Détermination de la valeur culturale des semences par la radiographie industrielle aux rayons X. Application aux pépins de pommier (*Malus pumila* Mill.)

André CHAVAGNAT & Marcel LE LEZEC (*)

I.N.R.A.-G.E.V.E.S. (Groupe d'Etude et de Contrôle des Variétés et des Semences), La Minière, F 78280 Guyancourt

(*) I.N.R.A., Station d'Arboriculture fruitière, Beaucouzé, F 49000 Angers

RÉSUMÉ

La détermination de la qualité des semences horticoles et forestières est souvent longue et délicate du fait que certaines d'entre elles présentent des difficultés à germer.

L'observation des clichés, obtenus par la radiographie instantanée aux rayons X, révèle la présence de semences bonnes, douteuses ou mauvaises. L'application aux pépins de pommier (*Malus pumila* Mill.) a permis de déterminer leur valeur pour le semis. Les pépins classés bons par radiographie ont germé à 90 p. 100 chez les variétés diploïdes et à 80 p. 100 chez les variétés triploïdes. Les pépins douteux ont germé respectivement à 27 et à 10 p. 100 et les pépins classés mauvais n'ont pas germé.

Cette technique moderne, rapide et non destructive, doit conduire à homogénéiser et à préciser la valeur culturale des lots de semences.

Mots clés additionnels : *Qualité des semences, Malus pumila Mill.*

SUMMARY

Assessment of seed quality by industrial X-ray radiography. Application to apple seeds (Malus pumila Mill.).

Assessment of the quality of seeds used in horticulture or forestry is often difficult and slow because some are not easily germinated. Observation of negatives obtained by instant X-ray radiography showed the presence of good, uncertain or bad seeds. The classification of apple seeds (*Malus pumila* Mill.) in this way was then verified by germination. Seeds classified good by X-ray radiography gave 90 % germination for diploid varieties and 80 % for triploid varieties, while uncertain seeds germinated only 27 % and 10 % respectively. Bad seeds completely failed to germinate. This modern non destructive technique can be used to homogenize seed lots and check their value.

Additional key words : *Seed quality, Malus pumila Mill.*

I. INTRODUCTION

Le contrôle de la qualité des semences fait l'objet de nombreuses recherches. L'estimation de la valeur pour le semis d'un lot de graines est un facteur important de progrès qu'il convient de déterminer avec le maximum de précision. Les semences constituent un produit vivant et leur comportement ne peut pas être prédit avec la certitude qui caractérise les essais de matériaux inertes.

De nombreux auteurs ont décrit les méthodes de contrôle des lots de semences, en particulier pour les pépins de pommier. Aux premiers tests basés sur la densité des semences, l'aspect de la graine et la couleur des téguments, ont succédé les tests de germination après stratification des pépins au froid humide (DECOURTYE & BRIAN, 1967) ou application de substances de croissance (RENARD, 1960 ; CÔME & DURAND, 1971).

En raison des difficultés de germination rencontrées

avec certaines espèces, des tests biochimiques au tétrazolium ou à l'indigo carmin ont été préconisés afin de déterminer la viabilité des semences d'arbres (MOORE, 1973 ; ENESCU, 1975 ; ROSTOVTSSEV & LYUBICH, 1978). Parallèlement, des travaux sur embryons excisés conduits par HEIT (1955), poursuivis par DURAND *et al.* (1975) et PERINO & CÔME (1979) ont permis d'améliorer la germination de lots particulièrement dormants.

Face à ces techniques, souvent longues et délicates (CHAVAGNAT, 1978), il était opportun de rechercher des solutions plus fiables, plus rapides et non destructives. C'est ce qui a été fait par certains spécialistes des semences forestières qui ont utilisé la radiographie aux rayons X. C'est le Professeur suédois LUNDSTRÖM qui, dès 1903, a utilisé pour la première fois la radiographie industrielle. Il a été suivi, entre autres, en Suède par SIMAK & GUSTAFSSON (1953), en France par BOUVAREL & LEMOINE (1959), aux U.S.A. par BELCHER (1968) et en Belgique par DEVILLEZ *et al.* (1973).

