par le frottement léger des fruits sur le tamis dont la taille de la maille est plus petite que les noyaux.

Cas special 2 : Fruits très matures dans la nature

La chair des fruits (e.g., les baies de Solanaceae) peut nécessiter un nettoyage partiel ou total si elle est très mature, ou a été endommagée ou écrasée durant la récolte, afin d'éliminer la fermentation avant le nettoyage. En utilisant un tamis ou de l'eau courante, autant de chair que possible devrait être retiré des fruits. Les graines devraient alors être placées dans la chambre de séchage ou, si c'est sur le terrain, laissées à l'air sec sur une fine maille ou sur un papier filtre épais jusqu'à ce que la surface sèche avant de les emballer et de les transporter dans des sacs fermés.

Cas spécial 3 : fruits immatures lors de la dispersion

Les herbes des bois (e.g. *Anemone nemorosa*) et les espèces aquatiques (e.g. *Caltha palustris*) peuvent disséminer leurs fruits avec des graines immatures. Dans ce cas, les graines ne devraient pas être extraites immédiatement après la récolte ; les fruits devraient plutôt mûrir dans des conditions de haute HR (après maturation) avant que les graines en soient extraites.

Nettoyage de graines sèches

Les frutescences de graines sèches sont généralement nettoyées par la méthode des tamis et pilons. Les frutescences de graines sont placées dans un tamis avec une taille de maille appropriée, afin d'éviter que les graines passent au travers puisqu'elles sont roulées avec le pilon jusqu'à ce que les graines soient libérées et inertes, les matériaux secs sont broyés en petites parties qui passent à travers le tamis.

Si utilisé trop vigoureusement, le pilon peut endommager les graines. Il est donc important de vérifier les graines pendant qu'elles sont nettoyées ; si un dommage quelconque est observé, alors une pression plus délicate doit être appliquée. Ceci est spécialement vrai pour les graines fragiles qui peuvent se décomposer quand pressées contre la maille. Dans ce cas, les graines peuvent être roulées à la main. Des gants en PVC ou Latex peuvent être portés pour protéger les doigts.

Le tamisage se poursuit jusqu'à un point final raisonnable. Si un nettoyage supplémentaire conduit à des dommages sur les graines, ou demande beaucoup trop de temps, alors une autre technique

peut être appliquée au lot de graines, telle que la vannerie. La récolte peut également être mise en banque dans un état imparfait et ce fait est enregistré dans la base de données. Si approprié, les sous échantillons peuvent être nettoyés au moment où ils sont employés pour la germination ou la distribution.

Cas spécial 1 : fruits secs déhiscent

Les graines qui ont été collectées entièrement matures à l'intérieur de fruits ou capsules volumineux secs sont rapidement et franchement nettoyées en ouvrant prudemment les fruits et en séparant les graines à la main. Les capsules, siliques, gousses peuvent être fendues le long de leur ligne naturelle de déhiscence et secoué doucement ou « extraits » sur un plateau pour produire leur graines sans contaminants : avec quelques précautions, cette tâche peut être exécutée efficacement sur le terrain. Dans le cas de fruits déhiscent brusquement, ils doivent être gardés dans un plateau ou une boîte couverts avec du papier ou un carton pour prévenir leur perte.

Cas special 2 : fruits secs indéhiscent

Les fruits tels que les amandes, les akènes et samares sont disséminés comme des diaspores et devraient être conservés comme tels. En règle générale, l'enlèvement de n'importe quelle structure de l'unité de dissémination naturelle (comme les ailes, les poils, les ...) en particulier lorsqu'elle fait partie intégrante ou qu'elle y est étroitement attachée, devrait être traitée avec précaution et si possible éliminés car susceptible d'endommager la graine.

Analyses aux rayons X

Cette technique permet la vérification des graines vides ou endommagées / infestées ou du nombre de graines dans un fruit ne pouvant être nettoyé. C'est une alternative de haute technologie au test du coupé, requérant un équipement spécifique (machine de rayon X et en cas d'appareil non numérique, des consommables pour appareil photo, une chambre noire et une boîte de lumière) et une équipe formée. En comparaison avec les simples tests du coupé, cela permet des évaluations plus rapides, plus exacte et mieux documentées. Bien que non destructive, comme précaution contre les dommages génétiques, seulement un sous-échantillonnage de la collection est testé et ces graines ne sont pas remises dans la collection principale. Les graines passées aux rayons X pourront être utilisées pour les tests de germination (les résultats du test devraient être égaux ou moins bon que ceux effectués sur des graines non traitées mais noter un changement du potentiel génétique du matériel).



Figure 9 Rayon X d'*Albizia bernieri* montrant des graines vides, infestées par les vers et saines. (© RBGK)

Les éléments possibles d'un lot de graines et leur apparence au test du rayon X :

	Composition du test de viabilité	Apparence du test au rayon X
Graines non dormantes*	Oui	remplies
Graines dormantes*	Oui – Utiliser un test au Tétrazolium ou l'apparence générale pour distinguer de la graine morte	remplies
Graines mortes	Oui	remplies
Graines vides	Non- exclus	vides
Graines endommagées par les insectes	Non- exclus unless damage is superficial	Endommagées
Débris	Non- exclus	Débris

* Voir le [Chapitre 6](#) pour les définitions

$$\% \text{ viability} = \frac{(\text{graines non dormantes} + \text{graines dormantes})}{(\text{Total des graines} - \text{graines vides} - \text{graines endommagées par les insectes})} \times 100$$

Estimation de la quantité de graines

L'estimation de la quantité de graines est importante pour planifier l'utilisation des collections (tests de germination, duplication, conservation, protocoles de propagation, régénération, etc...)

The suggested procedure is as follows:

La procédure suggérée est la suivante :

- Peser la totalité du lot de graines
- Peser cinq échantillons de 50 graines
- Calculer le poids moyen de 50 graines
- Calculer la limite de confiance supérieure à 95% (LCS)
- Estimer le nombre de graines : (Poids totaux du lot de graines / LCS) x 50

Noter que la procédure suggérée mène à sous-estimer le nombre de graines ce qui est préférable à une surestimation qui se produirait avec un calcul plus simple impliquant seulement le poids (pds) d'un échantillon unique de 50 graines, i.e. (pds total du lot de graines / pds de 50 graines) X 50. Dans ce cas, si l'échantillon unique pesé était significativement plus léger que la moyenne, le résultat devrait être surestimé.

Une méthode alternative d'estimation de la quantité de graines serait de surveiller le poids de la collection.

CHAPITRE 2. SECHAGE DES GRAINES

Résumé écrit par by Costantino Bonomi (MTSN) basé sur la présentation faite par Robin Probert (RGBK) et les présentations additionnelles de UPM et NBGB ainsi que des discussions ultérieures.

Commentaires généraux

Un séchage approprié est la clé pour optimiser la longévité des graines de la plupart des espèces¹. On peut être tenté de penser que le refroidissement est la clé pour de la conservation des graines. Cependant, des modèles empiriques démontrent l'importance du séchage pour les espèces qui seront conservées à long terme.



Figure 10 Maturation series for *Fritillaria tubaeformis* showing natural point of dispersal. (© MTSN)

CHAPITRE 2A. HÉTÉROGÉNÉITÉ DES ÉCHANTILLONS ET VITESSE DE SÉCHAGE

Commentaires généraux

Graines et fruits devraient être collectés quand ils sont complètement mûrs et en général au point de dispersion naturelle (Figure 10). Bien sûr, dans le cas d'espèces hautement sérotineuses, (demandant du feu pour libérer la graine), les fruits seront collectés plusieurs années avant le point de dispersion naturelle. A l'inverse, certaines espèces possèdent des fruits subissant une brusque et rapide dispersion ou, comme c'est le cas chez les Orchidées, qui dispersent leurs graines avant que la capsule ne soit complètement déhiscente. Dans ce cas il peut être nécessaire de collecter les graines avant que la dispersion ait commencé. Les fruits peuvent alors être placés dans de bonnes conditions pour démarrer leur mûrissement afin qu'ils libèrent jusqu'à libérer leur graines dans un sac installé pour les récupérer.

Graines et fruits de la plupart des espèces sauvages sont caractérisés par une hétérogénéité dans leur phase de mûrissement. Cette variation pose des problèmes quand on applique des traitements post-récolte y compris le séchage. Un séchage rapide peut réduire drastiquement la longévité des graines qui ne sont pas arrivées à maturation (immature) et celles extraites des fruits charnus mûrs. Un certain nombre d'études récentes (Probert *et al.*, 2007 et revues de Hay &

¹ La plupart des espèces produisent des graines qui sont tolérantes à une dessiccation quand elles mûrissent. Celles-ci sont appelées les espèces « Orthodoxes ». Pour plus d'information sur la classification de la conservation des graines voir MSBP Technical Information Sheet 10 <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/10-Desiccation%20tolerance.pdf>; pour plus d'information sur l'effet du séchage sur la longévité des graines – voir Pritchard & Dickie, 2003; pour voir si des informations sont disponibles sur le statut d'une espèce donnée – voir Seed Information Database (Liu *et al.*, 2008: <http://kew.org/data/sid/>).

Probert, 1995 et Probert & Hay, 2000) montrent que la qualité des graines continuera à augmenter si les fruits et les graines immatures font l'objet d'un retard de séchage ou d'un séchage lent. De plus une étude récente faite à RBGK (Butler, *et al.*, 2009) a montré que les graines immatures sont remarquablement résilientes aux fluctuations de RH et ne peuvent pas non seulement pas se remettre de périodes à un RH intermédiaire mais aussi continuent de mûrir quand elles redeviennent de nouveau plus ou moins hydratées.

Recommandations

La maturation des fruits non mûrs (et donc de leurs graines) pendant 2-3 semaines en conditions similaires à celles de leur récolte est recommandée. En général ce procédé de maturation se manifestera par un changement de la couleur des fruits, souvent de vert à rouge ou couleur paille. La couleur des graines dans les fruits changera aussi pendant ce procédé, souvent de blanc à des couleurs plus sombres.

Pour les graines qui ont été extraites à partir de fruits, un séchage initial graduel à conditions ambiantes (60-70 % RH, 20-25 °C, pendant 1-2 semaines) est recommandé ; toutes les autres graines complètement mûres peuvent être séchées sous des conditions recommandées ci-dessous.

Si possible, graines et fruits qui sont à différentes étapes de mûrissement devraient être séparés en plusieurs sous-échantillons et les graines ou fruits immatures devraient pouvoir entrer en maturation et sécher comme décrit ci-dessus ; les graines mûres et les graines extraites de fruits mûrs sans chair devraient être séchées immédiatement (en conditions décrites et recommandées ci-dessous) pour minimiser la perte de viabilité. Il y a toujours une question ouverte concernant le taux auquel différentes graines atteignent l'équilibre en conditions de chambre sèche. L'équipe de la banque de graine devrait prendre un soin particulier pour s'assurer que les graines de grande taille avec épais manteau tégument épais sont convenablement séchées avant la mise en banque.

Priorité de recherche

Des estimations supplémentaires sur le taux de séchage des graines de différentes espèces seraient utiles.

CHAPITRE 2B. CIRCULATION DE L'AIR

Commentaires généraux

En mettant à part les graines extraites des fruits charnus des graines qui ne sont pas arrivées à maturation (voir plus haut), le taux de séchage devrait être raisonnablement rapide afin de minimiser le temps que les graines passent à un taux d'humidité élevé et pour maximiser les résultats de la méthode de séchage. Le taux de séchage est affecté par la vitesse de l'air au dessus de la surface de la graine. Un air plus rapide enlève l'humidité de la surface de la graine et maximise le gradient d'humidité (potentiel d'eau) entre l'extérieur et l'intérieur de la graine. Les graines gardées ensemble dans un grand sac large fermé, avec une circulation d'air faible, peuvent créer un environnement local humide qui peut nuire à leur longévité même si elles sont placées en conditions favorables de séchage.

Recommandations

Pour optimiser le taux de séchage, les graines devraient être étalées en couche mince avec une bonne circulation d'air au-dessus d'elles. Pour ce faire, une circulation d'air créée artificiellement peut être envisagée.

CHAPITRE 2C. MONITORING DRYINGSUIVI DU SECHAGE

Commentaires généraux

Pour évaluer la capacité de séchage, on préférera utiliser un équilibre d'humidité relative (eRH) créée par les graines à l'intérieur d'un espace clos plutôt que le contenu en humidité pour évaluer la capacité de séchage. Le eRH donne une mesure qui est indépendante du contenu en huile de la graine.

Si le contenu en huile des graines est connu, la teneur en humidité peut être déduit de la valeur eRH (voir: <http://data.kew.org/sid/viability/mc1.jsp>). Ceci évite l'utilisation d'une méthode de détermination destructrice de la graine pour déterminer sa teneur en humidité bien que cette dernière pourrait être utilisée si le contenu en huile est inconnu.

Voir Probert *et al.* (2003) pour une mesure générale de l'eRH. Voir Cromarty *et al.* (1990) pour la conversion de eRH en teneur en humidité et vice versa.

Recommandation

Use eRH to monitor drying (see below).

CHAPITRE 2D. CONDITIONS DE TEMPÉRATURE ET D'HUMIDITE UTILISEES POUR LE SECHAGE

Commentaires généraux

Le séchage à très hautes températures (>40 °C) n'est pas recommandé, en particulier pour de longues périodes. Il est prouvé qu'un séchage minutieusement contrôlé à hautes températures, tel que le séchage au soleil, ne nuit pas aux graines. Pourtant il y a un risque de surexposition des graines à hautes températures une fois qu'elles ont atteint le niveau d'humidité recherché. De plus, les graines de grande taille peuvent se fendre à de hautes températures de séchage. En général, les températures de séchage qui sont utilisées dans les banques de graines sont de l'ordre de 10-20 °C. Toutefois les avis divergent quant à la teneur finale en humidité qui doit être atteinte et de ce fait du niveau d'humidité relative qui doit être atteint pour un séchage optimum. De nombreuses banques de graines conservent des graines qui ont été au préalable séchées jusqu'à équilibre à environ un taux d'humidité relative de 15 % environ (approximativement 3.5 – 6.5 % de teneur en humidité selon le contenu en huile de la graine). D'autres banques de graines appliquent des taux de séchage plus importants (Pérez-García *et al.*, 2007 & 2008). Cependant, d'autres encore utilisent des niveaux d'humidité relative légèrement plus hautes (20-25 %) car le potentiel d'eau (équivalent au eRH) des graines emballées sachées à 15 % RH, pourrait théoriquement chuter en dessous du seuil optimum en vue d'un stockage à long terme quand les graines sont placées à des températures en dessous de 0 (Vertucci *et al.*, 1994). Il y a pourtant des preuves que ce dernier phénomène n'est pas universel ou toujours très marqué. Les arguments allant à l'encontre de ce phénomène viennent de l'utilisation d'autres méthodes expérimentales ou d'autres espèces utilisées. Ceci demeure l'une des plus grandes questions non élucidée en conservation des graines.

Recommandations

Les responsables des banques de graines ne peuvent pas attendre que la solution le problème de teneur en humidité optimum soit résolu. Pour l'instant il n'est pas possible de recommander une valeur générale de pourcentage d'humidité à utiliser dans tous les cas. Ainsi, jusqu'à ce que de nouvelles données soient disponibles, il est recommandé que les graines soit séchées jusqu'à un équilibre de 15 % d'Humidité Relative (approximativement 3.5 – 6.5 % du teneur en humidité selon le contenu en huile de la graine) à 10-20 °C dans le cas où elles seront stockées à des températures négatives. Un ultra-séchage à des niveaux d'humidité encore plus bas est recommandé si la conservation des graines est prévue à des températures positives.

