

# Workshop Conservation ex situ des plantes menacées

## Protocoles pour les banques de semences d'espèces sauvages

5 avril 2019, BOGA, Berne



Responsable de l'unité FloCoSI: Raoul Palese  
Conservatrice Catherine Lambelet

Collaborateur: Cédric Fawer, collaboratrice temporaire: Jacqueline Détraz

# D'où viennent les banques de germoplasme?

- Germoplasme = spores, pollens, tissus, méristèmes, ADN, ARN et surtout GRAINES (matériel le plus employé pour perpétuer les plantes supérieures)
- Nikolai Vavilov (Russie début du 20<sup>e</sup> siècle): création pendant 30 ans de banques *ex situ* de germoplasme pour augmenter la productivité des espèces et donc de l'agriculture. Banque de semences d'espèces cultivées issues de ce mouvement.
- Aujourd'hui: «genebanks» ou banques de germoplasme ou «seedbanks» si matériel est constitué de graines.
- Premières banques de graines au service la conservation de la biodiversité: fin des années 50. La première: 1958 - Université du Colorado. La plus grande: Millenium Seed Bank, Wakehurst Place.
- Banque de semences: matériel vivant!!! Ne se conserve pas comme des livres dans une bibliothèque...



N. Vavilov et l'institut qui porte son nom à St-Petersbourg



Collection Index seminum, Lyon

Svalbard Global Seed Vault, priority CROPS, 1 moi échantillons



Millenium Seed Bank, Kew Gardens



Fort Collins: national Center for Genetic resources Conservation, 600'000 échantillons

# Banques de germoplasme (=banques de gènes)

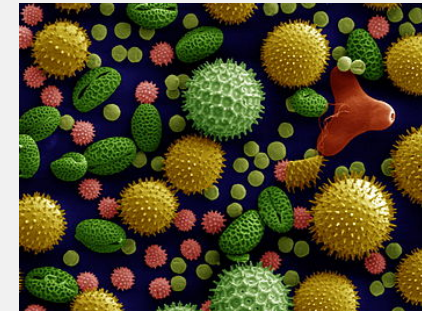
## Des collections «figées»

- Banque de semences (graines, spores)
- Stockage cryogénique (tissus, graines)
- Banques d'ADN (gènes)



## Des collections «dynamiques»:

- Cultures *ex situ* (plantes)
- Jardins de biotopes (plantes)
- Cultures plein champ (plantes)
- Banques de pollen (1/2 génome)
- Cultures in vitro (tissus)



# Pourquoi une banque de semences?



Instrument très utile pour la conservation *ex situ*

**Principe : ralentir le vieillissement de l'embryon → prolonger la longévité de la graine**

## AVANTAGES

- **Nombreux taxons adaptés:** estimation Wyse & Dickie, 2016:
  - ❖ 8% de la flore mondiale avec *graines intolérantes à la dessiccation* (de 2% - flore des déserts – à 47% - arbres des forêts pluviales).
  - ❖ 99% des espèces herbacées tolérantes à la dessiccation
- Il est facile de stocker les graines dans un **espace réduit**
- Le contrôle des semences stockées nécessite peu de travail
- On peut conserver de **larges collections de graines à prix réduit**
- La **variabilité génétique** de chaque accession est **préservée** (si la récolte est ok)
- **L'érosion génétique** est **minimisée** (ce qui n'est pas le cas en culture...)
- La **longévité** des graines est théoriquement prolongée, jusqu'à max. **300 ans** (Harrington's law)



## Pourquoi une banque de semences?

Instrument très utile pour la conservation *ex situ*

**Principe : ralentir le vieillissement de l'embryon → prolonger la longévité de la graine**

### *DÉSAVANTAGES*

- Plus de sélection naturelle (**génome «congelé»...**)
- **Coûts pour l'évaluation** de la collection (tests de germination)
- **Coûts pour la recherche** sur l'écologie de la germination et la biologie des espèces
- **Pas adapté à toutes les espèces** (espèces récalcitrantes et intermédiaires, bryophytes), pas adapté aux espèces phanéropytes des climats tropicaux. -> seulement 60% des espèces menacées au niveau mondial adaptées, mais sans doute près de 100% en Suisse.