Le Groupe d'Etude et de Contrôle des Variétés et des Semences (GEVES), à la Minière, s'est équipé d'un matériel de radiographie et a engagé, à partir de 1977, des essais sur les semences horticoles (CHAVAGNAT, 1983). Des études conduites en collaboration avec la Station de Recherches d'Arboriculture fruitière d'Angers ont été menées sur des pépins de pommier.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les pépins de pommier répondaient bien au modèle expérimental pour les objectifs que nous nous étions fixés :

- *au niveau de la radiographie* : déterminer et dénombrer les semences vides, endommagées ou pleines ; les pépins de pommier sont suffisamment gros pour être bien positionnés et facilement observés ; les clichés radiographiques obtenus sont parfaitement lisibles, bien contrastés ;

- *au niveau de la germination* : suivre l'évolution de chaque semence ; les pépins, de par leur morphologie, présentent l'avantage de pouvoir être manipulés et observés sans précaution particulière ; les problèmes de pureté spécifique et de germination sont très proches de ceux rencontrés chez certaines semences d'arbres forestiers. Les lots sont souvent de qualité médiocre avec des germinations longues et difficiles ;

- *au niveau de l'expérimentation* : comparer les indications de la radiographie et les résultats de la germination, établir des corrélations entre la structure interne révélée par la radiographie et l'aptitude à la germination de la même semence afin de définir valablement les « critères radiographiques » permettant de classer les semences mauvaises, douteuses et bonnes.

A. Matériel

1. Semences

Les pépins étudiés ont été prélevés dans les fruits de 5 variétés de pommier qui représentent à elles seules plus de 90 p. 100 de la production française de pommes :

- 3 variétés diploïdes ($2n = 34$ chromosomes)

« Golden Delicious », « Delicious Rouge », « Reine des Reinettes ».

- 2 variétés triploïdes ($3n = 51$ chromosomes) « Belle de Boskoop », « Requette Grise du Canada ».

Les pépins utilisés dans ces essais proviennent des vergers de la Station de Recherches d'Arboriculture fruitière d'Angers. Ils ont été extraits de fruits cueillis à date de maturité normale et n'ont pas subi d'entreposage au froid.

2. Radiographie

La radiographie instantanée aux rayons X, appliquée aux semences, est la radiographie industrielle. Elle permet d'obtenir des images de la structure interne d'une semence sans pour cela la dégrader ou entraîner sa destruction.

L'appareil utilisé est le Faxitron, type 43 805 N, de la Société HEWLETT PACKARD, commercialisé en France par COMSATEC. Cet appareil autoprotégé et peu encombrant ($104 \times 56 \times 51$ cm de dimensions extérieures), renferme un compartiment d'irradiation qui ne nécessite, pour son utilisation, ni chambre plombée, ni refroidissement par eau. Le tube à rayons X possède une fenêtre de béryllium transmettant des rayons X de basse énergie avec le minimum d'alternation, assurant ainsi un contraste optimal des clichés.

Nous utilisons dans ces essais des films Kodak Industrex M. à double émulsion, de type gélatino-argentique couchés sur support ESTAR. Leur haut contraste et leur faible granulation permettent d'avoir une bonne définition et d'obtenir des détails radiographiques très fins (COUTEL, 1977).

B. Méthodes

Pour chaque variété, les essais sont effectués avec 4 répétitions de 100 pépins disposés sur des étiquettes autocollantes suivant 10 lignes parallèles de 10 semences. Chaque pépin est ainsi facilement individualisé, numéroté et suivi tout au long de l'essai, depuis sa radiographie jusqu'au stade plantule ou jeune plant (fig. 1).

Les étiquettes fixant les semences sèches sont placées sur les films radiographiques à l'intérieur du compartiment d'irradiation. Les meilleurs clichés sont obtenus lorsque les semences, placées à 40 cm de la source émettrice, reçoivent une tension de 15 KV sous 3 mA pendant 2 mn 30 d'exposition. Des essais préliminaires effectués sur différentes variétés de semences de pommier ont montré le caractère non destructif de la radiographie. Des expositions répétées correspondant à 50 fois la dose classiquement utilisée n'ont pas modifié la qualité des semences traitées par rapport au témoin.

Les observations des clichés sont faites sur des lecteurs agrandisseurs de type négatoscope, avec des grossissements de 6, 24, 48 ou 87 fois.

Les pépins sont classés et dénombrés suivant 3 catégories : mauvais, douteux, bons (fig. 2).

- Mauvais : pépins sans embryon ni cotylédon qui ne peuvent pas donner de plantule.

- Douteux : pépins plus ou moins bien formés sur lesquels il est difficile de porter un jugement.

Figure 1
Radiographie des pépins de pommier disposés par répétitions de 100 semences pour deux variétés : 1 — « Golden Delicious » ; 2 — « Belle de Boskoop ».

Radiography of apple seeds arranged by replication of 100 seeds for two varieties : 1 — « Golden Delicious » ; 2 — « Belle de Boskoop ».