Priorités de recherche

Des investigations ultérieures concernant les niveaux d'humidité à atteindre sont nécessaires pour gagner en clarté. Bien sûr il se peut que différentes espèces aient différentes valeurs de eRH optimum pour leur conservation.

Une expérience devrait être menée en collaboration avec différentes institutions pour fournir des données comparatives sur le stockage à différents niveaux d'humidité (en allant le plus possible vers des niveaux de séchage plus importants) afin d'estimer si une valeur générale par défaut de séchage peut être recommandée pour plusieurs groupes d'espèces taxonomiques ou différentes régions bio-géographiques montrant différents besoins écologiques. Le principal sujet de l'expérience devrait être les espèces à courte durée de vie dans les conditions d'une banque de graines. Le potentiel de longévité de ces espèces devrait être plus sensibles à l'impact des différentes conditions de séchage.

Les banques de graines devraient publier les données de leur stockage de graines (en incluant les conditions utilisées) soit dans des journaux vérifiés par des pairs, soit dans des revues techniques ou en ligne par exemple a (Liu *et al.*, 2008: <http://kew.org/data/sid/>).

Equipement suggéré

Chaque partenaire devrait sélectionner au moins une espèce (si possible plus) qui présente des graines orthodoxes conservées à court terme, avec des caractéristiques de germination connues et des lots de graines de grande taille. Ces lots de graines devraient être sujets à différents régimes de séchage suivi par un contrôle du vieillissement et de la germination. Par exemple, les lots de graines pourraient être séchés à trois différents niveaux d'humidité (25, 15 et 5 % RH) à la température de 15 °C. Ces niveaux d'humidité correspondent plus ou moins à trois niveaux recommandés par différentes banques telles que le National Center for Genetic Resources Preservation a Fort Collins, USA, les standards des banques de graines FAO / IPGRI (1994) très utilisés et les ultra drying (utilisé par les banques comme UPM). Les graines pourraient ensuite être conservées à différentes températures : 30, 5 et -20 °C. La viabilité de ces graines devrait être estimée à intervalle de 6 mois sur 10 ans en utilisant 4 réplicats de 25 graines par test. Le nombre total de graines par partenaire et par espèce sera ainsi de $3 \times 3 \times 21 \times 4 \times 25 = 18900$ graines. Les valeurs de P_{50} pourront alors être identifiées et comparées entre toutes les espèces ainsi analysées.



Figure 11 Incubateur de séchage. (© UPM)



Figure 12 Chambre de séchage. (© MAICh)

CHAPITRE 2E. EQUIPEMENT POUR LE SÉCHAGE

Commentaires généraux

Les méthodes décrites font appel à :

(a) des conteneurs scellés avec des agents de séchage. Ces agents sont des substances hygroscopiques, telles que le silica gel, utilisées pour enlever la vapeur d'eau de l'air. Cette méthode est bon marché mais le contrôle du taux final d'humidité est assez imprécis (autre que les méthodes à forte main-d'œuvre) car dépendaient du rapport graine:gel, du taux d'humidité du gel, et du temps. Elle peut être utilisée pour des collections relativement petites.

(b) Incubateurs. Une méthode efficace pour sécher les graines est d'employer certains types d'incubateurs où l'humidité peut être contrôlée à des valeurs basses. Ces valeurs sont enregistrées en utilisant une sonde. En pratique, une petite chambre de séchage (voir ci-dessous) est créée. L'air circule au sein de l'incubateur au moyen d'un ventilateur. Cette méthode permet le contrôle final de l'humidité avec des écarts assez faible ; elle est utilisable avec des quantités de graines plus importantes que pour la méthode précédente (a).

(c) Chambre de séchage. Ceci représente la solution la plus chère mais elle est conseillée pour les banques à grande activité. La chambre peut être ajustée à une RH et à des conditions de température données en utilisant les dessiccateurs d'adsorption et un équipement de refroidissement. Ces moyens de séchage utilisent normalement du silica gel ou du Chlorure de Lithium (LiCl) comme agents de séchage. Ces agents sont connectés à l'équipement de refroidissement et ainsi à une chambre bien isolée via des canalisations (processus de circulation d'air). Une autre série de canalisations permet à l'humidité d'être ôtée pendant la phase de régénération automatique dans le sècheur par l'intermédiaire d'un tuyau qui sera connecté à l'extérieur du bâtiment. Le taux de régénération du dessiccateur est mesuré par un hygromètre à l'intérieur de la chambre de séchage. Les collections peuvent être laissées dans la chambre de séchage jusqu'à ce que l'équipe de la banque de graine en ait besoin. Voir les travaux de Linington (2003) concernant la conception des chambres de séchage (http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_33.pdf).

(d) Conteneurs scellés avec une solution saturée en sel. Les solutions saturées en sel telles que le Lithium Chloride génèrent une RH spécifique dans un environnement fermé et la maintiennent activement en absorbant et relâchant la vapeur d'eau. Le Lithium Chloride est utile car il est relativement insensible à la température. Les graines placées dans le conteneur mais au-dessus de la solution (sur une plateforme) sécheront jusqu'à équilibre avec la RH à température ambiante. Cette approche pourrait être utile pour de petites quantités de graines en prenant toutes les précautions lorsque la solution est versée. Certains produits chimiques peuvent être dangereux tel que le Chlorure d'ammonium et le nitrite de sodium.

Recommandations

Le séchage à la chaleur ou dans un four n'est pas recommandé.

Il est recommandé d'utiliser une chambre dédiée au séchage qui peut être ajustée à une valeur donnée est le choix recommandé. Ceci est l'installation clé des banques de graines modernes pour un moyen ou grand apport annuel de graines (de quelques centaines à quelques milliers d'accessions par an). Cette solution est flexible et peut être adaptée à la plupart des applications.

Les techniques de séchage par gel ont été brièvement abordées lors de l'atelier, concluant qu'il n'y a pas assez de données sur les résultats de cette technique pour le moment. Il y a également un risque de gel des échantillons humides qui pourraient mettre en danger la conservation à long terme des graines. Par précaution cette méthode n'est pas recommandée pour le moment.

Pour les opérations se déroulant à petite échelle, nécessitant de petites quantités d'accessions (moins de 100 par an), une variété d'agents dessiccateurs peut être utilisée tel que le silica gel ou même des graines grillées ou du charbon. Dans tous les cas, les agents dessiccateurs devront être séchés dans un four avant utilisation, et surveillés pendant le processus de séchage pour s'assurer qu'ils sont toujours actifs. Des renseignements sur la construction, l'aménagement, les équipements de séchage et les incubateurs sont disponibles ainsi que les kits de séchage tels que le RBGK's mini seed bank (voir: <http://shop.kew.org/kew-mini-seed-bank.html>). Voir aussi les aménagements utilisés par UPM a http://www.etsia.upm.es/banco_germoplasma/inicio_bgv_archivos/Page497.htm.

Le ratio dessiccateur/graine souhaité pour le séchage sécurisé des graines (et éviter le sur-séchage) dépend beaucoup du taux d'humidité des la graines au début du séchage. Les graines récemment collectées avec un taux d'humidité très élevé ont besoin de grandes quantités d'agents dessiccateur ayant besoin d'être renouvelés avant que les graines soient sèches. Il est ainsi recommandé un séchage sous conditions ambiantes pendant 2-3 jours afin d'enlever l'eau libre (qui est facilement perdue) avant le séchage par un agent dessiccateur. Les graines devraient être placées dans un container fermé au-dessus d'une couche du dessiccateur choisi.

La capacité de rétention d'eau des dessiccateurs varie. Si le silica gel est utilisé, un rapport de 1:1 par volume de dessiccateur/graines devrait permettre aux graines d'être séchées à moins de <30 % eRH (Probert, 2003) ce qui fournira un milieu sûr pour le stockage à moyen terme de la plupart des espèces. Pour le charbon, un rapport de 3:1 sera nécessaire.



Figure 13 Silica gel drying bin. (© RBG Kew)

CHAPITRE 3. SUIVI DE L'HUMIDITÉ

Résumé rédigé par Robin Probert (RBGK) basé sur la présentation de Costantino bonomi (MTSN), une autre présentation par PAV-UNI et les discussions ultérieures.

CHAPITRE 3A. MESURE DE L'HUMIDITÉ RELATIVE À L'ÉQUILIBRE

Commentaires généraux

L'avènement au cours des dix dernières années de capteurs d'humidité relative fiables a transformé notre capacité à suivre efficacement l'humidité à différentes étapes du processus de conservation des graines. Les sondes d'humidité relative sont au cœur des systèmes de contrôle utilisés dans les chambres sèches, et leur fonction est d'avertir lorsque le matériel tombe en panne ou si les conditions de séchage sortent des normes. Sans doute le progrès le plus important de ces dernières années dans la technologie de conservation des graines a été l'utilisation systématique de sondes d'humidité relative fournissant un moyen de suivi de l'humidité des graines (voir MSBP Technical Information Sheet 5. <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/05-eRH%20moisture%20measurement.pdf>). Ces sondes mesurent l'humidité relative de l'air en équilibre avec un échantillon de graines. Si nécessaire, l'humidité relative mesurée à l'équilibre (eRH) peut être liée à la teneur en humidité des graines en faisant référence à une isotherme de sorption de l'humidité.

L'avantage principal de ces méthodes, par rapport à la détermination classique du taux d'humidité, est que le test est généralement non-destructif et donc les précieuses graines ne sont pas gaspillées. Un autre avantage est que la valeur mesurée n'est pas dépendante du contenu en huile de la graine, car des graines ayant différentes teneurs en huile équilibrées dans les mêmes conditions d'humidité relative et de température ont une teneur en humidité différente mais le même état d'hydratation (potentiel hydrique).

Toutefois, les instruments pour une mesure non-destructive de l'humidité des graines ne signifient pas qu'une détermination conventionnelle du taux d'humidité soit désormais superflue. La mesure gravimétrique de la teneur en humidité (pour des informations générales voir ISTA, 2008) joue encore un rôle important dans la plupart des banques de graines et, lorsqu'elle est combinée avec les valeurs d'humidité relative à l'équilibre, déterminée sur une gamme de niveaux d'humidité et à une température donnée, est la base pour construire des isothermes de sorption d'humidité.

Toute une série d'instruments manuels de bureau relativement peu coûteux sont maintenant couramment utilisés dans les banques de graines pour suivre le niveau d'humidité des graines pendant et après le séchage de celles-ci, ainsi que pour la recherche. Seuls les hygromètres à point de rosée fournissent une mesure directe d'un paramètre psychrométrique de l'air à l'équilibre : la température du point de rosée (pour plus de détails sur les propriétés psychrométriques de l'air, voir Probert, 2003).

D'autres hygromètres ont tendance à s'appuyer sur le changement physique ou chimique dans une substance qui est directement lié à un changement du taux d'humidité par rapport à un étalon calibré. Ces instruments comprennent des capteurs hydrolytiques, de capacitance et résistifs. Les hygromètres digitaux modernes fonctionnent avec un logiciel qui calcule les unités exigées à partir de principes psychrométriques. Ainsi des affichages de type humidité relative (% HR); activité de l'eau (AW); potentiel hydrique (MPa), et point de rosée (° C) sont monnaie courante.



Figure 14 Série d'hydratation du silicagel. Hydratation totale à partielle (de gauche à droite) (MTSN)

Les instruments avec des chambres conçues pour des échantillons de graines ou d'autres matériaux hygroscopiques ont tendance à mesurer eRH, ou l'activité de l'eau (identique à eRH mais exprimée sur une échelle de 0 à 1).

Recommandations

Hygromètres de type sonde

Des hygromètres météorologiques (de type sonde) peuvent être utilisés pour mesurer l'eRH des graines à condition que le capteur soit équipé d'un joint étanche à l'extrémité de la sonde et que le capteur lui-même puisse être mis dans une chambre à échantillon adéquate, également à travers un joint hermétique.

Enregistreurs autonomes de données

Des enregistreurs miniatures de RH/température peuvent être utilisés pour enregistrer l'eRH d'échantillons de graines à l'intérieur de récipients hermétiques. Ces instruments peuvent être utilisés par exemple dans le suivi du comportement de collections de graines lorsque les récipients contenant les graines sont déplacés de température ambiante vers des températures en dessous de zéro et vice versa.

Les enregistreurs de données peuvent aussi être utilisés pour surveiller le niveau d'humidité des collections de graines en transit. Situés parmi les graines à l'intérieur d'un sac de toile ou parmi des collections mises en boîte pour l'expédition, les enregistreurs de données peuvent fournir des indices importants pour expliquer la qualité finale des collections arrivant à une banque de graines.

Hygromètres mécaniques et électroniques à faible coût

De petits hygromètres électroniques ou mécaniques peuvent être achetés pour moins de 50 Euros. Bien qu'ils soient généralement beaucoup moins précis, ces instruments pourraient être utilisés pour déterminer approximativement le niveau d'humidité des graines. Placés parmi les collections de graines pendant une mission de récolte, ils pourraient être utilisés pour indiquer si certaines collections doivent être davantage séchées. Les instruments pourraient également être utilisés pour vérifier que les conditions ambiantes sont adaptées pour le séchage, et ultérieurement pour confirmer que le séchage a bien eu lieu.

Silica gel à indicateur

Un moyen ingénieux et très bon marché de suivre le séchage des graines est d'utiliser en substitut du silica gel indiquant l'humidité. Des grains de silica gel mises à l'intérieur de sachets poreux peuvent être placées parmi les graines pendant le séchage. Lorsque les graines séchent, le silica gel perd de l'eau et change de couleur.

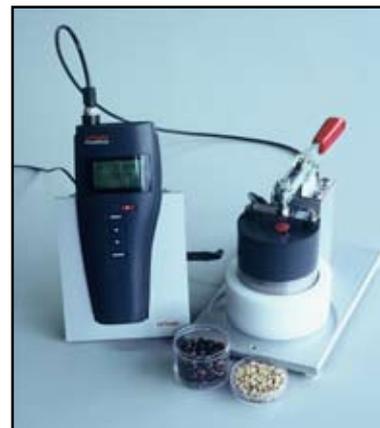


Figure 15 Hygromètre Rotronic pour mesurer l'eRH d'échantillons de graines. (© Rotronic Instruments (UK) Ltd)



Figure 16 Enregistreur de données notant l'eRH dans un récipient hermétique de graines. (© RBGK)



Figure 17 Gamme d'hygromètres mécaniques et électroniques. (© RBGK)

Priorités de recherche

Deux problèmes ont émergé pendant et après l'atelier ; ils devraient être envisagés pour les travaux futurs.

Base de données de la teneur en humidité des graines

Comme la plupart des banques de graines enregistrent régulièrement le contenu en eau des graines et qu'un nombre croissant de banques enregistrent également systématiquement les valeurs de eRH, il serait utile de compiler ces informations dans une base de données partagée (par exemple la base de données ENSCONET). Etant donné que la teneur en eau à une eRH donnée est un bon indicateur de la teneur en huile des graines, une telle base de données augmenterait de manière significative notre compréhension de la distribution taxonomique des graines oléagineuses.

