

**Scheda tecnica per il controllo della  
qualità dei substrati  
utilizzati per le analisi di germinabilità**

Alessandra Arioli, Sara Gaudenzi, Fabio Ferrari, Rita Zecchinelli



*Fig. 1 Sementi di specie diverse poste a germinare su dischi di carta da filtro, substrato organico, carta pieghettata, sabbia (da sinistra a destra)*

## INDICE

<b>Premessa</b>	Pag. 2
<b>1 REQUISITI DI QUALITÀ DEI SUBSTRATI</b>	Pag. 3
1.1 pH	Pag. 3
1.2 Capacità di ritenuta idrica	Pag. 3
1.3 Pulizia e assenza di tossicità	Pag. 3
1.4 Conducibilità elettrica	Pag. 3
1.5 Composizione dei substrati	Pag. 3
<b>2 CONTROLLI DI QUALITÀ DEI SUBSTRATI</b>	Pag. 4
<b>2.1 Procedura per la determinazione del pH</b>	Pag. 4
2.1.1 Carta da filtro	Pag. 4
2.1.2 Sabbia silicea e substrato organico	Pag. 5
2.1.3 Risultato finale	Pag. 5
<b>2.2 Procedura per la determinazione della capacità di ritenuta idrica</b>	Pag. 6
2.2.1 Determinazione dell'umidità iniziale	Pag. 6
2.2.2 Calcoli	Pag. 7
2.2.3 Calcolo della capacità di ritenuta idrica	Pag. 8
2.2.4 Carta da filtro (tutti i tipi)	Pag. 8
2.2.5 Sabbia silicea e substrato organico	Pag. 9
2.2.6 Calcoli	Pag. 9
<b>2.3 Procedura per la determinazione della fitotossicità per determinare l'innocuità e la pulizia del substrato</b>	Pag. 10
2.3.1 Risultato finale	Pag. 11
<b>2.4 Procedura per la determinazione della granulometria della sabbia</b>	Pag. 11
2.4.1 Risultato finale	Pag. 12

## Premessa

Il substrato di germinazione rappresenta uno dei fattori determinanti, capaci di condizionare il risultato della prova della germinabilità. Il substrato deve fornire ancoraggio alle radici della plantula in crescita e garantire sufficiente disponibilità di aria e acqua. La sua scelta è condizionata da quanto prescritto dai Metodi Ufficiali di Analisi delle Sementi (DM 22/12/1992) e dalle Norme ISTA (*International Rules for Seed Testing*).

Per ogni specie è possibile utilizzare quale substrato primario solo quello prescritto o, applicando i metodi internazionali, scegliere fra alcune alternative. Le Norme ISTA, infatti, lasciano il laboratorio libero di optare per il substrato che preferisce fra quelli indicati per la specie.

I substrati utilizzati dal Laboratorio Analisi Sementi di Tavazzano (LO) per l'analisi delle sementi sono i seguenti (fig. 2):

- carta
- sabbia silicea
- substrato organico

Sono utilizzate le seguenti tipologie di carta:

- dischi con formato e spessore diversi
- fogli
- carta pieghettata

Le Norme ISTA prevedono che i substrati rispondano a determinati requisiti per quanto riguarda il pH, la capacità di ritenuta idrica, l'assenza di fitotossicità, la conducibilità elettrica e la composizione.



Fig. 2 Diversi utilizzi e preparazione dei substrati in laboratorio

# 1 REQUISITI DI QUALITÀ DEI SUBSTRATI

Ogni nuova fornitura deve essere verificata in relazione ai requisiti di qualità sotto descritti.

## 1.1 pH

Il principio generale è quello di misurare il valore in riferimento all'acqua disponibile per la germinazione, quando questa è stata aggiunta al substrato. Il range di pH consentito è compreso tra 6,0 e 7,5 .

## 1.2 Capacità di ritenuta idrica

Dopo l'aggiunta di acqua, il substrato deve possedere la capacità di trattenere un quantitativo di acqua sufficiente, in modo che le radici ne vengano costantemente rifornite, garantendo nel contempo la circolazione dell'aria necessaria. La quantità ideale di acqua da aggiungere al substrato dipende dalla specie in esame e viene calcolata dal laboratorio sulla base della capacità massima di ritenuta idrica del substrato stesso. Questa rappresenta la quantità massima di acqua che il substrato è in grado di trattenere e viene espressa come percentuale del peso secco del substrato.