Figure 2
Classement des pépins de pommier observés : 1 — embryons doubles ; 2 — mauvais ; 3 — douteux ; 4 — bons.
Classification of observed apple seeds : 1 — double embryos ; 2 — bad ; 3 — uncertain ; 4 — good.

— Bons : pépins morphologiquement bien constitués, susceptibles de donner des plantules normales.

Les pépins mal placés ou déplacés accidentellement lors des manipulations, ou ceux présentant des embryons doubles, n'ont pas pu être observés correc-

tement : ils ont été retirés de l'essai. L'évolution des techniques de prise de clichés doit permettre ultérieurement de prendre en compte la totalité des pépins de chaque échantillon.

Nous avons utilisé la méthode de stratification au froid humide qui permet de lever la dormance des pépins et d'obtenir une germination plus groupée et plus complète.

Les plaques de culture, ou plaques « multi-trous » contiennent le substrat de germination, composé d'un mélange de 50 p. 100 de terreau de feuilles et de 50 p. 100 de sable de Loire. Le substrat dont le pH doit être voisin de 7 a été neutralisé par addition de chaux magnésienne.

Après la radiographie, les pépins sont prélevés un à un et placés dans les trous de la plaque suivant la même disposition afin de faciliter les observations et les notations prévues. Les plaques convenablement humidifiées sont placées en chambre froide à la température de 2 °C pendant 70 j, puis en serre climatisée à la température de 20 °C.

Après un délai de 3 semaines, les observations sont effectuées tous les 7 j afin de suivre l'évolution de la germination.

III. RÉSULTATS

Les résultats de la lecture radiographique et des pépins germés après stratification ont été regroupés dans le tableau 1.

TABLEAU 1
Répartition des pépins de pommier par catégorie : examens radiographiques et germination.
Classification of apple seeds by categories : radiographic investigation and germination

Variétés	Nombre total de pépins par répétition	vides		douteux		bons	
		radio	germination	radio	germination	radio	germination
<i>Diploïdes</i>							
« Delicious Rouge »	98	1	—	3	1	94	89
	100	2	—	4	2	94	93
	100	2	—	3	0	95	93
	100	3	—	4	1	93	83
« Golden Delicious »	98	8	—	1	0	89	83
	100	3	—	1	0	96	90
	99	2	—	3	1	94	82
	100	1	—	4	2	95	85
« Reine des Reinettes »	96	5	—	6	0	85	60
	96	8	—	3	0	85	79
	99	2	—	12	5	85	68
	97	4	—	4	1	89	80
<i>Triploïdes</i>							
« Belle de Boskoop »	95	52	—	15	2	28	18
	92	38	—	24	1	30	20
	100	33	—	41	0	26	12
	98	39	—	47	5	12	5
« Reinette du Canada »	100	20	—	26	1	54	47
	98	30	—	26	7	42	33
	99	36	—	8	2	55	51
	98	3	—	20	3	75	70

Les pépins vides, plats, sont généralement détectables à l'œil nu, mais ils apparaissent plus nettement sur le cliché radiographique. N'ayant ni embryon ni albumen, ils ne germent pas et ne donnent pas de plantule. Leur nombre variait de 3,5 p. 100 en moyenne chez les variétés diploïdes à 32 p. 100 chez les variétés triploïdes.

L'interprétation des résultats concernant les pépins des variétés diploïdes a été volontairement séparée de celle concernant les pépins des variétés triploïdes. En effet, les pépins provenant des variétés triploïdes sont à nombre variable de chromosomes (entre 34 et 51). Cette garniture chromosomique anormale nécessite une analyse séparée de celle appliquée aux pépins normaux diploïdes.

A. Variétés diploïdes

Les pépins d'apparence extérieure normale, regroupant les pépins bons et les pépins douteux à la radiographie, ont germé à 87 p. 100.

Pour préciser les relations existant entre le nombre des pépins d'apparence normale sans recours à la radiographie et les résultats des tests de germination, nous avons estimé le coefficient de corrélation (tabl. 2).

Ces pépins ont pu être classés grâce à la radiographie en 2 catégories : pépins douteux et pépins bons. Les pépins bons (93 p. 100 de la population) germent à 90 p. 100. Il existe une très bonne corrélation entre les observations effectuées à la radiographie et le nombre de pépins germés pour l'ensemble des 3 variétés diploïdes. Les pépins douteux (4 p. 100 de la population) n'ont germé qu'à 27 p. 100.

TABLEAU 2
Corrélation estimée entre la lecture radiographique et le nombre de pépins germés.
Estimated correlation between radiographic investigation and germination.