Drying problems in certain species

Les preuves rassemblées par RBGK indiquent que les espèces de certaines familles comme les Fabaceae, en particulier les espèces à grosses graines, peuvent être lentes à sécher. Le risque potentiel est que les collections de graines pourraient être mises en banque avant qu'elles ne soient complètement sèches. Ce problème est aggravé par les difficultés décrites ci-dessous pour obtenir des mesures précises de l'eRH pour de telles graines, sauf si elles sont écrasées.

Des données supplémentaires sur la teneur en humidité et l'eRH de graines pendant le séchage et au moment de la mise en banque doivent être recueillies pour les familles ciblées.

CHAPITRE 3B. L'UTILISATION D'HYGROMÈTRES POUR LE SUIVI DE L'HUMIDITE DES GRAINES

Commentaires généraux

Un certain nombre de sources d'erreurs possibles doivent être prises en compte lorsqu'on utilise des hygromètres pour le suivi de l'humidité des graines.

Graines à tégument imperméable

Par mesure de précaution, il est recommandé de couper les graines à dormance physique (enveloppe de la graine imperméable à l'eau, voir tableau 1) ou de les écraser juste avant la mesure. Pour éviter le gain ou la perte rapide d'eau dans les graines suite à l'exposition des tissus intérieurs, il est extrêmement important de transférer les graines écrasées dans la chambre d'échantillon de l'hygromètre le plus rapidement possible. L'inconvénient évident de ces traitements est la destruction des graines.

Tableau 1. Familles contenant des genres connus pour avoir une dormance physique. Pour plus de détails se référer à Baskin (2003)

Anacardiaceae
Bixaceae (comprenant Cochlospermaceae)
Cannaceae
Cistaceae
Convolvulaceae (comprenant Cuscutaceae)
Cucurbitaceae
Dipterocarpaceae (sous-familles: Montoideae et Pakaraimoideae mais pas Dipterocarpoideae)
Fabaceae (sous-familles: Caesalpinioideae, Mimosoideae et Papilionoideae)
Geraniaceae
Malvaceae (comprenant Bombacaceae, Sterculiaceae et Tiliaceae)
Nelumbonaceae
Rhamnaceae
Sapindaceae
Sarcolaenaceae

Sélection de la chambre d'échantillon et taille de l'échantillon

Idéalement, on choisira la plus grande chambre d'échantillon qui puisse être complètement remplie avec les graines à tester. Lorsque la taille de l'échantillon est limitée, la règle empirique suivante est recommandée. Une chambre d'échantillon doit être choisie de telle sorte que le poids des graines exprimé en grammes, soit au moins égal à 10 % du volume total exprimé en cm³. Par exemple, pour une chambre d'échantillon de 70 cm³, le poids des graines devrait être d'au moins 7 g (voir Probert *et al.*, 2003 pour plus de détails).

Mesure d'échantillons non-équilibrés

Quand on mesure l'eRH ou l'activité de l'eau de graines non-équilibrées (par exemple des graines qui sont en train de sécher activement), il est extrêmement important de laisser suffisamment de temps aux graines pour atteindre l'équilibre à l'intérieur de la chambre d'échantillon de l'hygromètre. Afin de donner suffisamment de temps, il est fortement recommandé que les mesures soient enregistrées, si possible, ou au moins que les valeurs soient vérifiées et notées périodiquement, de manière à pouvoir tracer un graphique du temps pour atteindre l'équilibre.

Importance de la température

Nous savons, à partir des isothermes de sorption d'humidité, que les valeurs à l'équilibre dépendent de la température (ISTA, 2008). Par conséquent, s'il y a un écart entre la température des graines devant être mesurées et la température de la chambre d'échantillon de l'hygromètre, une valeur incorrecte sera enregistrée. Une telle situation pourrait se produire par exemple si un hygromètre à activité de l'eau était utilisé pour vérifier le niveau d'humidité des collections conservées dans une banque de graines. Habituellement de telles mesures seraient effectuées à température ambiante (ou à température de la chambre sèche). Si le lot de graines destiné à être testé n'était pas totalement équilibré à la température de la pièce, et était beaucoup plus froid, alors une valeur inexacte pourrait être enregistrée. Cette imprécision pourrait être supérieure ou inférieure à la valeur correcte en fonction de la rapidité avec laquelle les graines ont été transférées à la chambre d'échantillon et en fonction de l'humidité relative ambiante. Par exemple, si des graines très froides étaient exposées à l'air libre, même pour quelques minutes, il y a un risque important que des molécules d'eau soient absorbées à la surface des graines par condensation. Cette eau additionnelle serait vite perdue dans l'atmosphère de la chambre d'échantillon pendant la mesure et donnera ainsi une valeur inexacte plus élevée que la normale.

Si des échantillons de graines doivent être mesurés à une température différente de celle où ils ont été stockés, il est donc fortement recommandé que suffisamment de temps soit donné à l'échantillon pour s'équilibrer à la température de mesure, avant l'ouverture du récipient et le transfert de l'échantillon dans la chambre d'échantillon de l'hygromètre.

Recommandations

On recommandera les lignes directrices suivantes pour un suivi régulier en laboratoire du niveau d'humidité des graines (extrait de Probert Probert *et al.*, 2003) :

- Choisissez une taille de chambre d'échantillon adaptée pour minimiser l'espace au dessus de l'échantillon de graines.
- Le poids de l'échantillon en g ne doit pas être inférieur à 10% du volume total de l'espace en cm³.
- Si des graines sont connues pour posséder un tégument imperméable (présence de dormance physique), elles doivent être coupées, grossièrement moulues ou écrasées juste avant de les placer dans la chambre d'échantillon. Notez que le pilon et le mortier doivent être nettoyés et séchés entre deux échantillons.
- La température de l'échantillon de graines doit être entièrement équilibrée à la température de la chambre d'échantillon avant de commencer la mesure.
- Ne pas oublier que le corps humain libère constamment de la vapeur d'eau via la peau et l'haleine. Il faut donc minimiser la manipulation directe des graines, éviter de toucher les surfaces intérieures de la chambre d'échantillon et de respirer sur un capteur exposé.
- Les déclarations du fabricant pour le temps d'équilibrage doivent être prises avec une certaine réserve. Nous recommandons de prévoir au moins 30 min pour des mesures précises de graines qui sont dans un état d'humidité stable, et beaucoup plus long si on estime que les tissus internes et externes des graines ne sont pas à l'équilibre.
- Autant que possible, les mesures doivent être enregistrées et le temps final d'équilibrage devrait être interprété à partir de données graphiques.
- Les capteurs doivent être régulièrement étalonnés conformément aux recommandations du fabricant.

Plusieurs hygromètres sont conçus pour fonctionner aussi bien sur batterie que sur secteur et peuvent donc être utilisés sur le terrain. La tête du capteur peut être exposée à l'air (non attachée à la chambre de l'échantillon) pour donner des mesures de température et humidité relative ambiantes, et des échantillons de graines sur le point d'être récoltés peuvent être chargés dans une chambre d'échantillon de taille appropriée pour la mesure de l'eRH des graines.

CHAPITRE 4. CONDITIONNEMENT

Résumé rédigé par Costantino Bonomi (MTSN) basé sur la présentation par Cesar Gomez Campo (UPM), des présentations supplémentaires par RBGK et MAICh, et les discussions ultérieures.

Commentaires généraux

Un conditionnement approprié est essentiel pour garder les graines sèches et donc maintenir leur longévité au cours du stockage (voir Gómez-Campo, 2002). Les températures basses utilisées pour la conservation des graines sont souvent caractérisées par une humidité relative élevée qui augmente le risque d'infiltration de l'humidité dans les récipients des graines. Même si ce processus est très lent en raison des faibles températures, moyennant suffisamment de temps il finira par être préjudiciable aux graines. Pour la conservation à long terme il est donc essentiel de fournir une barrière efficace contre le transfert de vapeur d'eau. Si cet aspect devait être négligé, cela pourrait mettre en péril la protection globale des collections dans la banque de graines. Il est donc essentiel de choisir soigneusement des récipients étanches qui soient validés et de mettre en œuvre des systèmes permettant de surveiller leurs performances.

Le premier point à aborder est donc la sélection de récipients hermétiques appropriés (voir en particulier Gomez-Campo, 2002 et Manger *et al.*, 2003 pour une description des différents récipients). Très peu de matériaux sont complètement étanches. Le plastique mou (type PET) n'est pas recommandé ; le plastique dur (type PVC) pourrait être plus performant mais nécessite d'avantage d'investigation et il n'est actuellement pas recommandé. À l'heure actuelle, le verre est le matériau le plus performant selon les informations disponibles. Certaines préoccupations (voir Gómez-Campo, 2006) ont été exprimées quant à la barrière efficace fournie par les sachets en aluminium tri-laminé (polyester, aluminium et polyéthylène multicouche) sur de très longues périodes, mais ceux-ci sont encore largement utilisés dans les institutions de conservation des graines (voir aussi Walters, 2007 et Gomez-Campo, 2009). Un inconvénient est qu'ils ne peuvent pas être contrôlés par inspection visuelle car ils ne sont pas transparents.

Afin de surveiller l'efficacité des joints des récipients pendant la conservation à long terme, il est recommandé que de petits sachets de silicagel avec indicateur soient placés dans les récipients. Le silicagel présente l'avantage supplémentaire d'être capable d'absorber l'éthylène et d'autres gaz potentiellement nocifs produits par les graines elles-mêmes comme catabolites lors du lent processus de vieillissement. Il est important que les sachets de silicagel soient équilibrés aux conditions de séchage adoptées par la banque de graines, et ce pour éviter le risque de sur-séchage.



Figure 18 Sélection des types de conditionnement. (© NBGB, UPM, MAICh & RBGK).

D'autres points fondamentaux à aborder sont le joint du récipient et l'accessibilité du contenu, si des récipients pouvant être refermés sont utilisés. Le joint peut avoir besoin d'être périodiquement vérifié et remplacé. Il est recommandé d'utiliser des joints en caoutchouc naturel, ceux-ci ont montré de bons résultats lors des essais et de leur utilisation (données RBGK).

Divers récipients ont régulièrement subi un test d'étanchéité dans différentes banques de graines (voir ci-dessous pour la méthode) et ceci est une procédure recommandée qui devrait être effectuée par toutes les banques de graines afin de vérifier les variations de performance des récipients.

Il existe certaines preuves que les graines oléagineuses pourraient bénéficier d'un conditionnement sous vide, étant donné que l'oxygène dans l'air peut favoriser la peroxydation lipidique (voir aussi Ellis & Hong, 2007). Cependant, le conditionnement sous vide augmente également le risque d'infiltration d'humidité en raison de la pression négative ainsi que le risque de perforation dans le cas de fruits de forme irrégulière contenus dans les sachets d'aluminium. En outre, le froissement supplémentaire pourrait potentiellement augmenter les contraintes sur le sachet. Notez que le scellage sous vide d'autres récipients tels que des boîtes de conserves est possible.

Procédure pour le test de fuite

Introduire 1 g de grains de silica gel indicateur par 1 l de volume du récipient vide (0,1 %, rapport poids/volume). Le silicagel doit être séché à l'étuve et le récipient équilibré aux conditions de la chambre sèche. Placer les récipients à tester dans un environnement humide (boîte scellée contenant de l'eau) à température ambiante pendant minimum 4 semaines, puis transférer à -20 °C pendant au moins un an et de préférence aussi longtemps que possible. Au moins 10 récipients par lot doivent être testés et il est recommandé que le seuil de réussite soit fixé à 100 %. Une seule défaillance indique que le lot entier doit être rejeté.

Recommandations

- Choisir des récipients au moyen de l'arbre de décision illustré ci-dessous.
- Emballer les graines de préférence dans la chambre sèche ou dans un autre environnement à humidité contrôlée.
- Utiliser des récipients transparents en verre (les flacons et bouteilles à vis supérieure, ainsi que flacons et pots à crochets clips ont donné jusqu'à présent les meilleurs résultats dans les banques de graines existantes); éviter les sacs en plastique.
- Insérer un sachet de silicagel avec indicateur d'humidité dans le récipient pour le contrôle des performances des joints et comme protection contre les catabolites. Ces sachets doivent être en équilibre avec les conditions de séchage en application dans la banque de graines (généralement 15 % d'humidité). Faites une inspection annuelle de routine pour vérifier s'il y a des fuites.
- Vérifier et remplacerz périodiquement les joints (si d'application).
- Appliquer un double ou triple conditionnement (façon poupée russe) afin d'accroître la protection contre l'absorption de vapeur d'eau, en particulier pour les collections « de base » qui resteront intactes pendant de longues périodes.
- Tester l'étanchéité de lots de récipients en utilisant une procédure standard de test d'étanchéité.

Arbre de décision pour la sélection des récipients

1 Vous devez déplacer les accessions entre différentes institutions ou les transporter sur de longues distances	Utilisez des sachets en aluminium (faible poids et peu de risque de casse)
1 Vous devez stocker les accessions sans les déplacer sur de longues distances	
2 Vous visez le stockage à court terme	Utilisez soit des sachets en aluminium soit des récipients en verre
2 Vous visez le stockage de longue durée	
3 Vous devez accéder régulièrement à votre collection	Utilisez des récipients en verre, transparents et refermables, avec un système de contrôle des fuites, ou divisez la collection en plusieurs récipients en verre scellés à la flamme
3 Vous n'avez pas besoin d'accéder à votre collection	Utilisez des récipients en verre scellés à la flamme (pour les petites collections), adoptez un double conditionnement pour les récipients en verre refermable avec des sachets de silicagel à indicateur et une inspection régulière de routine, ou alors un double conditionnement de sachets d'aluminium de haute qualité et bien scellés.

Priorités de recherche

- Utiliser les départements universitaires en sciences des matériaux pour continuer à étudier les propriétés physiques de différents matériaux (y compris les plastiques durs) et des systèmes de fermeture des récipients, et ce pour la conception d'un récipient destiné à la conservation des graines à long terme, combinant des propriétés de résistance à l'humidité, l'accessibilité et un prix abordable.
- Obtenir davantage de données sur les effets de l'emballage sous vide des graines oléagineuses.

CHAPITRE 5. CONSERVATION DES GRAINES À LONG TERME : TEMPÉRATURE

Résumé rédigé par Elena González-Benito (UPM), suite à la présentation de Hugh Pritchard (RBGK), une présentation supplémentaire faite par MAICH et les discussions qui en ont résulté.

Commentaire général

Il est bien connu que la diminution de la teneur en eau des graines (voir [Chapitre 2d](#)) et/ou de la température de conservation augmente la longévité des graines orthodoxes (voir Roberts & Ellis, 1989; Pritchard & Dickie, 2003). Dès lors, l'usage d'une température de conservation en dessous de 0 °C (généralement entre -18 et -20 °C) est recommandé pour la conservation à long terme de la plupart des graines orthodoxes (FAO Gene Bank Standards, 1994; Rao *et al.*, 2006).

Tenant compte de cette recommandation générale, les sujets suivants seront discutés, ce qui devrait être utile pour la création d'une banque de graines dédiée aux espèces sauvages, en particulier lorsqu'il n'existe pas d'information publiée sur la conservation des graines : (1) la température de conservation à utiliser ; (2) l'identification des graines qui se conservent mal à -20 °C et des étapes qui peuvent être entreprises pour améliorer ce problème ; et (3) les opportunités et risques de la cryopréservation des graines.