### *AUJOURD'HUI (BGCI, 2017)*

- **400 jardins botaniques** dans le monde ont développé des capacités de stockage des semences, principalement pour des espèces sauvages
- Approximativement **1300 banques de gènes** conservent **environ 6 millions** de lots de semences d'espèces sauvages et cultivées



# Protocoles pour banque de semences



## Plusieurs étapes -> plusieurs protocoles

*Détaillés dans cet exposé:*

- **Récolte** (certains principes sont aussi valables pour la culture ex situ)
- **Pré-conditionnement**
- **Conditionnement et stockage**

*Non détaillés ici:*

- **Collecte des données**
- **Nettoyage** (partiellement)
- **Déstockage**
- **Tests de germination**
- **Utilisation**
- **Evaluation de la collection de graines**



# La récolte

***But: constituer un échantillon représentatif de la diversité génétique intra station de la population considérée.***



***Comment faire?***

***Facteurs importants à considérer***

- Structure des populations (nombre, étendue, fragmentation,...)
- Zones éco-géographiques (variabilité génétique plus marquée entre habitats qu'entre populations distantes)
- Variabilité génétique de la population (nombre d'allèles présents) - voir dia suivante
- Type biologique du taxon : annuelle/pérenne à vie courte/longue
- Reproduction du taxon: végétative/générative et type de pollinisation (allogame/autogame). Pollinisateur et distance de pollinisation. Car particulier: espèces clonales.
- Distance de dispersion des semences du taxon
- Historique des populations (migrations, populations isolées, en marge de l'aire de distribution)
- Utilisation prévue (multiplication, conservation, restauration)

***Conclusion:*** beaucoup de données manquent pour le praticien: plus de recherche en génétique de la conservation et plus de partenariat entre recherche et pratique doivent amener à des recommandations plus diversifiées pour atteindre le but recherché.