## 1.3 Pulizia e assenza di tossicità

Il substrato deve essere esente da semi, funghi, batteri e sostanze tossiche che possono interferire con il processo di germinazione, lo sviluppo e la valutazione dei germinelli.

## 1.4 Conducibilità elettrica

La salinità deve essere la più bassa possibile, comunque inferiore a 40 millisiemens per metro. La misurazione della conducibilità può essere sostituita dai test biologici realizzati per accertare l'assenza di fitotossicità.

## 1.5 Composizione dei substrati

Carta: deve essere costituita da cellulosa vegetale purificata, può avere vari formati e deve garantire che le radici si sviluppino al di sopra della stessa senza infiltrarsi al suo interno. Inoltre, deve essere sufficientemente resistente alla manipolazione, senza rompersi durante la prova.

Sabbia silicea: la composizione ottimale è costituita da particelle uniformi di diametro compreso tra lo 0,05 e 0,8 mm, preferibilmente di forma tondeggianti. Il 90% delle particelle deve passare attraverso un setaccio di 0,8 mm ed essere trattenuto da un setaccio di 0,05 mm.

Substrato organico: deve essere costituito da particelle organiche (torba, fibre di cocco o di legno) di dimensioni non inferiori a 5 mm e da particelle minerali presenti in proporzione di circa il 20%. Il 90% delle particelle minerali deve passare attraverso un setaccio di 2 mm ed essere trattenuto da un setaccio di 0,05 mm.

## 2 CONTROLLI DI QUALITÀ DEI SUBSTRATI

La maggior parte delle verifiche di qualità sui substrati, possono essere effettuate agevolmente in laboratorio e il controllo deve essere eseguito per ogni nuova fornitura.

### 2.1 Procedura per la determinazione del pH

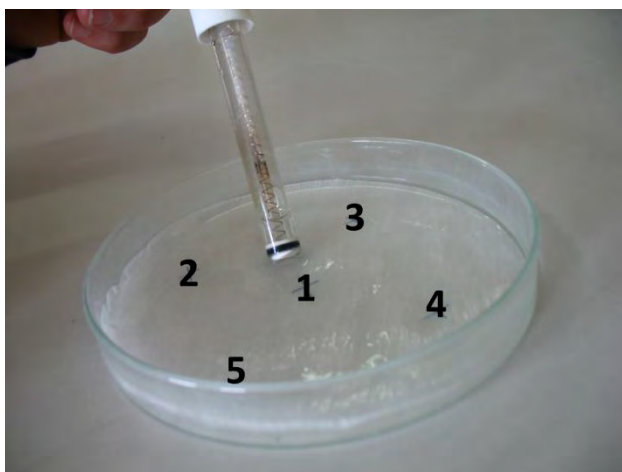
#### *Materiali e attrezzature utilizzati*

- pH-metro con sonda (per la carta usare una sonda specifica per superfici solide)
- Becker di varie misure
- Capsule Petri
- Acqua (è necessario utilizzare l'acqua normalmente usata per le analisi)

Il valore del pH controllato nel substrato, secondo le norme ISTA, deve essere compreso tra 6,0 e 7,5. La misurazione viene effettuata in modo diverso, a seconda del tipo di substrato. La determinazione deve essere eseguita su tre ripetizioni.

#### 2.1.1 Carta da filtro

La procedura può essere utilizzata per tutti i tipi di carta da filtro. Si preparano tre germinatoi normalmente utilizzati per il tipo di carta in esame, in cui il substrato (dischi o porzioni di fogli) viene inumidito con l'acqua abitualmente usata per le prove di germinazione. Dopo circa 30 minuti si effettua la misurazione in ciascun germinatoio, in cinque punti diversi (fig. 3). Il pH viene misurato sulla superficie utilizzando il pH-metro fornito di sonda specifica per carta e preventivamente sottoposto a taratura. I valori medi ottenuti dalle tre replicazioni, non devono differire per più dello 0,5 e il valore del pH è dato dalla media dei valori medi ottenuti per le tre ripetizioni e deve essere eseguito su tutti i tipi o formati di carta utilizzati dal laboratorio.



*Fig. 3 Misurazione del pH della carta da filtro inumidita con acqua in 5 punti differenti*

Tabella 1. Esempio di verifica del pH su dischi di carta da filtro

Tipo di carta: dischi Ø 14			Data: gg/mm/aaaa		Operatore: A.A.			
Campione 1	pH 6,24	pH 6,18	pH 6,14	pH 6,27	pH 6,05	media	6,2	
Campione 2	pH 6,37	pH 6,13	pH 6,34	pH 6,15	pH 6,17	media	6,2	
Campione 3	pH 6,24	pH 6,23	pH 6,19	pH 6,25	pH 6,08	media	6,2	
							<b>pH</b>	<b>6,2</b>

### 2.1.2 Sabbia silicea e substrato organico

Si mescola un volume di substrato pari a 5 ml o più con cinque volumi di acqua usata per le prove di germinazione (fig.4), la miscela viene agitata per 5 minuti (fig.5) e lasciata riposare da un minimo di 2 ore ad un massimo di 24 ore. Dopo tale periodo si agita la miscela e si effettua la misurazione della soluzione in sospensione con sonda per liquidi (fig.6).



Fig. 4 Preparazione, 5 volumi di acqua con 1 volume di substrato



Fig. 5 Agitazione della miscela per 5 minuti



Fig. 6 Misurazione con sonda per liquidi

La determinazione si effettua su tre replicazioni, il cui valore non deve differire per più di 0,5. Il valore del pH è dato dalla media delle tre rilevazioni effettuate.

Tabella 2. Esempio di verifica del pH di substrato organico

Substrato: organico (tipo XXX)	Data: gg/mm/aaaa	Operatore: A.A.
Campione 1		pH 7,0
Campione 2		pH 7,1
Campione 3		pH 7,3
<b>MEDIA</b>		<b>pH 7,1</b>

### 2.1.3 Risultato finale

Se il valore del pH non rientra nei limiti indicati dalle norme ISTA, bisogna effettuare un secondo controllo. Se anche questo caso, il valore rilevato per ogni substrato non rientra nei limiti stabiliti, è necessario escludere dall'uso il substrato e provvedere ad una nuova fornitura.



In alternativa alla misurazione con pH-metro, è consentito l'impiego di cartine indicatrici per la misurazione del pH di scala appropriata, anche se l'indicazione fornita è meno precisa.

## **2.2 Procedura per la determinazione della capacità di ritenuta idrica**

Il calcolo della capacità massima di ritenuta idrica, prevede lo step preliminare di determinazione dell'umidità contenuta inizialmente nel substrato.

Il contenuto di umidità del substrato (MC) viene misurato con metodo analogo a quello della temperatura alta costante descritto nelle Regole ISTA per l'analisi delle sementi (130-133°C 1 h  $\pm$ 3 min).

### **2.2.1 Determinazione dell'umidità iniziale**

#### ***Materiali e attrezzature utilizzati***

- Stufa
- Essiccatoi in vetro contenenti gel di silice con indicatore al cloruro di cobalto
- Pesafiltri con coperchio, diametro compreso tra 5 cm e 8 cm
- Bilancia di precisione 0,001 g
- Guanti protettivi per stufa



*Fig. 7 Preparazione della determinazione del contenuto di umidità iniziale del substrato*

Lo scopo di questa fase preliminare è la misurazione della quantità di acqua presente nel substrato al momento della fornitura. Per ogni substrato da controllare si effettuano tre repliche. Il pesafiltro, appositamente numerato, viene pesato vuoto alla 3<sup>a</sup> cifra decimale annotando il peso della tara. Successivamente, al suo interno viene posto il substrato (fig.8-9) prelevato da una confezione integra. Tutti i substrati devono essere manipolati con l'ausilio di pinzette o palette, al fine di evitare il contatto con le dita e la carta deve essere preventivamente tagliata in pezzetti per poter essere inserita nel pesafiltro. Il pesafiltro viene richiuso con coperchio identificato dallo stesso numero e pesato nuovamente prima di essere posto in stufa. La differenza fra questo peso e quello della tara precedentemente calcolato, rappresenta il peso umido del substrato ( $W_S$ ) che viene annotato, sempre con approssimazione alla 3<sup>a</sup> cifra decimale (fig. 10).

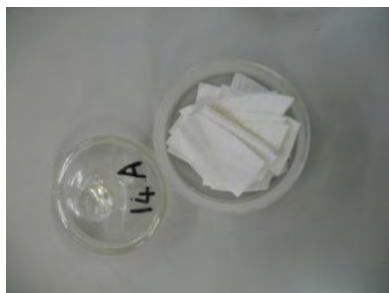


Fig.8 Pesafiltro con carta da filtro



Fig.9 Pesafiltro con sabbia



Fig.10 Bilancia a 3 cifre decimali

I pesafiltri vengono posti nella stufa a 130°C, ogni coperchio viene rimosso e posto all'interno della stufa accanto al proprio pesafiltro. La stufa viene chiusa per il tempo prestabilito (1h ± 3'), calcolato a partire dal momento in cui la stufa, dopo apertura e chiusura, ha raggiunto nuovamente 130 °C.

Al termine del periodo previsto, la stufa viene aperta e i pesafiltri richiusi immediatamente ciascuno con il proprio coperchio, utilizzando i guanti protettivi. Prima di essere pesati, i pesafiltri vengono posti in essiccatoi per 45' (fig.11), in attesa che si raffreddino (fig. 12). Il colore del gel di silice (blu) all'interno degli essiccatoi, indica assenza di umidità.



Fig. 11-12 Essiccatoio utilizzato durante la verifica dell'umidità iniziale del substrato

Al termine del periodo trascorso, i pesafiltri vengono pesati e, sottratta la tara, si ricava il peso secco del substrato (DW), sempre con approssimazione alla 3<sup>a</sup> cifra decimale. Terminata la pesata, il pesafiltro viene nuovamente riposto nell'essiccatoio, fino al termine della fase di calcolo.

### 2.2.2 Calcoli

Per il calcolo dell'umidità iniziale del substrato, così come per quelli successivi, si può utilizzare il foglio di calcolo "Calculation of Water Retention of Germination Media", disponibile sul sito Internet ISTA (<http://seedtest.org/en/tool-box-content---1--1191.html>). L'esempio in tabella 3 utilizza il foglio di calcolo sopra descritto, previa traduzione dall'inglese del testo originario.

Tabella 3: Esempio di verifica della ritenuta idrica su carta da filtro Ø11

**Contenuto d'umidità misurato nel substrato**

	Replica 1	Replica 2
1. Peso del pesafiltro vuoto (g)	52,056	61,340
2. Peso del pesafiltro con substrato (g)	53,605	62,859
3. Peso del pesafiltro con substrato dopo l'essiccamento (g)	53,497	62,741
4. Umidità contenuta	6,97%	7,77%

<b>A. Umidità contenuta nel substrato</b>	<b>7,4%</b>
---	-------------

Di seguito viene riportata la formula da utilizzare nel calcolo manuale:

$$MC = \frac{W_S - DW}{W_S} \times 100$$

$W_S$  = peso del substrato prima dell'essiccamento in stufa (peso umido)

$DW$  = peso del substrato dopo l'essiccamento in stufa (peso secco)

$MC$  = percentuale di umidità del substrato

Il valore della percentuale di umidità iniziale del substrato da utilizzare nella seconda fase della procedura di determinazione della capacità di ritenuta idrica è dato dalla media delle tre ripetizioni.

### 2.2.3 Calcolo della capacità di ritenuta idrica

#### *Materiali e attrezzature utilizzati*

- Bilancia di precisione 0,001 g
- Vasi di plastica con fori di drenaggio sul fondo
- Griglia o contenitori con fori di drenaggio
- Bacinelle di contenimento
- Pellicola per evitare evaporazione
- Pinzette

Scopo della procedura è misurare la quantità massima di acqua trattenuta dal substrato. Questa quantità viene espressa in percentuale sul peso secco del substrato.

La preparazione per la misurazione varia a seconda del tipo di substrato e viene eseguita su tre ripetizioni.

### 2.2.4 Carta da filtro (tutti i tipi)

Il substrato di carta viene sempre manipolato con l'ausilio di pinzette per evitare alterazioni, ed il peso ( $W_S$ ) è annotato con tre cifre decimali. Il substrato viene immerso completamente in una bacinella d'acqua e lasciato fino a completa saturazione (fig.13). Una volta saturo, sempre con l'ausilio di pinzette, la carta viene posta su una griglia (fig.14) che lascia filtrare l'eccesso di acqua, per un periodo di almeno 12 ore. La bacinella viene lasciata a temperatura ambiente per tutto il periodo e, per evitare l'evaporazione, viene coperta con pellicola o altro materiale isolante.





Fig. 13: Substrato immerso in  $H_2O$  fino a saturazione



Fig. 14: Substrato posto sulla griglia per il drenaggio

Al termine del tempo previsto, l'eccesso di acqua è stato drenato e il substrato ha raggiunto la sua massima capacità di ritenuta; il suo peso viene annotato come  $W_{FC}$ . La pesata deve essere effettuata sempre con l'ausilio di pinzette, utilizzando bilancia a 3 cifre decimali.

I calcoli finali per la determinazione della capacità di ritenuta idrica vengono eseguiti come illustrato nel punto 2.2.6 "Calcoli" per tutti i tipi di substrato.

### 2.2.5 Sabbia silicea e substrato organico

Per ogni ripetizione, il substrato viene pesato all'interno di vasi di plastica, preventivamente pesati per determinare la tara, con fori coperti da un filtro di carta che consente il drenaggio dell'eccesso di acqua, senza perdita di substrato (fig.15). Il peso del substrato ( $W_S$ ) viene quindi calcolato sottraendo la tara dal peso totale.

I vasi riempiti con il substrato in esame, vengono posti in una bacinella piena d'acqua, fino a completa saturazione del substrato (fig.16). I vasi saturi, vengono posti su una griglia che lascia filtrare l'eccesso di acqua, per un periodo di almeno 12 ore, coperti con una pellicola, o altro materiale isolante, per evitare l'evaporazione (fig. 17). I vasi vengono lasciati per tutto il periodo a temperatura ambiente.

Al termine del tempo previsto, i vasi vengono pesati e, previa sottrazione della tara, viene calcolato il peso del substrato saturo d'acqua ( $W_{FC}$ ).



Fig. 15 Peso della tara



Fig. 16: Saturazione del substrato



Fig. 17: Drenaggio del substrato

## 2.2.6 Calcoli

Come già descritto in precedenza, per i calcoli è possibile avvalersi del foglio di calcolo "Calculation of Water Retention of Germination Media", disponibile sul sito Internet ISTA (<http://seedtest.org/en/tool-box-content---1--1191.html>).

Anche in questo caso, l'esempio (tabella 4) utilizza il foglio di calcolo ISTA, previa traduzione dall'inglese del testo originario.

Tabella 4: Esempio di verifica della ritenuta idrica su carta da filtro Ø11

### Ritenzione idrica massima

	Replica 1	Replica 2	Replica 3
B. Peso del substrato (g)	1,50	1,52	1,43
C. Peso del substrato dopo immersione (g)	5,65	5,78	5,59
D. Quantità di acqua nel substrato dopo saturazione (g)	0,1103	0,1117	0,1056
E. Peso secco del substrato (g)	1,39	1,40	1,33
F. Quantità di acqua massima trattenuta dal substrato (g)	4,27	4,38	4,27
Quantità di acqua massima trattenuta dal substrato in % sul peso secco	308%	312%	321%

**Quantità di acqua massima trattenuta dal substrato in % sul peso secco**

**314%**

Le formule inserite nel foglio elettronico e utilizzabili per i calcoli manuali sono descritte in seguito.

La quantità di acqua presente nel substrato prima della saturazione è data dalla formula:

$$(H_2O)_S = W_S \times MC$$

Il peso secco del substrato  $(DW)_S$  è pari a:

$$(DW)_S = W_S - (H_2O)_S$$

La quantità d'acqua presente quando il substrato è alla capacità di campo è pari a:

$$(H_2O)_{FC} = W_{FC} - W_S + (H_2O)_S$$

La massima quantità d'acqua trattenuta dal substrato, espressa in percentuale sul suo peso secco è infine calcolata come segue a:

$$(H_2O)_{MAX} = \frac{(H_2O)_{FC}}{(DW)_S} \times 100$$

$W_S$  = peso iniziale del substrato

$(DW)_S$  = peso secco del substrato dopo il drenaggio

$MC$  = contenuto di umidità determinato preventivamente

$W_{FC}$  = capacità di campo

La capacità di ritenuta idrica del substrato è rappresentata dalla media delle 3 ripetizioni.

## 2.3 Procedura per la determinazione della fitotossicità per determinare l'innocuità e la pulizia del substrato

I substrati devono essere privi di semi, funghi, batteri o sostanze tossiche che possono condizionare la germinazione dei semi.

La prova di fitotossicità consiste nel confronto dei risultati ottenuti con l'analisi della germinabilità eseguita con l'impiego della nuova fornitura in esame e con un substrato di qualità nota.

Un substrato è definito fitotossico quando, a causa della presenza di sostanze tossiche, il numero di semi germinati è inferiore a quello che si ottiene utilizzando un substrato di riferimento. Un substrato che evidenzia fitotossicità non può essere utilizzato per le analisi. Per questa prova, è raccomandato l'utilizzo di specie sensibili alla presenza di sostanze fitotossiche e in particolare *Agrostis gigantea*, *Eragrostis curvula*, *Festuca rubra*, *Hordeum vulgare*, *Lepidium sativum*, *Petunia* spp., *Phleum pratense*. Qualora un certo substrato sia destinato esclusivamente ad alcune specie, queste stesse specie saranno però impiegate anche ai fini della verifica. Analogamente, il laboratorio che analizza unicamente una o poche specie diverse da quelle sopra elencate può effettuare la verifica su queste ultime.

In generale, la presenza di fitotossicità porta a mancata germinazione, ridotto sviluppo delle plantule e ammuffimenti. Sintomi specifici che evidenziano fitotossicità sono: radici raccorciate, radici sollevate dal substrato, peli radicali a ciuffo, ipocotile corto e spesso, coleoptile appiattito e raccorciato nelle *Poaceae* (fig.18,19).

Poiché la manifestazione dei sintomi ha inizio precocemente, le differenze di sviluppo su substrato fitotossico e substrato innocuo sono evidenti già all'epoca della prima levata, epoca in cui sono addirittura più evidenti: è pertanto consigliabile eseguire la valutazione in questo stadio, verificando innanzitutto l'esistenza di eventuali differenze di sviluppo delle radici e quindi la comparsa di sintomi quali quelli descritti.

Per osservare direttamente i sintomi della fitotossicità, si può predisporre un substrato di riferimento positivo (fig. 20, 21, 22), aggiungendo una sostanza tossica (es. NaClO).



Fig. 18 Differenza tra germinelli normali e semi germinati su substrato fitotossico



Fig. 19 Fenomeni di fitotossicità a carico delle radici



Fig. 20 Esempio di germinazione su un substrato idoneo e un substrato tossico (carta pieghettata)



Fig. 21 Esempio di germinazione su un substrato idoneo e un substrato tossico (carta da filtro)



Fig.22 Esempio di germinazione su un substrato idoneo e un substrato tossico (sabbia silicea)

### 2.3.1 Risultato finale

Il substrato è idoneo per l'uso quando le plantule non manifestano sintomi di fitotossicità e quando non si riscontrano differenze statisticamente significative fra i risultati di analisi

ottenuti con la nuova fornitura e con il substrato di controllo (il manuale ISTA dedicato alla valutazione dei germinelli consiglia analisi della varianza ANOVA ad un fattore).

## **2.4 Procedura per la determinazione della granulometria della sabbia**

### *Materiali e attrezzature utilizzati*

- Setacci certificati: misura 0,05 mm e 0,8 mm
- Bilancia di precisione a due cifre decimali
- Bacinella per la sabbia

Secondo i Metodi Ufficiali di Analisi delle Sementi e secondo le Norme ISTA, la granulometria della sabbia deve essere compresa tra 0,05 e 0,8 mm.

Per effettuare la verifica, si utilizzano pertanto due setacci da 0,05 e 0,8 mm preventivamente controllati, per evitare residui di materiale e/o possibile danneggiamento. Un quantitativo di sabbia del peso minimo di 100g (fig. 23), viene filtrato attraverso i due setacci, posizionando quello di dimensione maggiore sopra quello di dimensione minore (fig. 24). Previa agitazione dei setacci, si separano e si pesano le frazioni a diversa granulometria e si calcolano le relative percentuali in peso.

### 2.4.1 Risultato finale

In base alle Norme ISTA, almeno il 90% di particelle deve passare attraverso il setaccio a maglie 0,8 mm ed essere trattenuto da quello a maglie 0,05 mm. In caso contrario la fornitura deve essere rifiutata.



Fig. 23 Pesata della sabbia



Fig. 24 Verifica della granulometria della sabbia

Tabella 5: Esempio di verifica della granulometria della sabbia silicea

Peso iniziale: 100,10g	Peso(g)	%
Particelle trattenute da setaccio 0,8 mm	9,01	9,00
Particelle non trattenute da setaccio 0,8 mm, trattenute da setaccio 0,05 mm	90,9	<b>90,83</b>
Particelle non trattenute da setaccio 0,05 mm	0,19	0,19
	100,08	

Bibliografia: *Metodi ufficiali di analisi per le sementi- DM 22 dicembre 1992 (G.U.-supplemento del 4 gennaio 1993) ; International Rules for Seed Testing (ISTA, versione in vigore); ISTA Handbook on Seedling Evaluation 3<sup>rd</sup> Edition.*