CHAPITRE 5A. TEMPÉRATURE DE CONSERVATION

Commentaires généraux

Des équations de viabilité de graines ont permis de quantifier le bénéfice de l'usage de faibles températures pour la conservation des graines (Ellis & Roberts, 1980). Lorsque l'on diminue la température de conservation, la longévité des graines augmente. Cependant, le bénéfice se réduit lorsque la température diminue (Tompsett, 1986; Dickie *et al.*, 1990; Walters *et al.*, 2004). Un équilibre entre d'une part coût et effort technique et d'autre part longévité permettra de décider quelle température de conservation utiliser. La plupart des congélateurs conventionnels fonctionnent entre -18 et -20 °C. Cette gamme de température est donc souvent utilisée. Au sein de cette gamme de température de conservation, on recommande une teneur en eau des graines de 3.5 à 6.5 % (voir [Chapitre 2d](#)). Cependant, il est à noter le manque de données empiriques validant l'usage de telles températures conventionnelles de conservation comme équilibre optimum entre coût et longévité. Ceci étant dit, il semble improbable que diminuer la température sous les -35 °C ait un effet suffisamment positif sur la longévité pour justifier les coûts additionnels.

Des températures aussi basses que -196 °C, obtenues via la cryopréservation à l'aide d'azote liquide comme réfrigérant, peuvent être recommandées pour les graines à durée de vie peu longue résistantes à la dessiccation (Stanwood, 1985). Théoriquement, la longévité augmente d'un facteur 175 par rapport à la conservation conventionnelle à -20 °C (Dickie *et al.*, 1990; Pritchard & Dickie, 2003). Plus récemment, des travaux sur des graines sèches de laitue ont suggéré des demi-vies de 500 et 3400 ans dans l'azote gazeux et l'azote liquide, respectivement. Ceci est au moins 50 fois plus long que ce à quoi on s'attend avec des températures conventionnelles de conservation (Walters *et al.*, 2004). La cryopréservation pourrait aussi être recommandée pour la conservation des graines d'espèces en danger ou endémiques pour lesquelles seules de petites quantités de graines sont disponibles, ainsi que pour des tissus (embryons, axes embryonnaires, pousses apicales) de graines récalcitrantes.

Des preuves existent que certains graines orthodoxes peuvent tolérer pleinement une dessiccation du type de celle appliquée en banque de graines, mais perdent du potentiel de germination ou ont

une longévité plus courte que prévue après conservation à -20 °C ou à d'autres températures en dessous de zéro (Ellis *et al.*, 1990; Pritchard *et al.*, 1999). Par exemples, des graines sèches de *Cattleya aurantiaca* (Orchidaceae; Pritchard & Seaton, 1993) et *Cuphea carthagenensis* (Lythraceae; Crane *et al.*, 2003) ont montré une faible germination après conservation à -18 °C, sans doute suite à la transformation/cristallisation des lipides. Chez *C. carthagenensis*, la germination fut partiellement rétablie après traitement à la chaleur avant imbibitions (Crane *et al.*, 2003). Les traitements nécessaires pour rétablir la capacité germinative (si la graine n'a subi aucun dommage) pourraient être spécifiques à chaque espèce et inclure : imbibition plus lente ; imbibition à température plus élevée ; et pré-traitement à la chaleur avant imbibition (voir Pritchard & Nadarajan, 2008).

Recommandations

Une température de conservation en dessous de 0 °C (généralement entre -18 et -20 °C) est recommandée pour la conservation à long terme de la plupart des graines orthodoxes.

Pour une conservation conventionnelle à des températures non cryogéniques, diminuer la température sous les -35 °C apparaît comme n'ayant pas un effet suffisamment positif sur la longévité pour justifier les coûts additionnels.

Priorités de recherche

Suite à ce que nous venons de voir, si une espèce montre une faible germination après conservation à des températures négatives, cela ne veut pas nécessairement dire que les graines sont mortes ou que la conservation à ces températures est inappropriée. Il est important de procéder à d'autres études afin de clarifier la situation par rapport aux espèces.

Des traitements visant spécifiquement la levée de dormance et /ou l'imbibition nécessitent d'être étudiés. De plus, la conservation à des températures différentes pourrait être tentée.

Il serait utile d'avoir une étude examinant la rentabilité de différentes températures conventionnelles de conservation en dessous de zéro degré.

CHAPITRE 5B. CHOIX DE L'INFRASTRUCTURE À BASSE TEMPÉRATURE

Commentaires généraux

Chambre froide et congélateurs

Le choix entre une chambre froide et un congélateur (vertical ou bahut) dépend du nombre d'accessions et du volume de celles-ci (taille des graines). Lorsque le nombre est faible, l'utilisation d'un congélateur peut être souhaitable. Par rapport aux congélateurs bahut, les congélateurs verticaux ont l'avantage d'une meilleure accessibilité des accessions. Ils sont plus efficaces dans le sens où le nombre d'accessions par unité de surface de laboratoire est plus grand que pour les congélateurs bahut. Si l'on opte pour des congélateurs, il est conseillé d'avoir un congélateur de réserve en cas de panne.

Si la capacité dépasse 10-15 m³, alors une chambre froide est plus efficace (Cromarty *et al.*, 1990). Dans ce cas, deux petites chambres avec des systèmes de refroidissement indépendants peuvent être préférables qu'une seule grande chambre, en particulier si l'on n'a pas l'intention de remplir complètement l'espace de stockage dans un futur proche (voir aussi Linington, 2003 pour une discussion sur la conception d'une banque de graine).

Quel que soit le choix de l'infrastructure, il est important de garder à l'esprit qu'un étiquetage approprié/système de code barre est essentiel pour une récupération facile et rapide des

échantillons. Un repérage rapide des échantillons est particulièrement important lorsque les portes du congélateur doivent rester ouvertes. Le numéro d'accèsion, numéro de localisation (e.g. chez UVEG il s'agit de étagère / bac / récipient, tel que AB/04/10B – voir figure 19) et un code barre visible sur l'étiquette doivent être enregistrés dans la base de données de la banque de graines.

Collection de base, collection active et duplicata

Les banques de graines sont traditionnellement divisées en d'une part une collection de base à laquelle on ne touche pas pour la conservation à long terme, et d'autre part une collection active plus facilement accessible et dont les échantillons sont prélevés pour être utilisés. La collection de base est généralement conservée dans des conteneurs moins accessibles (verre scellé ou double conditionnement) et conservée dans des conditions de stockage à long terme. En revanche, la collection active est stockée dans des conteneurs que l'on peut facilement ouvrir (ou même en stockage à sec ouvert) à des températures qui sont plus propices à l'accès du personnel. Il y a des problèmes potentiels en matière de divergence génétique des deux collections (voir Chapitre 9, régénération). De plus, il peut être difficile de décider quelle quantité de la collection devrait être requise pour distribution et combien pour la conservation à long terme. Le RBGK (Millennium Seed Bank) possède une collection active et une collection de base, mais garde les deux types d'échantillons dans des conditions de stockage à long terme. La majorité des échantillons dans la collection de base sont maintenus intacts.

Un avantage majeur des banques de graines est qu'une grande quantité de diversité génétique peut être conservée en un seul endroit. Cette concentration de diversité est aussi une faiblesse fondamentale dans la mesure où un accident pourrait détruire du matériel extrêmement précieux (et dans certains cas irremplaçable). En plus des aspects pratiques pour sauvegarder les collections de la banque, il est donc essentiel que les échantillons soient dupliqués (comme échantillon de base séparé) dans une autre banque géographiquement éloignée.

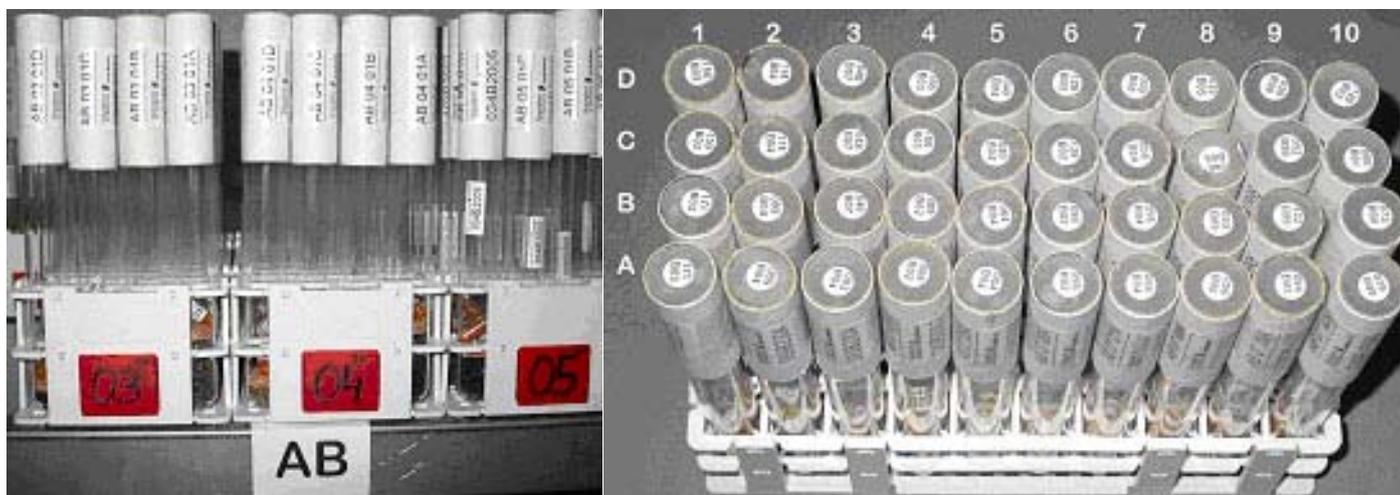


Figure 19 Organisation des récoltes dans la banque de graines UVEG. (© UVEG)

Cryopréservation

Bien que la conservation dans l'azote liquide (-196 °C) ou dans sa phase gazeuse (environ -150 °C) puisse prolonger la vie des graines, il ne s'agit généralement pas du premier choix pour le stockage des graines, et ce pour des raisons techniques / pratiques (voir ci-dessous). Il semble qu'une analyse coûts-avantages de la cryopréservation comparée au stockage conventionnel n'ait pas été publiée depuis plus de 30 ans. Une telle analyse serait utile.

La cryopréservation est la plus appropriée pour la conservation de graines orthodoxes à faible longévité ou lorsque de très petites quantités de graines d'une population ou d'une espèce sont disponibles (e.g. espèces en danger ou endémiques).

Bien que l'on ait montré que les graines de centaines d'espèces tolèrent un traitement et/ou stockage dans l'azote liquide, il existe un certain nombre de problèmes pratiques lors de la cryopréservation :

- L'azote liquide est un facteur de risque (brûlures et asphyxie). Une formation spécialisée du personnel, des vêtements appropriés et des procédures de sécurité sont donc essentiels. Parce que l'azote liquide s'évapore rapidement et remplace l'oxygène, il est essentiel que des alarmes à oxygène soient installées là où de l'azote liquide est entreposé et utilisé.
- Il faut avoir un fournisseur d'azote liquide à proximité.
- De grands conteneurs d'azote liquide (e.g. une capacité de 600 litres pour 12.000 cryoflacons) sont coûteux. Les conteneurs d'azote liquide doivent être régulièrement remplis jusqu'au niveau requis pour garder les échantillons à la température appropriée (environ -150 °C). Si les petites citernes cryogéniques (e.g. 30 litres, avec une capacité maximale de 855 flacons de 2 ml) peuvent être remplies manuellement, les plus grandes nécessitent cependant un conteneur d'approvisionnement. Bien que le coût initial des grands conteneurs soit élevé, le prix d'approvisionnement de l'azote liquide est plus faible comparé à la gestion de petits conteneurs, étant donné que le transport de l'azote liquide augmente le prix
- La méthode est appropriée uniquement pour des quantités relativement petites de graines par accession.
- Pour la gestion optimale des graines, trois aspects principaux doivent être envisagés (Pritchard & Nadarajan, 2008): 1) la teneur en eau des semences devrait être inférieure à la limite supérieure de congélation de l'humidité (Stanwood, 1985) ; 2) un refroidissement ou réchauffement rapide peut endommager mécaniquement les graines très sèches, mais cela peut être évité ; 3) l'imbibition lente, en évitant notamment l'immersion dans l'eau à des températures inadéquates, est recommandée avant ou pendant les tests de germination. Outre l'avantage de la longévité supplémentaire avec la cryopréservation, il convient de noter que les cryo-citernes ont une durée de vie environ cinq fois supérieure à celle des congélateurs (J. Puchalski, comm. pers.) et les problèmes de fourniture intermittente de l'électricité sont éliminés. Apart from the advantage of extra longevity in cryo-storage it should be noted that cryo-tanks have a lifespan about five times that of freezers (J. Puchalski, pers. comm.) and intermittent electricity supplies are eliminated.

Recommandations

Pour les espèces à graines orthodoxes de très courte durée de vie, la cryopréservation dans ou au-dessus de l'azote liquide peut être souhaitable.

Tous les échantillons doivent être dupliqués dans une seconde banque. Cette banque de duplicata doit être suffisamment éloignée de manière à ce qu'elle ne soit pas soumise à la même perte catastrophique qui pourrait détruire la collection principale.

Priorités de recherche

Une analyse coût-bénéfice de la cryopréservation par rapport au stockage conventionnel serait utile.



Figure 20 Cryopréservation dans l'azote liquide. (© RBGK)

CHAPITRE 6. TESTS DE BASE POUR LA GERMINATION

Résumé écrit par David Draper et M. Elena González-Benito (UPM) sur base de la présentation de Costas Thanos (NKUA), d'autres présentations par PAV-UNI et RBGK, et les discussions qui en ont résulté.

Commentaires généraux

Il est important de connaître la viabilité des graines conservées en banque de graines. La viabilité des graines est définie comme étant le nombre de graines qui sont en vie dans un lot de semences et ont le potentiel de donner naissance à une plantule (Gosling, 2003; Rao *et al.*, 2006).

Comme la longévité d'un lot de graines dépend de la qualité de celles-ci, il est important que les graines aient une viabilité élevée quand elles sont conservées, ou au moins qu'elles aient une viabilité connue. La méthode la plus fiable pour vérifier la viabilité est un test de germination, à savoir faire germer des graines dans des conditions optimales, après application d'un traitement de levée de dormance, si nécessaire. Le problème se pose lorsque, comme c'est le cas pour de nombreuses espèces sauvages, les conditions de germination optimales et la méthode de levée de dormance sont inconnues.

Il existe aussi des tests biochimiques (par exemple le chlorure de tétrazolium, TTC), qui peuvent être utilisés pour identifier les graines viables sans les faire germer. Ces tests peuvent être utiles pour distinguer les graines mortes de celles qui sont dormantes. Toutefois, ils présentent l'inconvénient de ne pas être aussi précis que les tests de germination, et les résultats sont parfois difficiles à interpréter.

De toute évidence, il est important que nous sachions comment faire germer des graines afin qu'elles puissent être utilisées à l'avenir. Par conséquent, la section suivante se concentre sur les tests de germination et les procédures nécessaires pour la production de plantules normales.

Recommandations

Quand tester ?