***-> Utiliser les connaissances acquises pour les différentes espèces***



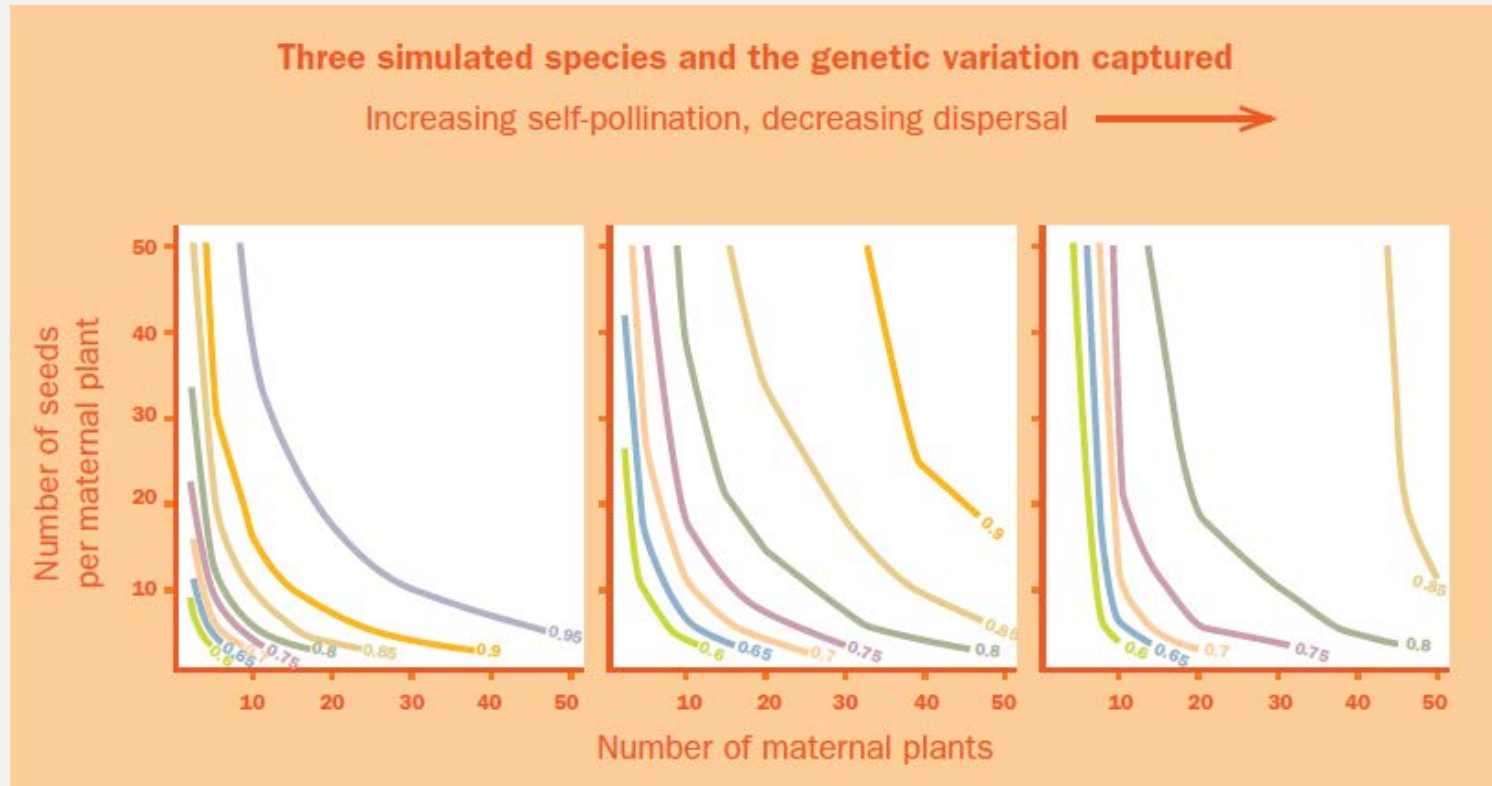
# La récolte

*But: constituer un échantillon représentatif de la diversité génétique intra station de la population considérée*



*Comment faire?*

Comment «capturer» la variabilité génétique? (Hoban & Schlarbaum, 2014)





# La récolte

***But: constituer un échantillon représentatif de la diversité génétique intra station de la population considérée***



## Comment faire?

### Recommandations habituelles (mais à améliorer)

- **Définir la population** (entité génétiquement distincte selon, sol, climat, altitude, pollinisation, barrières à la reproduction)
- **Définir le nombre de populations**: APAT: échantillonner 50% des populations, toutes les populations si nombre de stations limité. Si possible 10 populations par zone éco-géographique homogène. Meise: 5 populations
- **Nombre de plantes-mère à échantillonner**: différentes données. 1. 30 géotypes pour pollinisation croisée, 60 individus pour entité autogames. 2. Les deux tiers des banques de semences recommandent 50 individus. 3. APAT: Si inconnu, 50% des individus. 4. CJB: recommandation empirique 100 individus.
- **Choix des individus à échantillonner**: mode aléatoire (le plus courant) ou transects
- **Nombre de graines/individu**: 50 graines recommandé en général. Quantité équivalente par plante-mère, pas plus de 20-25% des graines de chaque individu. Prélèvement sur toutes les parties, aléatoirement, pas de sélection.
- **Nombre de graines/lot**: MSB: 5000 graines (min. 1000). **Nombre de graines/taxon**: JB Meise: 5000 graines
- **Prélèvement** pendant tout le temps de la maturation des graines (attention aux différents stades de maturation suivant position dans l'inflorescence par exemple). Test de la coupe utile.
- **Statut de menace**: préserver les populations les plus en danger (récolte minimale ou pas de récolte: pesées d'intérêt). Aspects légaux (autorisations).

# La récolte

*But: constituer un échantillon représentatif de la diversité génétique intra station de la population considérée*

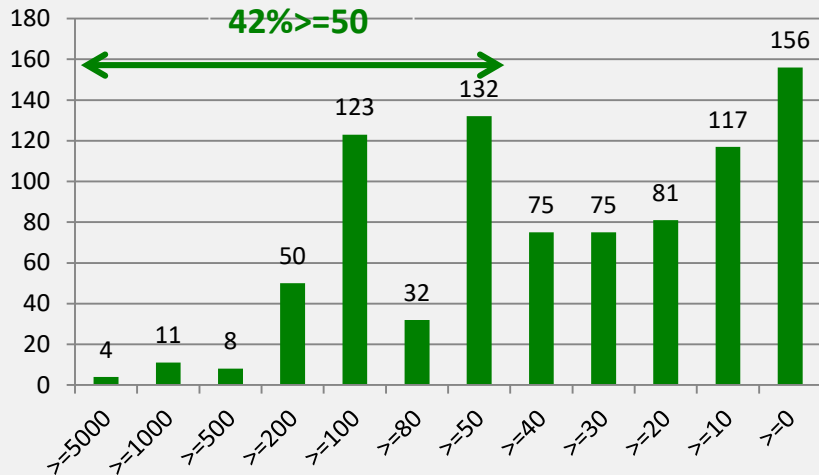


## Comment a-t-on pu faire?

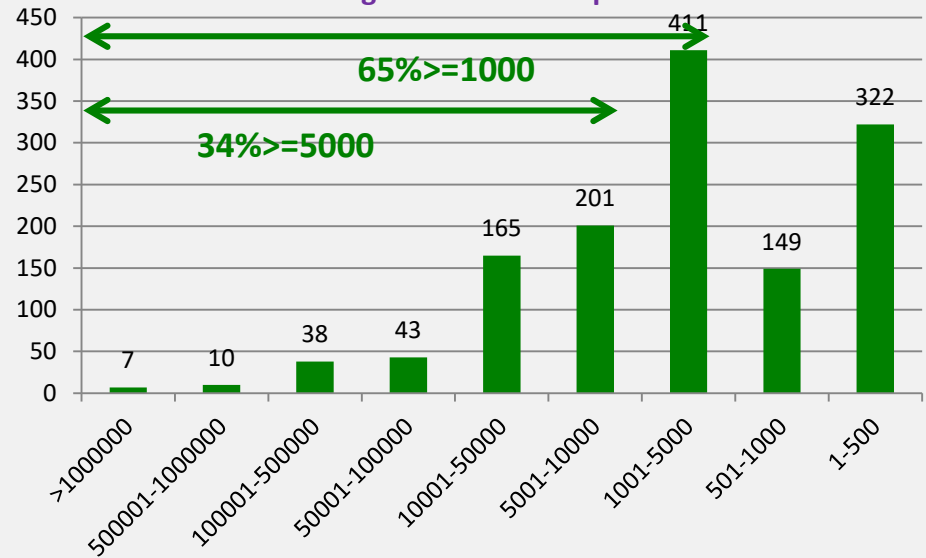
Résultats concernant les lots stockés aux CJB:

- 42% des lots avec plus de 50 plantes-mères
- 65% des lots avec plus de 1000 graines
- 16% des taxons avec plus de 5 lots
- 14% des taxons avec > 5 lots et >5000 graines

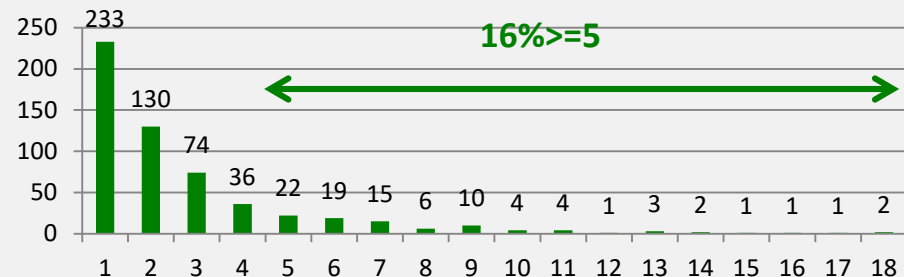
### Nombre de plantes-mère échantillonnées par lot



### Nb de graines récoltées par lot



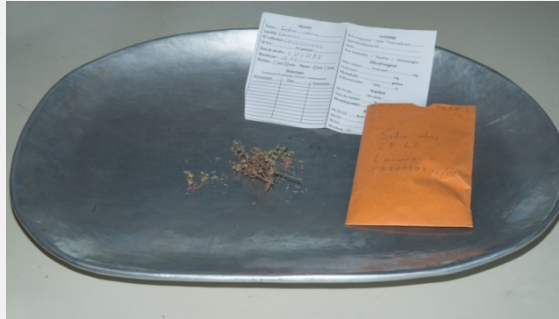
### Nb de lots récoltés par taxon





# Préparation des lots de graines

*But: obtenir un lot constitué uniquement de semences propres*



## Comment faire?

1. Réception des lots et quarantaine
2. Séchage préalable (selon conditions choisies)
3. Nettoyage (à adapter à chaque lot)
  - Préparation de la semence au préalable (fruits charnus, maturation)
  - 1 mois de séchage en chambre sèche
  - Sortie de la chambre sèche pour 12h maximum
  - Vans manuels (tamis)
  - Van mécaniques
  - Fiche de suivi de lot
4. Comptage et pesage avant conditionnement
5. Répartition entre les différents stockage (durée, duplication, tests de germination etc.)





# Avant conditionnement

*But: estimer la viabilité du lot et son aptitude au conditionnement*



## Comment faire?

### 1. Test de viabilité

- Rayons X, scans
- Cut-test sous la loupe
- Tests chimiques (tétrazolinum, indigo-carmin, solution de Lugol, di-acétate de fluorescine)
- Test de conductibilité
- Résonance magnétique
- Test de germination avant stockage

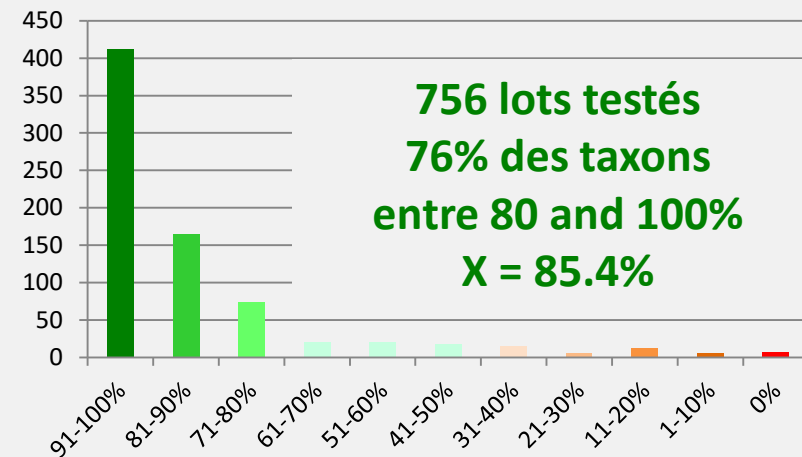


### 2. Test des lots

- Détermination du taux d'humidité
- (Aptitude à la dessiccation)



Résultats des cut-tests aux CJB



# Conditionnement

## 3 types principaux de réaction au stockage

*Roberts, 1973*

### Graines orthodoxes

1. Tolérance à la dessiccation à un degré d'humidité très bas (2-6%) au moins, en équilibre à des taux de 10-12% rH (en considérant que tous les autres facteurs sont à l'optimum).
2. Relation négative entre la température et la longévité à un degré d'humidité constant

### Graines récalcitrantes

1. Ne supportent pas la dessiccation sans dommage et ne répondent donc pas à l'équation de viabilité
2. Distinction entre les graines récalcitrantes des climats tempérés et tropicaux (les récalcitrantes «tempérées» peuvent être séchées jusqu'à un certain point)

### Graines intermédiaires

1. Tolérance à la dessiccation jusqu'à un certain point (environ 10-12%, variations considérables)
2. Dommage immédiat après dessiccation à un degré d'humidité relativement bas (7-12%)
3. La longévité des graines diminue avec un stockage en-dessous de 10°C (valable uniquement pour les plantes d'origine tropicale)

### Exemples

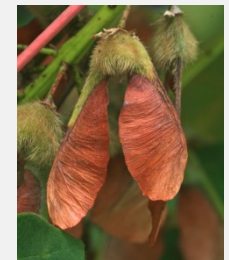
*Acer platanoides*

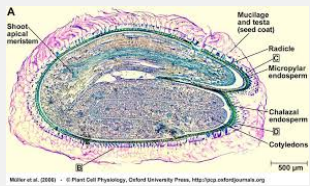


*Acer pseudoplatanus*

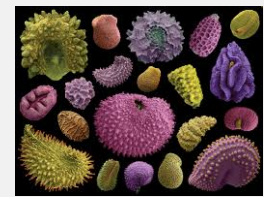


*Acer macrophyllum* (?)





# Conditionnement



## Graines orthodoxes:

### A. Lois de Harrington(1972) et équation de viabilité (Ellis & Roberts 1980)

En pratique:	Baisse Temp	Longévité
<b>Température</b>	<b>- 5 °C</b>	<b>x 2</b>
<b>Degré d'humidité</b>	<b>- 1 %</b>	<b>x 2</b>

Validité: Température: entre 0°C et 50°C. Degré d'humidité: entre 5 and 14%

### B. Facteurs influençant la longévité (Probert et al., 2009, 195 sp., 71 fam.) :

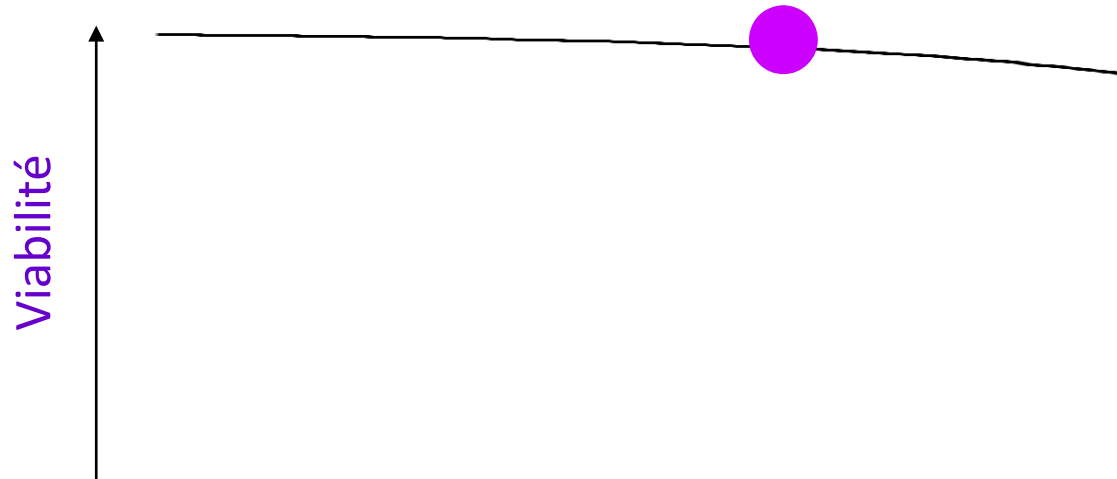
- Taille de la graine (teneur +/- élevée en eau et /ou lipides)
- Physiologie de la graine (manteau épais ou mince)
- Condition environnementales (tropical, tempéré, riverain, désertique, méditerranéen, ...)
- