



Directives pour la régénération : lignes directrices générales

Introduction

M.E. Dulloo¹, J. Hanson², M.A. Jorge^{1,2} et I. Thormann¹

¹Bioversity International, Rome, Italie

²International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopie

Contexte

Les banques de gènes doivent garantir que leurs accessions de germoplasme soient maintenues viables et de haute qualité, aussi longtemps que possible. Cependant, malgré les normes de gestion les plus élevées, le germoplasme se détériore au fil du temps et a besoin d'être régénéré. Pour de nombreuses banques de gènes, il est difficile de maintenir les collections à des niveaux acceptables de viabilité et de qualité. Et ce en raison des frais encourus ainsi que des capacités et expertises techniques limitées - en particulier lorsqu'on a affaire aux procédures de régénération complexes requises pour certaines espèces (FAO, 1998). Ceci a entraîné des retards de régénération qui mettent en danger du matériel important et unique; tel que l'ont fait ressortir le rapport de la FAO sur l'Etat du Monde ainsi que les stratégies de conservation des cultures, mises en oeuvre ces dernières années avec le support du Fonds fiduciaire mondial pour la diversité des cultures (Global Crop Diversity Trust, The Trust), et généralement facilitées par les centres CGIAR. Le Trust soutient, par conséquent, la régénération à travers le monde de tels matériels prioritaires et menacés. Bien qu'il existe un outil générique d'aide à la décision pour la régénération (Sackville Hamilton et Chorlton, 1997), certaines connaissances et expertises spécifiques aux cultures sont requises. Malheureusement, malgré l'existence d'une telle connaissance dans les banques de gènes à travers le monde, y compris dans les centres CGIAR, il n'y a pas eu jusqu'ici de tentative d'identification, de collation ni de publication des meilleures pratiques, permettant d'aider les détenteurs de collection à mener la régénération de façon à maintenir l'intégrité génétique et à optimiser la viabilité du matériel de plantation qu'ils produisent. Le Trust a donc requis que Bioversity, agissant au nom du Programme sur les ressources génétiques à l'échelle du système (SGRP), développe des directives spécifiques aux cultures pour les 21 cultures alimentaires principales ciblées par l'initiative de régénération du Trust (la banane, le haricot, le fruit à pain, le manioc, le pois chiche, la noix de coco, le niébé, la fève, l'éleusine, la gesse commune ou pois carré, le maïs, les principaux taros, les lentilles, le mil cultivé, l'embrevade, la pomme de terre, le riz, le sorgho, la patate douce, le blé et l'igname).

Définition

Dans le cadre de ces directives, le terme régénération signifie la restitution d'échantillons génétiquement similaires à la collection originale de la culture, lorsque la viabilité ou le nombre des plantes sont faibles. La régénération est également nécessaire pour les nouvelles accessions qui nécessitent une conservation à long terme, si les quantités sont trop faibles. Elle peut aussi être requise pour des raisons sanitaires, afin d'éliminer les maladies. Dans le cas des cultures clonales conservées dans des banques de gènes au champ, la restitution peut être réalisée sur le même site ou sur un site différent, pour plus de sécurité ou pour éviter les maladies et les organismes nuisibles.

Lignes directrices générales

Garantir l'intégrité génétique

La régénération du germoplasme est une opération critique de la gestion des banques de gènes; Elle implique les risques les plus importants quant à l'intégrité du germoplasme, dus à la sélection, à l'exogamie ou aux mélanges mécaniques. Le risque de perte de l'intégrité génétique est particulièrement élevé lorsqu'on régénère des accessions de germoplasmes hétérogènes provenant de cultures exogames. Le but de la régénération est de maintenir la diversité et la structure génétiques originales de l'accession ou de la collection (voir ci-dessous, les recommandations de la section «Directives générales de régénération»).

Garantir l'efficacité

La vitesse de reproduction de l'espèce et de la variété se trouvant sur le site de régénération, devrait être prise en considération, afin de produire une quantité suffisante de graines ou de matériels destinés à la plantation. Le nombre de semences, de boutures ou autres matériels végétaux nécessaires à la régénération, doit être calculé avec soin en tenant compte du nombre de plantes souhaité pour la régénération, des vitesses de germination et d'installation de l'accession dans les champs, de la quantité de semences requises après la régénération et du fait que la caractérisation et l'évaluation soient liées ou non à la régénération.

Garantir la qualité

Le but de la régénération des cultures est de produire des quantités suffisantes de semences, de tubercules ou d'autres propagules végétaux, sains et viables. Avant de distribuer le germoplasme, les banques de gènes doivent le tester pour ce qui est de la présence de pathogènes et d'organismes nuisibles transmis par les graines ou par voie végétative, afin d'empêcher la propagation de maladies et d'organismes nuisibles. Ce germoplasme doit fournir un approvisionnement de base non contaminé aux programmes de reproduction, de multiplication ou à d'autres projets.

Directives générales de régénération

Type de collection

Les deux types de collections reconnues pour les cultures de semences sont la collection active et la collection de base. Les collections actives devraient être régénérées, de préférence, à partir des semences originales prélevées sur les collections de base.

Cependant, l'utilisation de semences provenant d'une collection active est également acceptable jusqu'à trois cycles de régénération, avant de revenir aux semences originales (collection de base) (FAO/IPGRI, 1994). Les collections de base devraient être régénérées uniquement à l'aide des semences restantes provenant de l'échantillon le plus original de la collection de base.

Dans le cas des cultures propagées par clonage, les matériaux sont généralement conservés dans une collection au champ (Engels et Visser, 2003). Certaines espèces d'arbres tropicaux peuvent ne nécessiter une replantation qu'une fois tous les 15 ans ou plus, alors que d'autres espèces doivent être remplacées à des intervalles de quelques mois. Il est de bonne pratique d'établir un double de la collection, faute de quoi il n'y aurait pas de semence restante vers lesquelles se tourner au cas où certaines plantes échoueraient, comme dans le cas des cultures propagées par les semences. Les cultures propagées par clonage peuvent aussi être conservées *in vitro* ou par cryoconservation, là où ces technologies ont été développées pour une culture spécifique; de tels matériaux peuvent aussi servir de collection de sauvegarde aux banques de gènes aux champs. La régénération des collections *in vitro* ou par cryoconservation n'est pas couverte par les présentes directives (pour plus d'informations, voir Reed et al. (2004)).

Quand régénérer

La régénération est un processus coûteux et ne devrait être menée qu'aussi souvent qu'il est nécessaire pour s'assurer que les accessions sont disponibles en quantité suffisante et soient de qualité appropriée.

Pour la plupart des cultures de semences, les accessions sont régénérées dans les cas suivants:

- Lorsque la viabilité des semences descend en dessous de 85 % du pourcentage de germination initial pour les collections actives, tel que déterminé par le contrôle de la viabilité (pour plus de détails, voir FAO/IPGRI, 1994 ; ISTA, 2008). La viabilité initiale avant le stockage ne devrait pas être inférieure à 85 %, quoiqu'un pourcentage inférieur soit utilisé dans certaines banques de gènes (< 75 %), en particulier pour les espèces sauvages.
- Lorsque le nombre de semences viables par accession est < 1500, au sein des collections active ou de base des populations et < 250 semences pour les lignées consanguines.

Il est plus important de régénérer les accessions de mauvaise qualité (viabilité faible), que celles ayant un nombre de semences inapproprié. Les accessions des collections de base ont priorité sur celles des collections actives.

Pour les cultures propagées par clonage, la décision de régénérer peut dépendre des facteurs suivants :

- La maturation et la détérioration des matériaux végétaux conservés.
- L'état des organismes nuisibles et des maladies dans la collection au champ.
- La nécessité de remplacer une collection en raison des risques externes (sécheresse, inondations, cyclones).
- La nécessité d'augmenter la disponibilité en matériaux de propagation.

Taille de l'échantillon

L'échantillon prélevé à partir d'une accession de semences, en vue de la régénération, doit être sélectionné de manière aléatoire, afin de représenter la diversité au sein de l'accession ou de la collection et de fournir une forte probabilité de rétention des allèles de fréquences

alléliques faibles. Comme règle de trois, Crossa et al. (1993) considèrent qu'il faut retenir entre 90 et 120 semences avec une fréquence allélique de 90 à 95 % et un taux de 0,003 à 0,05 pour un nombre de locus allant de 10 à 150. Les espèces allogames nécessitent généralement un nombre plus élevé de plantes que les espèces autogames, pour maintenir la variation génétique existant au sein de la population [pour plus de détails, voir Crossa (1995)]. Cela n'est toutefois pas toujours le cas et peut dépendre du degré de variation au sein de l'accession, dans les sous-populations d'espèces à autofécondation.

Le nombre minimum de semences destinées à la régénération peut être évalué à partir de la taille standard de l'échantillon utilisé pour la régénération et de la viabilité de l'échantillon, selon l'équation suivante :

Nombre de semences nécessaires à la régénération = population souhaitée pour la régénération / (germination¹ (%) x installation au champ² escomptée (%)) (voir Rao et al. 2006)

Dans le cas des cultures propagées par clonage, du fait que les plantes doivent être génétiquement identiques au sein de l'accession, le choix de la taille de l'échantillon est le plus souvent relié à la probabilité de survie de la plante au champ. Ceci afin de garantir la survie d'au moins quelques plantes jusqu'à la récolte, pour que les accessions puissent être régénérées une nouvelle fois. Il faut souvent un minimum de 5 à 10 plantes par accession; ou plus, si les propagules sont requises pour d'autres usages.

Préparation des semences / matériel de plantation

Lorsqu'on prépare les semences destinées à être stockées dans une banque de gène en vue de la régénération, il est impératif de sortir les conteneurs des installations de stockage et de les laisser se réchauffer pendant la nuit à température ambiante, avant de les ouvrir. Ceci afin d'éviter une absorption trop rapide d'humidité.

Dans le cas des cultures propagées par clonage, différentes parties de la plante peuvent être nécessaires pour la régénération et vont des tubercules aux sarments, aux tiges, aux drageons ou à d'autres parties de plantes. Chacune d'elles nécessite des méthodologies particulières pour la sélection, la coupe, les désinfestations et la conservation à court terme ou le préconditionnement effectué avant la plantation.

Maintien d'une taille efficace de la population

Un des objectifs majeurs de la régénération est de garantir le maintien d'une taille efficace de la population (N_e) au sein de l'accession. Méthodes de calcul de N_e pour : (1) une collection de germoplasme et la régénération des espèces monoïques diploïdes, (2) des espèces allogames et (3) des espèces à autofécondation et fécondation aléatoire mixtes. Ces méthodes ont été développées respectivement par Crossa et Vencovsky (1994), Crossa et Vencovsky (1997) et Crossa (1999).

Selon Crossa et Vencovsky (1994) et Crossa et Vencovsky (1999), la meilleure stratégie pour le maintien d'un N_e élevé est celle de prélever un nombre égal de semences à partir du plus grand nombre possible de plantes mères. Il est plus difficile de collectionner des espèces autogames que des espèces allogames. S'il existe des différences de maturité lors

1 *Les pourcentages de germination et d'installation au champ doivent être exprimés en décimales : c-à-d 0,95 au lieu de 95 %.*

2 *L'installation des plantes est généralement de 5 % de moins que le pourcentage de germination dans des conditions défavorables et de 1 % de moins dans de bonnes conditions.*

de la floraison et des différences de maturité entre les plantes d'une même accession, il est préférable de récolter des plantes individuelles et de mélanger une part égale de semences prélevées sur des plantes mères différentes, afin d'éviter les influences maternelles. Pour les cultures propagées par clonage, la taille de la population n'est pas aussi importante car les plantes faisant partie d'une accession sont généralement génétiquement identiques. Toutefois, de nombreuses cultures propagées par clonage comportent une quantité importante d'hétérozygoté due à un certain niveau d'exogamie naturelle et à la perpétuation ultérieure par voie végétative, pouvant se manifester en tant que variation entre les plantes d'une même accession (Vasil et al. 1994; Lebot et Aradhya 1992). On recommande donc 5 à 10 plantes par accession. Lorsque l'identité génétique est prouvée, il est plus important de prélever du matériel à partir de quelques plantes mères saines et vigoureuses, qu'à partir d'un grand nombre de plantes de qualité inférieure. Le nombre planté dépendra donc du niveau d'hétérozygoté, de la diversité intraspécifique ainsi que du coût de conservation et des besoins de caractérisation et d'évaluation.

Choix de l'environnement

Les accessions de germoplasme doivent être régénérées, autant que possible, dans la même région écologique que celle d'où elles proviennent. Sinon, choisir un emplacement minimisant les pressions de sélection sur les génotypes ou les populations. Si l'on ne trouve pas de sites appropriés, collaborer avec d'autres institutions pouvant fournir des sites adéquats ou des facilités pour la régénération. Prendre des précautions au cours de la régénération et lors de la manipulation des semences et des propagules. Ceci afin d'éviter la contamination par les lots adjacents, de minimiser la dispersion des gènes et de prévenir l'introduction fortuite de transgènes. Les plantes pouvant être clairement identifiées comme étant des contaminants et n'appartenant pas à la population, devraient être enlevées. Les accessions ne devraient pas être plantées dans les champs où la même culture a été plantée précédemment. Ceci afin de réduire les risques de plantes spontanées ainsi que l'accumulation d'organismes nuisibles et de maladies dans le sol. Les lots de régénération devraient être aussi uniformes que possible et les champs devraient être bien grainés. Une bonne irrigation doit être accessible même aux cultures pluviales, afin d'éviter toute sélection exercée par la sécheresse et de garantir de bons rendements. On recommande également d'effectuer un test des nutriments du sol, afin d'identifier les engrais nécessaires.

Isolement

Le système de reproduction de la culture en question est important. Dans le cas des espèces allogames, il faut avoir recours à des distances d'isolement appropriées, à l'isolement temporel, à l'ensachement, à l'utilisation de cages et à d'autres mécanismes. Étant donné que le degré d'exogamie chez un certain nombre d'espèces est lié à l'emplacement, il est de bonne pratique d'évaluer le taux d'exogamie sur le lieu de régénération des plantes, de façon à utiliser la technique de pollinisation appropriée.

Gestion des cultures

Il est de bonne pratique de maintenir les lots de régénération aussi exempts que possible de graines et de plantes étrangères. Le désherbage doit être pratiqué régulièrement pour éliminer la compétition. Pendant la préparation des lots de régénération, les mauvaises herbes, les organismes nuisibles et les maladies transmises par le sol doivent être éliminés par un traitement approprié. Il s'agit par exemple de pulvérisations d'insecticides, de stérilisation de la terre, de culture suivie de l'application d'herbicide et /ou d'un labourage profond destiné à tuer les mauvaises herbes émergentes.

Suivi de l'identité de l'accession

Étiqueter toutes les accessions de manière individuelle avec des étiquettes de longue durée ou de l'encre permanente et conserver des plans du champ, afin que l'identité de l'accession puisse être surveillée tout au long de la saison de culture. Pour les cultures de semences, il est recommandé de conserver un échantillon de la semence d'origine comme référence, dans un petit sac en plastique, dans un environnement sec et à une température de 15°C. A chaque fois que l'accession est régénérée, la semence nouvellement récoltée peut être assortie à l'échantillon afin de vérifier que l'accession est bien conforme au type. L'identité des semences ou des propagules régénérés peut aussi être confirmée par comparaison avec les données originales de caractérisation relatives à certains traits spécifiques aux accessions, si celles-ci sont disponibles.

Récolte

En général, la récolte est effectuée à maturité optimale de la plante (survenant après le point de maturité physiologique). C'est-à-dire lorsque le nombre maximum de graines sont mûres, peuvent tolérer la dessiccation et être battues avec le minimum de dommages mécaniques et avant qu'elles ne se détériorent ou ne se dispersent naturellement (pour plus d'informations, voir Rao et al. 2006).

Dans le cas des cultures propagées par clonage, la maturité physiologique de la plante mère constitue le critère le plus important pour une régénération réussie de la collection de propagules ou pour une conservation à court terme. Dans la plupart des cas, la maturité de la partie comestible de la plante importe peu, surtout lorsque cette dernière ne correspond pas à la partie propagée.

Organismes nuisibles et maladies courants

Les directives fournissent une liste des organismes nuisibles et maladies courants pour chaque culture, mais pas de tous les symptômes ni de toutes les mesures de contrôle. Pendant la régénération (y compris la récolte et l'après récolte), les cultures doivent être inspectées par les services de protection des plantes, en particulier concernant les maladies transmises par la graine ou par voie végétative. Ceci afin de s'assurer du meilleur état de santé et de viabilité possibles du matériel régénéré.

Références et lecture complémentaire

- Crossa J. 1995. Sample size and effective population size in seed regeneration of monoecious plants. In: Engels JMM, Ramanatha RR, éditeurs. Regeneration of seed crops and their wild relatives. Proceedings of a consultation Meeting 4-7 December 1995, ICRISAT, Hyderabad, Inde. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie. pp.140–143.
- Crossa J, Hernandez CM, Bretting P, Eberhart SA, Taba S. 1993. Practical considerations for maintaining germplasm in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 86: 673–678.
- Crossa J, Vencovsky R. 1994. Implications of the variance effective population size on the genetic conservation of monoecious species. *Theoretical and Applied Genetics* 89:936–942.
- Crossa J, Vencovsky R. 1997. Variance Effective Population Size for Two-Stage Sampling of Monoecious Species. *Crop Science* 37:14–26.
- Engels JMM, Visser L, éditeurs. 2003. A guide to effective management of germplasm collections. IPGRI Handbooks for Genebanks No. 6. IPGRI, Rome, Italie.

- FAO/IPGRI. 1994. Genebank standards. Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome / Institut International de Ressources Phytogénétiques, Rome, Italie.
- FAO. 1998. The state of the world's plant genetic resources for food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italie.
- Hanson J. 1985. Practical Manuals for Genebanks: Procedures for Handling Seeds in Genebanks. Comité international de gestion des ressources génétiques végétales, Rome, Italie.
- ISTA. 2008 International rules for seed testing. International Seed Testing Association. Secrétariat de l'ISTA, CH-Suisse.
- Lebot V, Aradhya KM. 1992. Collecting and evaluating taro *Colocasia esculenta* for isozyme variation. FAO/IBPGR Plant Genetic Resources Newsletter 90:47–49.
- Rao NK, Hanson J, Dulloo ME, Ghosh K, Nowell D et Larinde M. 2006. Manual of seed handling in genebanks. Handbook for Genebanks No.8. Bioersivity International, Rome, Italie.
- Reed BM, Engelmann F, Dulloo ME, Engels JMM. 2004. Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections. Handbook for Genebanks No 7. International Plant Genetics Resources Institute, Rome, Italie.
- Sackville Hamilton NR, Chorlton KH. 1997. Regeneration of accessions in seed collections: a decision guide. Handbook for Genebanks No.5. Institut international pour les ressources génétiques des plantes, Rome, Italie.
- Soest LJM van. 1990. Plant Genetic Resources: Safe for the future in genebanks. Impact of Science on Society 158: 107–120.
- Vasil IK, Thorpe TA, éditeurs. 1994. Plant Cell and Tissue Culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht and Boston (Massachusetts). 604pp.
- Vencovsky R, Crossa J. 1999. Variance Effective Population Size under Mixed Self and Random Mating with Applications to Genetic Conservation of Species. Crop Science 39:1282–1294.

Comment citer correctement cet ouvrage

Dulloo M.E., Hanson J., Jorge M.A. and Thormann I. 2008. Directives de régénération: lignes directrices générales. In: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 7 pp.