Idéalement, les tests de germination devraient être effectués d'une part avant et après séchage et d'autre part après la mise en banque afin de vérifier s'il existe des indices montrant que la germination est affectée par la dessiccation et la congélation. Toutefois, ce n'est pas faisable pour la majorité des banques de graines. Si les ressources le permettent, il est recommandé d'effectuer des tests de germination sur autant d'accessions que possible, après que les graines aient été soumises à dessiccation, mais avant qu'elles ne soient mises en banque et peu de temps après avoir été mises en banque. Si les ressources sont limitées et que seul un test initial peut être effectué, il est recommandé que cela se fasse dans le premier mois après la mise en banque. Le résultat de ce test sera la référence par rapport à laquelle les nouveaux tests futurs seront comparés.

Combien de graines tester ?

Avant d'effectuer les tests de germination, une estimation des graines vides/endommagées devrait être établie. Le pourcentage de germination devrait être exprimé en fonction du nombre de graines qui pourraient être physiquement capable de germer (nombre total de graines moins les graines endommagées ou vides).



Figure 21 Résultat d'un test de germination. (© RBGK)

La taille d'échantillon recommandée de 200 graines (deux répétitions de 100) pour les espèces agricoles (FAO / IPGRI, 1994; ISTA 2008) peut être trop grande pour les collections d'espèces sauvages, où les quantités de graines peuvent être limitées. Cela est particulièrement vrai pour les espèces en voie de disparition avec de petites populations ou les espèces avec des grosses graines. Dans ces cas, un test de germination comprenant 100 ou même 50 graines est considéré comme acceptable, avec l'échantillon divisé en deux répétitions de 50 ou 25 graines respectivement (notez qu'il n'y a pas de règles strictes sur ce point, par exemple certains instituts tels que MAICh utilisent trois répétitions de 30 graines). La recommandation est également utile avec des banques de graines conservant un grand nombre d'accessions et dont la disponibilité des ressources et/ou du personnel est limitée.

Humidification des graines sèches

Les récipients à graines doivent être réchauffés avant d'en retirer l'échantillon (voir le thème 10). Pour les espèces connues comme étant susceptibles d'être endommagées par imbibition, par exemple les Légumineuses (Fabacées) à grosses graines, les graines doivent être humidifiées après leur sortie de la banque. Cela permet d'éviter les dommages liés à l'imbibition, c'est-à-dire les dommages causés à des graines âgées ou très sèches suite à un apport rapide en eau provoquant la fuite du contenu cellulaire, car les membranes des cellules n'ont pas eu l'occasion de se restaurer. Les graines peuvent être placées à l'intérieur un récipient en plastique avec une fermeture hermétique (similaires à ceux pour l'entreposage des aliments) ou dans des dessiccateurs qui ont un récipient d'eau ; cette eau va générer un environnement humide. Les graines sont laissées dans le récipient pendant 24 h avant l'ensemencement, mais elles ne peuvent pas être en contact physique avec de l'eau liquide.

Choisir les conditions de germination

La réponse des graines à la germination est extrêmement plastique et les exigences peuvent varier considérablement selon les espèces, les populations, les années de récolte et même les intervalles de stockage. Cependant, à partir de la littérature publiée ou des bases de données telles que la Seed Information Database de RBGK (Liu *et al.*, 2008: <http://data.kew.org/sid/sidsearch.html>) et LEDA traitbase (<http://www.leda-traitbase.org/tomcat/LEDAportal/index.jsp>), la connaissance préalable des exigences de germination pour une espèce donnée ou pour des espèces apparentées peut être un guide important et, dans certains cas, il existe des tendances au niveau du genre et même de la famille (par exemple, exigences de lumière chez les Campanulaceae et graines dures chez les Cistaceae).

Quand il n'y a pas de connaissance préalable (comme c'est souvent le cas), les exigences de la germination peuvent être prédites à partir d'informations sur l'écologie (habitat et préférences climatiques) et sur la structure des graines de l'espèce en question. Par exemple, les graines avec un endosperme abondant et un embryon de petite taille (dormance morphologique probable) des régions aux hivers froids et/ou des étés chauds et secs (sans doute dormance physiologique) vont plus probablement avoir une dormance morpho-physiologique et, par conséquent, nécessitent une incubation prolongée à des conditions qui simulent la saison avant la germination dans la nature.

Traitements de levée de dormance

Des graines mises à germer dans des conditions optimales peuvent néanmoins ne pas germer, bien qu'elles soient viables, parce qu'elles sont dans un état de dormance. La dormance peut être due aux caractéristiques de l'embryon ou de l'enveloppe de la graine (voir une review récente sur la dormance: Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Les graines de nombreuses espèces sauvages peuvent montrer une dormance.

Certaines causes de dormance sont (voir Baskin & Baskin, 1998):

- *Un embryon sous-développé.* En général, c'est le cas chez les graines ayant un petit embryon et un endosperme abondant. Chez ce type de graines (avec dormance morphologique) l'embryon doit se développer avant que la graine soit en mesure de germer (Baskin et al., 2006). Habituellement une stratification chaude ou froide est requise, conformément au calendrier de la dispersion naturelle (par exemple, au printemps ou en automne). Cependant, si un embryon non encore développé ne commence pas à se développer tout de suite après la dispersion des graines, il pourrait également être physiologiquement dormant. Si tel est le cas (dormance morpho-physiologique), les graines doivent d'abord connaître une période de stratification froide ou chaude avant que l'embryon commence à se développer.



Figure 22 Effritement d'une graine à tégument dur avec un scalpel.
(© RBGK)

- *Des graines/fruits à enveloppes dures (imperméable à l'eau).* Elles surviennent chez de nombreuses espèces des familles suivantes: Anacardiaceae, Bixaceae, Cistaceae, Combretaceae, Convolvulaceae, Curcubitaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Malvaceae, Rhamnaceae, Rutaceae, Sapindaceae et Violaceae. La scarification du tégument de la graine, qui peut être faite de façon mécanique (par exemple par effritement, limage ou frottement avec du papier de verre) ou thermiquement (par exemple par immersion dans l'eau chaude) avant le semis, est requise dans ces cas pour permettre l'absorption d'eau. Une troisième méthode classique est la scarification chimique (acide), mais elle n'est pas recommandée à cause des dangers évidents et la nécessité d'un étalonnage minutieux. Parmi les méthodes, l'effritement ou le limage manuel effectué avec prudence est souhaitable pour de petites quantités de semences.

- *Des substances chimiquement inhibitrices* - sont présentes dans la graine, soit l'embryon soit le tégument. La dormance peut être enlevée par une stratification (froide ou chaude), par le lessivage à l'eau courante ou par l'application de GA_3 .



Figure 23 Incubateur simulant les conditions jour/nuit.
(© RBGK)

Conditions de germination: eau/agar, température, lumière

Le substrat destiné à l'ensemencement peut être de l'agar-agar, du papier filtre ou du sable. Les deux premiers sont utilisés dans des boîtes de Pétri, et le dernier est généralement utilisé pour les grosses graines (Rao *et al.*, 2006), dans des bacs ou de grands récipients en plastique. Le papier doit être de qualité supérieure. Il doit être uniforme afin d'obtenir des résultats reproductibles.

L'agar-agar (généralement 1%) a des avantages par rapport au papier:

- Peu d'entretien (il ne nécessite pas d'arrosage régulier), et donc il y a moins de variabilité
- Risque plus faible de dommages par imbibition
- Concentration constante des produits chimiques appliqués (agar frais après 3 semaines)
- Les racicelles blanches sont bien visibles sur un fond sombre
- Il est possible d'enlever les plantules pour le repiquage.

Toutefois, si le test de germination dure plus de 4 semaines, l'agar-agar pourrait commencer à se dessécher et les graines pourraient avoir besoin d'être transférées sur de l'agar frais. Pour minimiser cela, les boîtes d'agar peuvent être maintenues à l'intérieur de sacs en polyéthylène ou enveloppées avec du parafilm. Il convient également de considérer que certaines graines doivent être stérilisées avant le semis. Les graines peuvent être stérilisées par trempage dans une solution à 10 % d'eau de Javel domestique (hypochlorite de sodium), suivi d'un rinçage abondant à l'eau déminéralisée.

Dans tous les cas, de l'eau distillée ou déminéralisée doit être utilisée. Pour le papier-filtre, le volume d'eau dépend de l'épaisseur du papier ; le papier ne doit pas être mouillé de telle manière qu'un film d'eau se forme autour du doigt lorsque l'on appuie dessus (Rao *et al.*, 2006).

Les graines doivent être réparties uniformément à la surface ; on ne doit pas les toucher. Les récipients sont ensuite placés dans les incubateurs. Le niveau d'humidité du substrat doit être vérifié visuellement lorsque l'on note la germination, surtout quand des températures élevées sont utilisées (25-30 °C). Si du papier filtre est utilisé, l'eau doit être remplacée régulièrement (tous les 2-3 jours).

Dans la mesure du possible, les conditions d'incubation doivent tenter de simuler les conditions de l'habitat naturel au moment de la germination des graines. Par conséquent, il est généralement préférable de faire germer les graines à l'aide de températures diurnes alternées, avec un apport de lumière durant la phase diurne (Baskin *et al.*, 2006). Si possible, des températures constantes doivent être évitées, sauf pendant le traitement de stratification humide. Une lumière continue devrait être évitée en raison du risque d'inhiber la germination (réaction à l'éclairement élevé - HIR). Les espèces méditerranéennes ont généralement des températures optimales de germination fraîches (10-20 °C), et dans de nombreux cas des températures alternées de 20/10 °C ou de 20/15 °C (lumière/obscurité) fonctionnent bien. Les espèces subtropicales, tropicales et alpines germent généralement mieux à des températures plus chaudes (20-25 °C). Des photopériodes de 8, 12 ou 16 h sont généralement utilisées. Pour de nombreuses espèces alpines et tempérées, une période de stratification à froid (par exemple, 0 °C pendant 4-20 semaines) est connue pour augmenter la germination des graines.

Bien qu'une préférence pour la germination dans l'obscurité soit relativement rare, elle devrait être prise en considération. Chez les graines relativement grosses, il y a une probabilité plus élevée de préférer une germination dans l'obscurité et cela a été signalé chez certaines Cucurbitaceae. *Galanthus nivalis* germe également mieux dans l'obscurité.

Ellis *et al.* (1995) et la Seed Information Database (Liu *et al.*, 2008: <http://kew.org/data/sid/>) sont autant de sources d'information possibles en ligne sur les conditions d'incubation et prétraitements pour la levée de dormance.

Selon le nombre d'accessions à faire germer et la disponibilité du personnel, les graines germées devrait être notées régulièrement et au moins une fois par semaine. Si les graines germées peuvent être suivies tous les 1-2 jours, un taux (vitesse) de germination très précis peut être déterminé. La durée du test dépend des espèces et des conditions utilisées.

Le suivi de la germination

Pour les tests de germination, une graine germée peut être définie comme ayant une radicule de 1 - 2 mm de long, ou dont la radicule est au moins égale à la longueur de la graine. Il est important d'avoir une définition claire pour chaque espèce avant de commencer à faire le suivi. Les graines germées sont retirées et comptées dans chaque boîte de Pétri. Il est également important d'enlever les graines contaminées pour éviter la propagation de l'infection (Rao *et al.*, 2006), mais celles-ci doivent être notées. Alternativement, un échantillon légèrement infecté peut être stérilisé en surface et être ressemé. La durée du suivi de la germination varie selon les espèces, et peut aller d'une semaine à plusieurs mois. Quatre à six semaines sont généralement nécessaires pour de nombreuses espèces sauvages. Le nombre de graines germées à chaque suivi est consigné sur une feuille de données. D'autres observations doivent également être incluses, comme le nombre de graines infectées et une germination anormale.

À la fin du test de germination, les graines non germées doivent être coupées pour vérifier le nombre de: graines fraîches et fermes (probablement dormantes), graines moisies et tendres (mortes) ou graines vides. Le pourcentage moyen de germination est calculé à partir des résultats de toutes les répétitions en tenant compte des graines vides/endommagées. Si les graines germées ont été notées fréquemment (tous les 1-2 jours), le taux (vitesse) de germination peut également être calculé. Par exemple, le T50 est un indice du taux de germination qui est défini comme le temps nécessaire à la germination de la moitié (50%) des graines qui germent sous des conditions particulières de germination.

Les données de germination (pourcentage final de germination et taux de germination) doivent être incluses dans la base de données de la banque de graines, ainsi que les pré-traitements appliqués et les conditions d'incubation utilisées.

Priorités de recherche

Une évaluation de la relation entre l'émergence de la radicule et la production de plantules normales chez les espèces sauvages serait utile. Le lien entre les deux «formes» de croissance permet une référence croisée à l'approche de l'ISTA pour les tests de germination des graines. Des photographies des plantules seraient utiles pour l'identification.

CHAPITRE 7. SPÉCIMENS ET VÉRIFICATION

Résumé écrit par Simon Linington (RBGK) basé sur la présentation de Gianni Bedini (jardin botanique de Pise) et des discussions ultérieures.

Commentaires généraux

Il est essentiel d'avoir un nom scientifique correct pour les espèces représentées dans la banque de graines. Le nom correct relie la récolte de graines à tout ce qui est connu sur l'espèce. Les utilisateurs de graines veulent être assurés de l'identité de leur matériel (Goldblatt *et al.*, 1992) afin d'éviter des résultats erronés. Des spécimens sont indispensables pour clarifier des résultats inattendus (Funk *et al.*, 2005).

Parfois, les populations de plantes sont si bien connues ou le récolteur si familier avec les espèces que l'identification sur le terrain peut être acceptée. Plus généralement, un ou plusieurs spécimens (voir Bridson & Forman (1998) pour la technique et l'information associée) sont récoltés sur le terrain. Ceux-ci doivent représenter les plantes dans une population dont les graines sont récoltées, et ils sont utilisés pour confirmer l'identification par référence aux spécimens connus dans un herbier. Habituellement, le spécimen (connu comme un «voucher») est récolté au même moment que les graines. Toutefois, les plantes à ce moment-là peuvent ne pas être appropriées pour vérification. Par conséquent, il est parfois nécessaire d'anticiper et de récolter les spécimens avant les graines.

Le RBGK (Millennium Seed Bank Project) recommande actuellement que tous les spécimens dupliqués d'espèces ligneuses soient pris sur la même plante qui représente les caractéristiques moyennes de la population et à partir de laquelle certaines des graines ont été récoltées ; ceci garantit

que tous les herbiers recevant les duplicata ont du matériel identique. Toutefois, on pourrait faire valoir le fait que chaque spécimen en double doit être récolté à partir d'un individu séparé et étiqueté comme tel afin de donner plus d'informations sur la variation morphologique.

La vérification peut être effectuée par un botaniste expérimenté sur le terrain ou plus tard à l'herbier. Des clés botaniques sont un des outils les plus couramment utilisés pour l'identification. Les vérificateurs doivent être consignés, de même que toute modification du nom.

Voir Bridson & Forman (1998) pour des détails sur la gestion des spécimens.

Il est important que la banque de graines reçoive les changements de nom appliqués au spécimen d'herbier à la suite de révisions taxonomiques. Ainsi, le label d'herbier doit posséder une mention disant qu'il est lié à un échantillon de graines en banque.

Recommandations

Sauf dans les rares cas où les populations sont bien connues, un spécimen d'herbier doit être récolté pour représenter la population à partir de laquelle des graines ont été échantillonnées. Il faudra évidemment faire attention si des populations rares ou en danger sont impliquées. Des photos sont également utiles.



Figure 24 Spécimen d'herbier.
(© RBGK)

CHAPITRE 8. DONNEES

Résumé écrit par Simon Linington (RBGK) basé sur la présentation clé de Gianni Bedini (jardin botanique de Pise) et les discussions annexes.

Commentaires généraux

Les collections sans données de bonne qualité sont inutilisables. En enregistrant des données concernant chaque collection de graines, il est primordial d'avoir en tête que ces données doivent être significatives pour les utilisateurs de ses données à la fois aujourd'hui et pendant la durée de vie de la collection (jusqu'à peut-être 200 ans). Par conséquent, les données doivent être objectives. Elles doivent être groupées de façon uniforme ce qu'on obtient à l'aide de normes de données. ENSCONET a publié des normes de données (voir schéma des données de ENSCONET, 2009). Ces normes doivent être conservées avec les données.

Les données de collecte (voir le manuel de collection ENSCONET, 2009) sont enregistrées sur le terrain. Les données de gestion de la collection sont liées aux données de collecte et y sont ajoutées tandis que la collection de graines et la fiche de l'herbier accompagnatrice sont traitées. Si elles sont bien structurées, les données peuvent aider le responsable de la banque de graines à suivre le traitement du matériel. L'enregistrement des envois et leur utilisation de la collection est important.

La syntaxe, à savoir les règles régissant l'entrée des données est importante, comme pour tout enregistrement de données. Par conséquent, il est nécessaire d'effectuer des contrôles sur les nouveaux enregistrements, par exemple, pour vérifier que la date n'est pas futuriste, que le mois est codé entre 1 et 12 etc...

Les données de conservation peuvent être groupées (voir par exemple, Bone *et al.*, 2003):

- Nettoyage
- Séchage
- Conditionnement
- Stockage
- Vérification
- Distribution

Les détails des champs individuels et leurs normes sont indiqués dans le schéma des données de ENSCONET (2009). Les champs de notes peuvent être utilisés pour enregistrer les variations de procédure, mais, attention, il y a un risque que ces notes ne soient pas détectées dans les recherches de données générales.

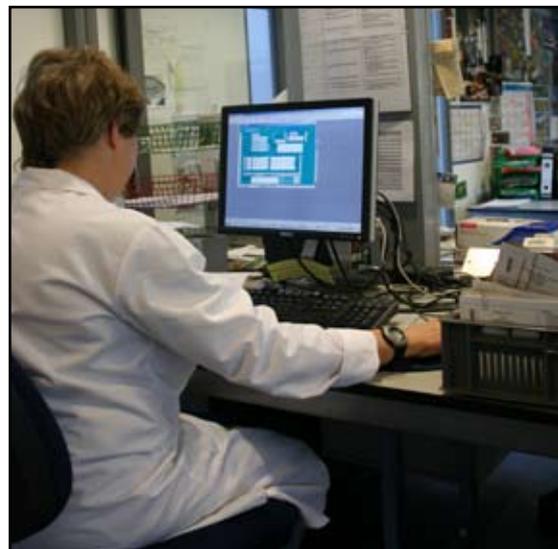


Figure 25 Une bonne gestion des données est essentielle. (© RBGK)

Si possible, il est recommandé d'utiliser le Format de Transfert International mis au point par BGCI. Cela facilitera le partage des données et réduira la préparation des données lors de la soumission des données à des bases de données partagées.

CHAPITRE 9. RÉGÉNÉRATION DES GRAINES

Résumé écrit par Albert-Dieter Stevens (BGBM) basé sur la présentation clé de Simon Linington (RBGK) et les discussions annexes.

Commentaires généraux

Définition et objectif

La régénération des graines est la génération d'un nouveau lot de graines soit quand la viabilité d'une vieille collection de graines baisse à un niveau défini ou quand le nombre de graines d'une collection atteint un niveau bas donné. On appelle souvent cette dernière 'multiplication de graines'.

Le maintien de l'intégrité génétique de l'échantillon d'origine est un élément essentiel de la régénération des graines. Les deux préoccupations principales : le maintien de l'occurrence des différentes allèles et si possible, le maintien de la fréquence des ces allèles. C'est une opération onéreuse qu'il est difficile de bien faire et qu'il vaut mieux éviter si possible en récoltant de vastes collections de graines de haute qualité sur le terrain. Dans certains cas, il vaut mieux refaire une collecte de graines directement dans la nature (si c'est encore possible) que de procéder à une régénération.

Le niveau de viabilité auquel les collections de graines doivent être régénérées est appelé 'la norme de régénération'. Il est généralement fixée à un haut niveau (75-85 %) pour éviter une détérioration génétique liée à une perte de viabilité et pour éviter la détérioration de l'établissement du champ.

Etant donnée que la viabilité d'une la collection de graines est normalement surveillée à des intervalles de 5 à 10 ans par le biais d'un test de germination, il est essentiel que la dormance des graines soit supprimée. En raison de l'erreur statistique,

à mesure qu'on approche de la norme de régénération, il peut être difficile d'être certain que la viabilité de la collection est toujours supérieure à la norme. Une procédure appelée 'test séquentiel' ou la taille de l'échantillon est augmentée jusqu'à ce que la décision ci-dessus soit résolue a été proposée (voir Ellis, et al., 1985). Cependant, en raison de la complexité du processus, la plupart des banques joueront la sécurité avec une régénération précoce ou accepteront le risque que la régénération puisse être effectuée trop tard. Il faudra tenir compte que la culture de terrain sera bien inférieure à la germination en laboratoire. Donc, il faudra en tenir compte pour le nombre de plantes cultivées.

Il faut procéder à la multiplication des graines quand les nombres de graines collectées sur le terrain sont faibles (par ex. pour des petites populations d'espèces en danger) ou quand le niveau des graines stockées est descendu à un niveau donné. Ce niveau doit être déterminé de sorte qu'il y ait assez de graines pour plusieurs (disons trois) essais de régénération (soit, 500-1000 graines viables). Idéalement (ce qui arrive rarement) il faudrait qu'une collection soit épuisée au point que le besoin de régénérer pour des nombres faibles de graines coïncide à la norme de régénération. Les nombres de graines stockées baissent pour deux raisons. Premièrement les graines sont utilisées pour vérifier la collection. On peut prévoir raisonnablement cette baisse d'après la fréquence des tests de vérification et la taille des échantillons utilisés. Deuxièmement, les graines sont fournies

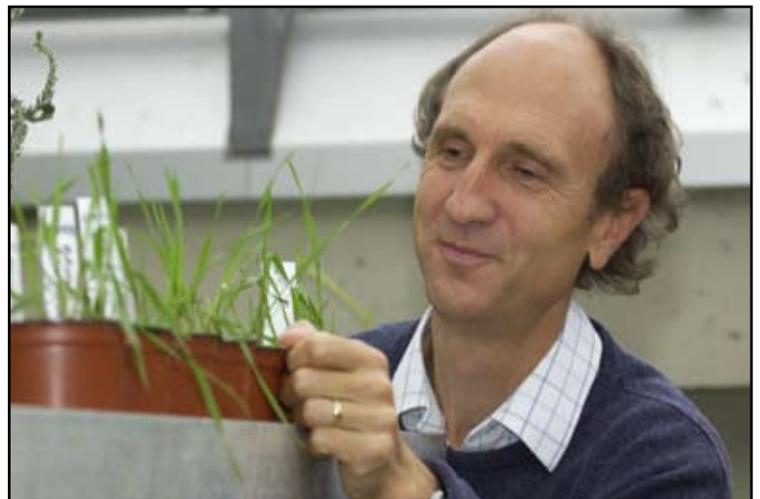


Figure 26 Régénération de *Bromus bromoideus* (éteint à l'état sauvage). (© RBGK)

aux utilisateurs pour de la recherche ou des travaux de conservation. Cette réduction est assez imprévisible; certaines collections peuvent être très populaires et d'autres rarement utilisées. Un certain nombre de banques séparent chaque collection de graines en échantillon de base (conservation) et en échantillon actif (distribution). De ce fait, la collection de base est rarement touchée et l'active est utilisée pour la distribution. Dans la plupart des banques, la collection active est gardée dans des conditions de stockage à court terme par rapport à la collection de base. Dans d'autres banques (par ex. RBGK) les deux sont conservées dans des conditions analogues à long terme. Dans le cas d'échantillons très populaires, le nombre de graines de la collection active peut décliner rapidement. Cet échantillon actif peut être alors multiplié pour générer un nouvel échantillon. On court le risque, en le faisant trop souvent (en particulier sur un site éloigné du lieu de collection) que la collection active diverge génétiquement de la collection de base. Par conséquent, il faudra périodiquement prélever des échantillons de la collection de base pour régénérer la collection active.

Les accessions ayant une faible viabilité devraient être régénérées en priorité par rapport aux accessions à faible nombre de graines.

Risques

La régénération des graines entraîne des risques menaces à l'intégrité génétique des accessions des graines dues à la sélection, de la dérive génétique (la perte aléatoire d'allèles plus rares dans des petits échantillons) ou l'hybridation avec du matériel étroitement apparenté (en particulier de la même espèce) qui poussent à proximité (voir Breese, 1989 pour une discussion claire et détaillée). Le personnel des banques de graines devrait être très vigilant pour réduire ces risques bien qu'il faille accepter qu'on atteigne rarement la perfection.

L'hybridation est un risque majeur pour les espèces exogames. Il faudrait souligner que de nombreuses espèces endogames sont exposées à un faible niveau de pollinisation croisée ; Ce niveau peut augmenter dans certaines conditions environnementales. Même quelques espèces apomictiques peuvent être d'éventuels exogames. La sélection peut prendre diverses formes. La plus évidente consiste à faire pousser le matériel sous des conditions très différentes de celles de l'état sauvage. La sélection est induite par les différences climatiques et géologiques (y compris des différences microbiennes) par rapport au site d'origine. Il peut y avoir en culture des pressions de sélection dues à des parasites ou des maladies que le matériel à l'état sauvage n'a pas connu. Il peut également y avoir des effets de compétition si les plantes sont cultivées en densité bien supérieure à celle qui peut se produire à l'état sauvage. Les gestionnaires de collection doivent veiller à ce que la pratique horticole standard élimine les écarts ou les plantes faibles ; des instructions claires doivent être imposées pour ne pas procéder ainsi.

D'autres formes de sélection peuvent résulter par des différences à la fois de calendrier et de quantité de la production des fleurs, du pollen et des graines. On peut en limiter les effets en équilibrant les graines données par chaque parent femelle.

A moins qu'une partie de la collection soit conservée à part par sécurité, il y a également le risque de perte complète due des conditions environnementales défavorables. De toute évidence, il faut trouver l'équilibre entre diviser la collection pour des raisons de sécurité et créer un goulot d'étranglement en régénérant des échantillons qui sont beaucoup plus petits que la collection de terrain d'origine de sorte que les allèles ne soient pas transmises à la génération suivante ou qu'une survienne une dépression due à l'endogamie (dans le cas des exogames) n'apparaisse.

Un autre risque est provoquée par le mélange des graines après la récolte avec celles de collections morphologiquement semblables. Ce risque ne devrait pas être supérieur à celui encouru dans d'autres circonstances de collection/traitement de graines, en faisant usage de bon sens.

Aspects génétiques de la régénération

La régénération a pour objectif de réaliser une reproduction aléatoire complète avec un nombre constant de parents pour chaque génération et d'équilibrer le rendement reproductif des plantes parentales (voir Breese, 1989). A l'état sauvage, toutes les plantes d'une population ne contribuent pas de la même manière à la génération suivante pour diverses raisons et c'est pourquoi des échantillons uniques récoltés dans la nature représentent rarement l'intégralité de la diversité génétique d'une espèce présente sur un site.

Lors de la régénération, l'objectif est de minimiser la perte de la variation génétique de sorte que génétiquement, les graines prélevées à l'état sauvage soient analogues à celles de la première régénération, la seconde régénération etc. Idéalement, on devrait procéder à la régénération le moins souvent possible et en utilisant le plus grand nombre d'individus. Ceci étant, un 'goulot d'étranglement' peut causer une perte substantielle de diversité. Par exemple, si 50 individus sont prélevés à l'état sauvage, on devrait en utiliser au moins 50 pour la régénération. Si 10 individus sont utilisés pour la régénération suivante, on peut perdre une diversité importante. Même si des régénérations suivantes utilisent 50 individus, le goulot d'étranglement aura eu une forte influence. Il existe un risque que l'échantillonnage aléatoire, pour le choix des graines pour cultiver les plantes destinées à la régénération, ne soit pas assez aléatoire. Par exemple, par hasard, 10 des 50 plantes peuvent être issues par hasard d'une même plante prélevée sur le terrain. On résout ce problème en conservant les récoltes de graines des plantes individuelles séparées (voir ci-dessous).

Il est essentiel de tenir compte du système de reproduction des espèces. Un système de reproduction est défini comme 'tous les facteurs, en dehors de la mutation, affectant le degré auquel les gamètes (qui) fusionnent lors de la fécondation sont génétiquement semblables' (Thain & Hickman, 2000 – voir également l'Annexe 1). Cependant, il est important de souligner que le système de reproduction peut varier entre les populations de la même espèce (toutes les espèces ne sont pas contraintes dans leur système de reproduction) et des systèmes d'incompatibilité sont connus pour se décomposer à la fin de la floraison chez de nombreuses espèces.

Des taxons endogames obligatoires (par ex. espèces avec fleurs (cleistogames) fermées) et des taxons apomictiques ne nécessitent pas de pollinisation contrôlée. Cependant, tous les exogames doivent être soumis à une gestion de pollinisation contrôlée (voir ci-dessous).

Il est important de souligner que si des exogames sont forcés de se reproduire par endogamie par ex., en étant réduits à quelques individus il est alors possible d'obtenir une « 'dépression due à l'endogamie »' tandis que l'homozygotie augmente. Par exemple, il est possible de surmonter le système d'auto-incompatibilité chez *Brassica oleracea* (en ouvrant le bouton de la fleur et en pollinisant le stigmate) et la forcer à se reproduire par endogamie. Cependant, ceci pourrait éventuellement conduire à une « dépression due à l'endogamie ». De même, quand les endogames sont encouragés à se reproduire par exogamie vous pouvez alors avoir une « 'dépression due à l'exogamie »' et la fréquence d'hétérozygotie augmentera. Dans les deux cas, la valeur d'adaptation des individus diminue.

Méthode de pollinisation

Dans la plupart des cas, la pollinisation doit être effectuée artificiellement par diverses méthodes qui reproduisent l'effet des vecteurs de pollen mais plus souvent en frottant du pollen des anthères d'une plante sur le stigmate d'une autre plante.

Le moment de la pollinisation est essentiel pour une mise en place réussie du fruit. La réceptivité des stigmates est sensible par rapport au temps de même que l'ouverture des anthères et l'émission du pollen. Par ailleurs, la durée de vie naturelle du pollen varie de 30 minutes chez

quelques herbes à plus d'un d'un jour chez les Gymnospermes et certains arbres fruitiers (Richards, 1997) et plusieurs jours, chez les orchidées par exemple (Pritchard, H.W., pers. comm.). Le point d'émission de pollen peut servir de guide pour la maturité du pollen (Pritchard, H.W., pers. comm.). Etant donné qu'il s'avère plus difficile d'estimer la maturité du stigmate, il faudra effectuer une pollinisation à la main à différentes périodes.