Variétés	nbre moyen de pépins par échantillon	nbre moyen de pépins germés	coefficient de corrélation	intervalles de confiance pour une probabilité de 0,95
<i>Diploïdes</i>				
Totaux	95,2	83,2	0,58	0,11-0,88
Pépins bons	91,2	82,1	0,85	0,43-0,96
Pépins douteux	4,0	1,1	0,84	0,45-0,96
<i>Triploïdes</i>				
Totaux	66,1	34,6	0,79	0,10-0,97
Pépins bons	40,2	32,0	0,99	0,94-1,00
Pépins douteux	25,9	2,6	0,23	-0,78-0,91

B. Variétés triploïdes

Les pépins d'apparence extérieure normale ont germé à 52 p. 100 et le coefficient de corrélation estimé est significatif (tabl. 2).

Les pépins classés bons par radiographie (41 p. 100 de la population) ont germé à 80 p. 100. On obtient là aussi un très bon coefficient de corrélation. Les pépins classés douteux (27 p. 100 de la population) n'ont germé qu'à 10 p. 100.

Ces résultats très encourageants permettent d'estimer, à partir du nombre de pépins classés bons par radiographie, le nombre de pépins pouvant germer.

Il faut toutefois signaler que toutes les plantules n'ont pas survécu. En effet, un facteur génétique vient entraver la survie de la plantule chez certaines variétés de pommier. Il s'agit du facteur létal récessif *viridis* décrit par DECOURTYE (1967). Il se manifeste 2 à 3 semaines après le début de la germination. La plantule, verte au départ, jaunit et se fane et la radicule s'allonge sans émettre de radicelles. La constitution génétique de la plupart des variétés est connue LL ou L1 (« Golden Delicious » et « Reine des Reinettes » L1, « Delicious Rouge » LL). Ce phénomène génétique non détecté par la radiographie peut atteindre 25 p. 100 des jeunes plants.

IV. DISCUSSION

L'examen des clichés radiographiques permet de repérer aisément les semences vides, bien ou mal formées, endommagées ou doubles, ce qui n'est pas toujours possible avec les méthodes classiques. L'utilisation d'un négatoscope agrandisseur précise encore mieux la morphologie interne des semences.

Le choix d'un matériel plus performant, le recours à des techniques comme la radioscopie et la stéréoradiographie (KAMRA *et al.*, 1973), l'adaptation d'un système de traitement de l'image du type vision assistée par ordinateur devraient nous permettre de progresser dans l'étude de la qualité des semences. Les observations ont été faites sur des semences sèches mais il est possible de radiographier des semences imbibées. La qualité des images obtenues est moins bonne mais on peut faciliter la lecture en introduisant des agents contrastants d'image comme les sels de baryum ou le chloroforme (SIMAK, 1974). Des études dans ce sens sont entreprises afin de suivre l'évolution des semences en cours de stockage et en cours de germination.

Quelle que soit la ploïdie des pépins, la corrélation est bonne entre les pépins classés bons à la radiographie et l'obtention de jeunes plants. Elle est nettement moins bonne pour les pépins jugés douteux. En ce qui concerne cette dernière catégorie, l'explication réside sans doute dans le fait qu'à côté des caractéristiques

morphologiques, interviennent des caractéristiques physiologiques non mises en évidence par la radiographie.

V. CONCLUSION

La radiographie instantanée aux rayons X est largement utilisée dans l'industrie comme moyen de contrôle non destructif. Son adaptation aux semences a permis de préciser, sans les endommager ni les détruire, la valeur pour le semis des pépins de pommier quelle que soit leur garniture chromosomique. Ces études révèlent parfaitement la présence des semences vides, endommagées, mal formées ou à embryons doubles.

Nous avons mis en évidence la très bonne corrélation existant entre les pépins jugés bons à la radiographie et le nombre de plantules germées, de même que nous avons confirmé l'absence totale de germination des pépins vides.

Les pépins classés douteux, qui germent dans une très faible proportion, peuvent être repérés et éliminés.

Cette technique est particulièrement bien adaptée aux semences horticoles et forestières ainsi qu'à certaines semences hybrides rares et chères dont la germination est souvent longue et difficile. Elle ne résoudra pas tous les problèmes liés aux semences, mais elle apportera des informations nouvelles, utiles, voire même indispensables pour la poursuite des travaux scientifiques, l'homogénéisation et le contrôle de la qualité commerciale des lots de semences.

Enfin, la radiographie permet d'archiver des images qui peuvent être examinées à tout moment.

Reçu le 9 mai 1984.

Accepté le 12 octobre 1984.

VI. REMERCIEMENTS

Nous remercions Béatrice JEUDY et Christine GOFRON du GEVES et J. BABIN de la Station de Recherches d'Arboriculture fruitière pour leur collaboration dans la réalisation de ce travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Belcher E. W., 1968. Use of soft X-ray in tree seed testing and research. *Proc. Southeast Forestry Radiography Workshop*, Athens, Ga, U.S. Forest Service, Atlanta, Ga., 1-10.
- Bouvarel P., Lemoine M., 1959. L'examen des graines forestières aux rayons X. *Rev. For. Fr.*, 8-9, 617-624.
- Chavagnat A., 1978. Utilisation des tests topographiques au tétrazolum pour déterminer la viabilité des semences d'arbres et d'arbustes d'ornement. *Hortic. Fr.*, 99, 9-12.
- Chavagnat A., 1983. Détermination de la valeur culturale des semences horticoles. *P.H.M.-Rev. Hortic.*, 239, 17-20.
- Côme D., Durand M., 1971. Influence de l'acide gibbérellique sur la levée de dormance des embryons de pommier (*Pyrus malus* L.) par le froid. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 273, 1937-1940.
- Coutel L., 1977. Surfaces sensibles pour radiographie industrielle. *Acta electronica*, 20, 33-39.
- Decourtye L., 1967. Etude de quelques caractères à contrôle génétique simple chez le pommier (*Malus sp.*) et le poirier (*Pyrus communis*). *Ann. Amélior. Plant.*, 17 (3), 243-265.
- Decourtye L., Brian C., 1967. Détermination des besoins en froid des pépins de pomacées. Interprétation des courbes de germination. *Ann. Amélior. Plant.*, 17 (4), 375-391.
- Devillez F., Oldenhove de Guertechin M., 1973. X-ray contrast method and germination test of stratified or unstratified Douglas-fir seeds from two origins. *Proc. I.U.F.R.O., International Symposium on Seed Processing*, Bergen, Norway, 1, paper 5.
- Durand M., Thevenot C., Côme D., 1975. Rôle des cotylédons dans la germination et la levée de dormance de l'axe embryonnaire du pommier après traitement par l'acide abscissique. *Physiol. Vég.*, 13 (3), 603-610.
- Enescu V., 1975. Utilisation of tetrazolium test for seed viability

determination. *I.S.T.A. Workshop on Forest - tree seed testing*. Alice Holt Lodge, England, July, 6-12.

Heit C. E., 1955. The excised embryo method for testing germination quality of dormant seed. *Proc. Ass. of Seed Analysts N. AM.55*, 108-117. Association Internationale des essais de semences, Règles internationales pour les essais de semences. *Seed Sci. and Technol.*, 4, règles 1976, annexes 1976.

Kamra S. K., Meyer W., Wegelius C., 1973. Stereoradiography for increased information and accuracy in seed quality testing. *Proc. I.U.F.R.O. international Symposium on Seed Processing*, Bergen, Norway, Vol. 1, paper 10.

Lundström A., 1904. Minutes from a meeting of the Forestry Association of Nortland held at the Robertsfors works, June 20, 1903, 14-15 (SV) D.

Moore R. P., 1973. Tetrazolium testing practices and guides. *Proc. I.U.F.R.O. International Symposium on Seed Processing*, Bergen, Norway, 1, paper 14.

Perino C., Côme D., 1979. Conditions de germination de l'embryon de pommier et croissance de la racine et de l'hypocotyle de la plante. *Physiol. Vég.*, 17 (4), 829-838.

Renard H. A., 1960. Contribution à l'étude de l'influence de la gibbérelline sur la dormance de certaines graines. *Ann. Physiol. Vég.*, 2, 99-107.

Rostovtsev S. A., Lyubich E. S., 1978. Determination of the viability of tree and shrub by staining with indigocarmine in the USSR. *Seed Sci. Technology.*, 6, 869-875.

Simak M., Gustafsson A., 1953. X-ray photography and sensitivity on forest tree species. *Hereditas*, 39, 458-468.

Simak M., 1974. Various X-ray contrast agent for testing seed viability of *Pinus silvestris* L. *Proc. Seed X-ray Symp.*, Macon, Ga, 29-39. U.S. Forest Service, Atlanta Ga.

Le Directeur de publication : B. HURPIN

I.N. 5.036.001

Dépôt légal : Mars 1985. N° d'impression : 33546

CPPAP n° 1553 AD