La méthode idéale pour s'assurer que la variation génétique est conservée lors de la régénération consiste à effectuer des croisements réciproques par paire (voir Breese, 1989). Les individus à régénérer sont accouplés aléatoirement (dans le cas des plantes monoïques) croisées dans les deux sens (réciproquement) ou chaque plante participe à la fois comme parent mâle et femelle. Pour éviter le mélange, les plantes devront être étiquetées. Idéalement, les récoltes de graines pour chaque parent, devront être conservées séparément. Une autre bonne méthode parmi les meilleures consiste à conserver les graines de chaque paire séparément. Bien qu'elle assure l'intégrité génétique, elle peut s'avérer peu pratique puisque la curation des graines n'en sera que plus compliquée. Par exemple, les graines devront être rassemblées pour la surveillance et le contrôle de la germination et pour l'approvisionnement en échantillons des utilisateurs. L'approche alternative plus pratique qui réduit l'intégrité génétique consiste à regrouper les récoltes de chaque plante et, en faisant cela, d'équilibrer la contribution de chaque parent à l'assemblage. Certaines institutions (voir Chorlton *et al.*, 2003) conservent les récoltes de graines individuelles comme un échantillon de conservation, font un 'assemblage équilibré' et le regroupent le reste : 'assemblage non équilibré' (par ex. issue de plantes produisant des graines excédentaires) pour l'approvisionnement en graines pour utilisation dans le cas où la représentation génétique n'est pas importante ou moins encore.

Dans de nombreux cas, le croisement par paire demandera beaucoup de temps. Dans ces circonstances, on peut effectuer un croisement entre tous les parents sélectionnés pour la régénération (un poly-croisement). Le nombre d'individus contribuant au lot de graines peut être maximisé en effectuant une pollinisation à la main sur différentes périodes pour couvrir la floraison précoce et la floraison tardive. Il est important de s'assurer que le pollen d'un ou plusieurs parents ne dominera pas en contribution de pollen. En même temps, si possible, il faut garder séparément les graines des plantes parentales individuelles. Ça serait moins bien de rassembler les graines, en équilibrant ainsi la contribution de chaque parent.

L'option la moins satisfaisante est de permettre une pollinisation aléatoire complète en utilisant des vecteurs naturels tels que la brise ou des insectes appropriés qui pourraient être présents.

Isolation génétique

Durant la régénération il est nécessaire d'éviter une contamination par introduction accidentelle de pollen de la collection d'une espèce en collection sur des plantes d'une collection de la même espèce ou d'un parent proche. Ceci est obtenu en nettoyant soigneusement les brosses et pinces de pollinisation et par des procédures d'isolation judicieuses.

On peut réaliser une simple isolation en conservant les collections physiquement séparées. La distance dépendra de la pollinisation due aux insectes ou due au vent et des barrières physiques (par ex. parois des serres ou filet anti-insectes) qui séparent les collections. En pratique, dans les enceintes de la plupart des institutions/jardins botaniques, les distances d'isolation seront limitées. C'est pourquoi les options sont d'empêcher d'autres collections apparentées de fleurir durant la pollinisation (possible avec les plantes vivaces) ou d'emballer les fleurs dans des sacs 'de boulangerie' non hermétiques mi film/mi papier (ou équivalents) avant l'émission du pollen et d'introduire soigneusement le pollen requis en retirant brièvement les sacs.



Figure 27 La pollinisation par l'intermédiaire d'insectes doit être évitée car elle pourrait aboutir à une hybridation. (© RBGK)

Lorsque des sacs sont utilisés, il est important de stimuler le développement de la fleur et du fruit sans amplifier les dégâts dus à l'excès d'humidité et aux infections. L'emballage doit être appliqué à des stades précoces de bourgeonnement et les sacs peuvent être retirés si le fruit commence à se développer.

Conditions de croissance

Il est impossible de normaliser les processus de régénération pour toutes les espèces ; les recommandations et protocoles doivent donc être développés sur les bases d'une espèce. L'information écologique spécifique d'une espèce, la recherche et une documentation complète de toutes les étapes de la culture sont d'une importance cruciale pour la régénération.

Un nombre suffisant de graines doit être semé pour récolter le nombre requis de plantes pour la régénération. Si la semence se fait directement dans du terreau ou dans le sol, la germination sera inférieure à celle obtenue en laboratoire. En outre, les plantes pourraient mourir avant d'atteindre leur stade de reproduction. Un facteur va devoir être prévu pour chaque espèce afin d'estimer le nombre de graines requis.

La régénération doit avoir lieu dans des conditions écologiques de croissance similaires à celles des populations d'origine (lumière, eau, type de sol et pH, température etc.) mais en excluant les prédateurs, mauvaises herbes et parasites. Les plantes devront être espacées pour minimiser la compétition. Il se pourrait qu'un nombre élevé d'espèces ne produise pas de graines la première année(s), par conséquent, il faut penser à l'entretien et à la stabilité des parcelles régénérées à long terme. L'initiation de la floraison et de la maturation des fruits pourrait exiger des déclencheurs environnementaux spécifiques ou des conditions qui devront être appliquées ou contrôlées artificiellement. L'approvisionnement en eau ou la température peuvent être importants pour la maturation des fruits et des graines. La germination et les stades de croissance suivants doivent être planifiés par rapport aux saisons pour que la maturité des graines puisse coïncider avec des conditions météorologiques favorables. Les plantes doivent être inspectées à des intervalles réguliers. Ces inspections sont une opportunité pour confirmer que du matériel correct est cultivé.

La récolte doit avoir lieu pendant le stade de la dispersion naturelle. Dans un certain nombre de cas comme celui des capsules déhiscentes, il peut être nécessaire d'emballer les infrutescences juste avant la dispersion des graines.

Documentation

Les horticulteurs ont tendance à garder l'information dans leurs têtes au lieu de la noter. Il existe peu d'informations sur la culture et encore moins sur la régénération de nombreuses espèces sauvages dans la littérature. Par conséquent, le personnel doit être encouragé à noter tous les aspects du processus de régénération. Si cette information est transformée en base de données, elle pourrait s'avérer unique et donc très précieuse pour d'autres banques de graines et ceux qui sont impliqués dans des projets de conservation ou de restauration.

Un formulaire de données est proposé ci-dessous dans l'**Annexe 2**. Quand des données sont largement partagées, il est utile d'avoir certaines caractéristiques du site de régénération y compris le type de sol, la température, les conditions de luminosité, le régime d'irrigation, le plan de préparation et de plantation.

Même si elles ne sont pas dans le formulaire de l'**Annexe 2**, les données sur la proportion des fleurs pollinisées qui donnent les graines et la production en graines (nombre) par plante, seraient utiles pour guider les efforts futurs sur la multiplication des graines.

Priorités de recherche

La recherche sur la diversité génétique va aider à enrichir les connaissances sur le nombre minimal d'échantillons et de plantes afin d'obtenir un nombre efficace de populations régénérées. Une identification fiable (empreintes génétiques) des accessions, relativement aisée et bon marché à obtenir, aidera la surveillance de l'intégrité des échantillons régénérés.

Le manque d'informations sur les systèmes de reproduction de la plupart des taxons rend difficile la gestion appropriée des accessions qui vont être régénérées. La recherche sur la biologie reproductive (par ex. taux de pollinisation croisée, sexualité contre apomixie) aidera à adapter correctement les procédures de régénération.

ANNEXE 1. SOMMAIRE SUR LES SYSTEMES CLES DE LA REPRODUCTION DES PLANTES

Voir Richards (1997) pour beaucoup plus de détails.

♂ - mâle (étamine = anthère contenant les grains de pollen + filament)

♀ - femelle (carpelle = ovaire contenant 1 ou plusieurs ovules + le stigmate + le style)

♂♀ - hermaphrodite – peut être relié soit à des plantes soit à des fleurs

Organisation de la plante	Plante	Fleurs		Note
Dioecie ¹	♂ ou ♀	♂ ou ♀	exogamie (obligatoire)	A
Monoecie ²	♂♀	♂ ou ♀	exogamie	B
Hermaphrodite	♂♀	♂♀	voir ci-dessous	C



Auto – incompatibilité				
- Gamétophytique	♂♀	♂♀	exogamie	D
- Sporophytique	♂♀	♂♀	exogamie	E
Différent types de Fleurs chez les espèces ^a	♂♀	♂♀	exogamie	F
anthères et stigmates séparés pollinisation qui exige la visite d'insecte ^b	♂♀	♂♀	exogamie	G
Emission de pollen et réceptivité du stigmate time séparés par le temps ^c	♂♀	♂♀	exogamie	H
Endogamie	♂♀	♂♀	endogamie	I
Graines formées par reproduction asexuée ^d	♂♀	♂♀ ou ♀	asexuée	J

^a Hétéromorphie, ^b Herkogamie, ^c Dichogamie (Protandrie - ♂ mûri en premier sur la plante ; Protogynie - ♀ mûri en premier sur la plante), ^d Agamospermie.

¹&² Nombreuses variations par ex.

Organisation de la plante	Plante	Fleurs
¹ Gynodioecie	♂♀ ou ♀	♂♀, ♂ ou ♀
¹ Androdioecie	♂♀ ou ♂	♂♀, ♂ ou ♀
² Gynomoecie	♂♀	♂♀ ou ♀
² Andromonoecie	♂♀	♂♀ ou ♂

Voie Richards (1997) pur plus de détails.

Note		Commentaires	Exemples
A	Dioecie	Rare. Observer les fleurs	Salicaceae. Arbres des forêts tropicales.
B	Monoecie	Rare. Observer les fleurs. Souvent exposée à la dichogamie.	Grandes plantes pollinisées par le vent ou l'eau/ celles avec un capitule / ombelles. Cyperaceae.
C	Hermaphrodite	Très fréquent. Observer les fleurs. La pollinisation naturelle peut donner des indices importants sur le système de reproduction.	
D	AIG ³	Communément appelé cf. SSI. Retrouvé chez la plupart des ordres des plantes à fleurs. Expérimentation ou références bibliographiques.	Certaines Poaceae, <i>Corylus avellana</i> .
E	AIS ⁴	Expérimentation ou références bibliographiques.	Nombreuses Brassicaceae, Asteraceae.
F	Hétéromorphie	Différent types de fleurs. Souvent, on a réciproquement une Herkogamie (voir ci-dessous). Observer les fleurs. On observe une compatibilité croisée entre les morphes mais une incompatibilité à l'intérieur des morphes.	Rubiaceae, Boraginaceae, Plumbaginaceae, Primulaceae (Pin / thrum en <i>Primula</i>).
G	Herkogamie	Anthère et stigmate bien séparés. Observer les fleurs.	Orchidaceae, Primulaceae.
H	Dichogamie	Expérimentation ou références bibliographiques.	Caryophyllaceae (protandry), certaines Brassicaceae, Rosaceae (protogyny).
I	Endogamie	Caractéristiques corrélés (voir ci-dessous) ou fleurs fermées (cleistogamie), expérimentation ou références bibliographiques.	Nombreuses espèces pionnières annuelles, espèces cultivées.
J	Agamospermie	Certaines espèces sont capables de produire leurs graines par reproduction sexuée ou asexuée. Références bibliographiques.	<i>Taraxacum</i> , certaines <i>Ranunculus</i>

³ AIG (Auto Incompatibilité Gamétophytique). Voir Richards (1997). Les mêmes allèles contrôlent les facteurs de reconnaissance qui interviennent dans le pollen et le stigmate. Les facteurs interviennent dans le stigmate diploïde et dans le pollen haploïde. Quand le pollen et le stigmate portent le même facteur, on a incompatibilité, le tube pollinique sera bloqué et ne descendra pas jusqu'à l'ovule.

Genotypes du pollen	S1 & S2	S1 & S2	S1 & S2
Genotype du stigmate	S1S2	S1S3	S3S4
	Incompatible	Partiellement compatible	Entièrement compatible

⁴ AIS (Auto Incompatibilité Sporophytique). Voir Richards (1997). L'anthère sporophytique contrôle et stimule le grain de pollen. Il existe une dominance des facteurs représentés dans les grains de pollen mais une expression indépendante des allèles dans le stigmate.

Phénotype pollinique	S1 (assume S1 > S2)	S1	S1
Génotype du stigmate	S1S2	S1S3	S3S4
	Incompatible	Incompatible	Entièrement compatible

ANNEXE 2. FORMULAIRE DE DONNEES PROPOSE POUR DES COLLECTIONS REGENEREES

Site	
Emplacement du site	
Numéro de la collection	
Genre	
Espèce	
Taxon intra-spécifique	
Système de reproduction attendu	
Statut de conservation	
Date de semence	
Nombre de graines semées	
Date de germination	
Date de récolte des graines	Première Dernière
Collecteur(s) des graines	
Isolation (à cocher)	<p>Pas de contrôle : pollinisation ouverte</p> <p>Disposition spatiale: spécimen du même genre le plus proche au moins à mètres</p> <p>Disposition spatiale: spécimen de la même espèce le plus proche au moins à mètres</p> <p>Barrières physiques au pollen/insectes (préciser)</p> <p>Autre (préciser)</p> <p>Inconnu</p>
Pollinisation contrôlée (à cocher de façon appropriée)	<p>Date de pollinisation :</p> <p>Auto pollinisation</p> <p>Pollinisation croisée avec la même accession</p> <p>Pollinisation croisée avec une autre accession (préciser le no. de collection)</p> <p>Details :</p>
Nombre de plantes dans l'accession	
Nombre de plantes à partir desquelles les graines ont été récoltées	

Relation des graines à la collection d'origine venant de l'état sauvage (à cocher)	Graines récoltées à partir de plantes provenant de matériel végétatif pris à l'état sauvage (génération 0) Graines récoltées à partir de plantes provenant de graines collectées à l'état sauvage (génération 1) Graines récoltées à partir de plantes provenant de graines de la génération 1 (génération 2) Génération inconnue = 9
Spécimen d'herbier (à cocher)	Collecté d'une plante à partir de laquelle les graines ont été récoltées (voir les 7 prochains rangs) Impossibilité de collecter un spécimen convenable Pas collecté car déjà vérifié (voir 8 rangs plus bas)
Date de récolte du spécimen d'herbier	
Collecteur du spécimen d'herbier	
Cycle de vie de la plante (à cocher)	Annuelle Bisannuelle Pérenne
Hauteur de la plante (mètres)	
Autre description de la plante	Par ex. Comportement, couleur des fleurs, odeur, latex et tous ce qui n'est pas apparent sur le spécimen d'herbier :
Photos prises (please tick)	Non Oui emplacement de la photo :
Détails du matériel précédemment vérifié	Vérificateur : Institution : Date : Matériel vérifié (vivant à l'état sauvage, cultivé à l'état sauvage, spécimen d'herbier etc.) :
Statut de la collection (à cocher)	Complète Plus de graines à suivre (spécifier les détails) Matériel d'herbier a suivre (spécifier les détails)
Notes (Date de floraison, date de fructification etc.)	

CHAPITRE 10. DISTRIBUTION DES GRAINES

Résumé écrit par Albert-Dieter Stevens (BGBM) basé sur une présentation clef de Simon Linington (RBGK) et les discussions annexes.

Commentaires généraux

Les échantillons de graines sont distribués à partir de banques de graines d'espèces sauvages pour diverses raisons. Cette distribution peut être interne à l'institution ou externe (nationalement / internationalement). Ces utilisations impliquent la recherche fondamentale et appliquée, l'éducation, la multiplication, la réintroduction d'espèces et la restauration d'habitats. La recherche appliquée et la multiplication peuvent impliquer le secteur privé.

Beaucoup de banques de graines distribuent des listes de graines (certaines en ligne) pour que les utilisateurs puissent les sélectionner. Ces listes devraient se composer de collections avec des quantités de graines suffisantes, des niveaux de germination acceptables et une identité vérifiée. Les collections ne pouvant pas être distribuées à cause de restrictions de récolte définies e.g., par le gouvernement, le parc national, ou le propriétaire devraient être exclues. Les espèces connues comme fortement envahissantes ou nuisibles ne devraient pas être incluses (ou si elles le sont avec un avertissement clair). Ceci dit, presque toutes les espèces ont le potentiel d'être envahissantes mises dans de bonnes conditions, donc un avertissement général aux utilisateurs sur ce risque est important. Si possible, toutes les données utiles (incluant les conditions de germination) devraient être liées à la liste de graines ; sinon les données correspondant à la graine demandée devraient être distribuées avec l'envoi en tirage papier ou électroniquement. Si quelques frais d'expédition sont exigibles, cela doit être clairement mentionnée sur la liste de graines ; dans la plupart des cas, les frais d'expédition réels couvriront tout juste les coûts de remboursement administratifs.

Il est important que les banques de graines maintiennent un stock de base de graines qui ne soit pas distribué. Ceci est réalisé en séparant physiquement les échantillons pour la conservation (collection de base) de ceux utilisés (collection active) ou en ayant un système de contrôle du stock sur la base de données de la banque de graines qui signale quand la portion active de l'échantillon est épuisée. Dans ce dernier cas, un système de stock de graines sécurisé sera nécessaire grâce auquel le système de gestion des données montre qu'il y a moins de graines dans la banque qu'elles sont en fait présentes. Cela peut être réalisé en déterminant la limite de confiance haute du poids moyen de 5 échantillons de 50 graines et en divisant le total du lot par cette valeur et en multipliant le résultat par 50, cela donne le nombre total des graines (voir Chapitre 1).

Du fait de la souveraineté nationale et des problèmes relatifs aux ressources génétiques (mis en évidence par la Convention sur la Diversité Biologique <http://www.cbd.int> et voir également the International Treaty on Plant Genetic Resources for Food and Agriculture <http://www.planttreaty.org/>), les échantillons de graines sont généralement envoyés associés à un « Agrément de Transfère du Matériel MTA » qui permet de contrôler à quoi les graines vont servir, si elles peuvent être transmises à une tierce partie et qui clarifie comment les éventuels bénéfices de leur utilisation vont être partagés. En effet, l'agrément exige que les conditions dans lesquelles la collecte de graines a été réalisée soit transmise à l'utilisateur. Dans la plupart des cas, les graines sont remises avec un accusé de réception du MTA. Une alternative est d'utiliser un bordereau que l'utilisateur accepte dès qu'il reçoit les graines. Un exemple de MTA peut être trouvé sur le site de la Millenium Seed Bank (<http://data.kew.org/seedlist/msa.pdf>). Il est important de demander aux utilisateurs l'usage prévu de l'échantillon. Cela peut être inclus dans le MTA.

L'état phytosanitaire est un autre problème à considérer quand on distribue des graines. Les graines peuvent circuler librement dans l'UE. Quand on envoie ou reçoit des graines de l'extérieur de l'UE, il faut se référer à la législation appropriée concernant l'état phytosanitaire. De plus, il faut contacter dans tous les cas les autorités nationales en liaison avec la CITES (<http://www.cites.org>) et la directive habitat (http://ec.europa.eu/environment/nature/legislation/habitatsdirective/index_en.htm).

Les conteneurs devraient être mis en température avant que les échantillons ne soient disposés pour éviter la condensation (la durée de chauffe dépend de la taille du conteneur mais dans la plupart des cas 24 heures devraient suffire). Ces échantillons devraient être choisis au hasard et emballés dans des sacs en aluminium (pour éviter la prise d'humidité avant l'utilisation) à l'intérieur d'enveloppes renforcées (rembourrés) pour expédition. L'état phytosanitaire ainsi que les documents d'identification devraient être dans une pochette plastique à l'extérieur de l'enveloppe.

RBGK a trouvé qu'un numéro de série (six caractères avec un caractère de vérification) est utile pour réduire les erreurs dans la préparation d'envois de graines.

La banque de graines devrait conserver une trace de ceux à qui les graines ont été envoyées et pour quel usage (ceci évite aussi les commandes répétées). Cette information est essentielle pour démontrer la valeur immédiate des collections de la banque de graines. Lorsque cela est possible, les responsables de la banque de graines devraient discuter les types de collections qui seraient utiles aux utilisateurs potentiels ; cela participerait à une utilisation optimum des collections.



Figure 28 Les collections actives de la Millennium Seed Bank. (© RBGK)

BIBLIOGRAPHIE

- Bacchetta, G., Fenu, G., Mattana, E. Piotto, B. & Virevaire, M. (eds). (2006). Manuale per la raccolta, studio, conservazione e gestione ex situ del germoplasma. Manuali e Linee Guida 37/2006. APAT, Italy.
- Bacchetta, G., Bueno Sánchez, Á., Fenu, G. Jiménez-Alfaro, B., Mattana, E., Piotto, B. & Virevaire, M. (eds). (2008). Conservación ex situ de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. pp. 378.
- Baskin, C.C. & Baskin, J.M. (1998). Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination. Academic Press, London.
- Baskin C.C. (2003). Breaking physical dormancy in seeds: focusing on the lens. *New Phytologist* 158(2): 229-232.
- Baskin, C.C., Thompson, K. & Baskin, J.M. (2006). Mistakes in germination ecology and how to avoid them. *Seed Science Research* 16: 165-168.
- Bone, J., Turner, R. & Tweddle, J. (2003). The Millennium Seed Bank Project's specimen and taxon databases. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 327-336. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_18.pdf
- Bridson, D. & Forman, L. (1998). *The herbarium handbook*. Revised edition. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Breese, E.L. (1989). Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. Free download from: http://www.bioversityinternational.org/publications/Web_version/209/
- Butler, L.H., Hay, F.R., Ellis, R.H. & Smith, R.D. (2009). Post-abscission pre-dispersal seeds of *Digitalis purpurea* L. remain in a developmental state that is not terminated by desiccation ex planta. *Annals of Botany* 103: 785-794.
- Chorlton, K.H., Sackville Hamilton, N.R., Thomas, I.D. & Jones, M.H. (2003). Vegetative collection of forage grasses and legumes, and method of regeneration for seed. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 203-207. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_10.pdf
- Center for Plant Conservation (1986). *Recommendations for the Collection and Ex Situ Management of Germplasm Resources from Rare Wild Plants*. Jamaica Plain, Mass., USA.
- Crane, J., Miller, A.L., Van Roekel, J.W. & Walters, C. (2003). Triacylglycerols determine the unusual storage physiology of *Cuphea* seed. *Planta* 217: 699-708.
- Cromarty, A.S., Ellis, R.H. & Roberts, E.H. (1990). *Handbooks for Genebanks: no. 1, The Design of Seed Storage Facilities for Genetic Conservation*. Revised edition. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy.
- Dickie, J.B., Ellis, R.H., Kraak, H.L., Ryder, K. & Tompsett, P.B. (1990). Temperature and seed storage longevity. *Annals of Botany* 65: 197-204.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H. (1985). *Handbooks for Genebanks: No. 2, Handbook of Seed Technology for Genebanks, Volume I. Principles and Methodology*. International Board for Plant Genetic

Resources, Rome, Italy. http://www.biodiversityinternational.org/publications/publications/publication/publication/handbook_of_seed_technology_for_genebanks_vol_i_principles_and_methodology.html

Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H. (1990). An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41:1167-1174.

Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H. (1995). Handbooks for Genebanks: No. 3 Handbook of Seed Technology for Genebanks - Volume II. Compendium of Specific Germination Information and Test Recommendations. International Board for Plant Genetic Resources, Rome, Italy. Available on the internet: <http://www.biodiversityinternational.org/publications/Web%5Fversion/52/>

Ellis, R.H. & Hong, T.D. (2007). Seed longevity – moisture content relationships in hermetic and open storage. *Seed Science & Technology* 35: 423-431.

Ellis, R.H. & Roberts, E.H. (1980). Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45: 13–30.

ENSCONET (2009). ENSCONET Seed Collecting Manual for Wild Species. <http://www.ensconet.eu/Download.htm>

ENSCONET database schema (2009) <http://www.ensconet.eu/Database.htm>

FAO / IPGRI (1994). Genebank Standards. Food and Agriculture Organisation of the United Nations / International Plant Genetic Resource Institute, Rome, Italy. http://www.biodiversityinternational.org/publications/publications/publication/publication/genebank_standards.html

Finch-Savage, W.E. & Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist* 171: 501–523.

Funk, V.A., Hoch, P.C., Prather, L.A. & Wagner, W.L. (2005) The Importance of Vouchers. *Taxon* 54(1): 127-129.

Goldblatt, P., Hoch, P.C. & McCook, L.M. (1992) Documenting Scientific Data: The Need for Voucher Specimens. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 74(4): 969-970.

Gomez-Campo, C. (2002). Long-term seed preservation: the risk of selecting inadequate containers is very high. *Monographs ETSIA, Univ. Politecnica de Madrid* 163: 1-10.

Gomez-Campo, C. (2006). Erosion of genetic resources within seed banks: the role of seed containers. *Seed Science Research* 16: 291-294.

Gomez-Campo, C. (2009). Efficient long term seed preservation. *Monographs ETSIA, Univ. Politecnica de Madrid* 171: 1-3.

Gosling, P.G. (2003). Viability testing. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 445-481. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_24.pdf

Havens, K., Guerrant, E.O., Maunder M. & Vitt, P. (2004). Appendix 3. Guidelines for Ex Situ Conservation Collection Management: Minimising Risks. In: Guerrant, E.O., Havens, K. & Maunder, M. (eds). *Ex Situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press, U.S.A.

Hay, F.R. & Probert, R.J. (1995). Seed maturity and the effect of different drying conditions on desiccation tolerance and seed longevity in foxglove (*Digitalis purpurea* L). *Annals of Botany* 76: 639-647.

ISTA (2008). International Rules for Seed Testing (edition 2008). International Seed Testing Association. Switzerland.

Linnington, S.H. (2003). The design of seed banks. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linnington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). Seed Conservation: Turning Science into Practice. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 591-636. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_33.pdf

Liu, K., Eastwood, R.J., Flynn, S., Turner, R.M. & Stuppy, W.H. (2008). Seed Information Database (release 7.1, May 2008). <http://www.kew.org/data/sid>

Manger, K.R., Adams, J. & Probert, R.J. (2003). Selecting containers for the Millennium Seed Bank Project: a technical review and survey. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linnington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). Seed Conservation: Turning Science into Practice. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 637-652. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_34.pdf

Millennium Seed Bank Project website www.kew.org/msbp

MSBP Technical Information Sheet 5. <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/05-eRH%20moisture%20measurement.pdf>

MSBP Technical Information Sheet 10 <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/10-Desiccation%20tolerance.pdf>

MSBP Technical Information Sheet 14 <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/14-Seed%20cleaning.pdf>

MSBP Technical Information Sheets and Manuals http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/info_sheets.htm

Offord, C.A. & Meagher, P.F. (2009). Plant Germplasm Conservation in Australia: Strategies and guidelines for developing, managing and utilising ex situ collections. The Australian Network for Plant Conservation in partnership with Australian Seed Conservation and Research.

Pérez-García, F., González-Benito, M.E. & Gómez-Campo, C. (2007). High viability recorded in ultra-dry seeds of 37 species of Brassicaceae after almost 40 years of storage. *Seed Science and Technology* 35: 143-153.

Pérez-García, F., González-Benito, M.E. & Gómez-Campo, C. (2008). Germination of fourteen endemic species from the Iberian Peninsula, Canary and Balearic Islands after 32-34 years of storage at low temperature and very low water content. *Seed Science and Technology* 36: 407- 422.

Pritchard, H.W. & Dickie, J.B. (2003). Predicting seed longevity: use and abuse of seed viability equations. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linnington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). Seed Conservation: Turning Science into Practice. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 653-722. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_35.pdf

Pritchard, H.W. & Nadarajan, J. (2008). Cryopreservation of orthodox (desiccation tolerant) seeds. In: Plant Cryopreservation: A Practical Guide, Reed B.M. (ed.). Springer Verlag, pp 485- 501.

Pritchard, H.W., Poynter, A.C. & Seaton, P.T. (1999). Interspecific variation in orchid seed longevity in relation to ultra-drying and cryopreservation. *Lindleyana* 14: 92-101.

Pritchard, H.W. & Seaton, P.T. (1993). Orchid seed storage. Historical perspective, current status and future prospects. *Selbyana* 14: 89-104.

Probert, R.J. (2003). Seed viability under ambient conditions and the importance of drying, In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linnington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). Seed Conservation: Turning Science into

- Practice. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 337-365. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_19.pdf
- Probert, R., Adams, J., Coneybeer, J., Crawford, A. & Hay, F. (2007). Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. *Australian Journal of Botany* 55: 326-335.
- Probert, R.J., & Hay, F.R. (2000). Keeping Seeds Alive. In: Black, M. & Bewley, J.D. (eds.), *Seed Technology and its Biological Basis*. 375-410. Sheffield Academic Press.
- Probert, R.J., Manger, K.R. & Adams, J. (2003). Non-destructive measurement of seed moisture. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 367-387. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_20.pdf
- Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. & Iarinde, M. (2006). Manual of seed handling in genebanks. Handbooks for genebanks No. 8. Bioversity International, Rome, Italy. For free download: http://www.bioversityinternational.org/publications/publications/publication/publication/manual_of_seed_handling_in_genebanks.html
- Richards, A.J. (1997). *Plant Breeding Systems*. Chapman & Hall, London.
- Roberts, E.H. & Ellis, R.H. (1989). Water and seed survival. *Annals of Botany* 63: 39-52.
- Schmidt, L. (2000). *Guide to Handling of Tropical and Subtropical Forest Seed*. Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark.
- 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, UK. <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/sctsip.htm>
- Stanwood, P.C. (1985). Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, Kartha K.K. (ed). pp. 199-226. Boca Raton: CRC Press.
- Terry, J., Probert, R.J. & Linington, S.H. (2003). Processing and maintenance of the Millennium Seed Bank collections. In: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds). *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 307-325. http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/SCTSIP_digital_book/pdfs/Chapter_17.pdf
- Thain, M. & Hickman, M. (2000). *The Penguin Dictionary of Biology*. Tenth edition. Penguin Books, London, UK.
- Tompsett, P.B. (1986). The effect of temperature and moisture content on the longevity of seed of *Ulmus carpiniifolia* and *Terminalia brassii*. *Annals of Botany* 57: 875-883.
- Vertucci, C.W., Roos, E.E. & Crane, J. (1994). Theoretical basis of protocols for seed storage. 3. Optimum moisture contents for pea-seeds stored at different temperatures. *Annals of Botany* 74: 531-540.
- Walters, C., Wheeler L. & Stanwood, P.C. (2004). Longevity of cryogenically stored seeds. *Cryobiology* 48: 229-244.
- Walters, C. (2007). Materials used for seed storage containers: response to Gómez-Campo [Seed Science Research 16: 291–294 (2006)]. *Seed Science Research* 17(4): 233-242.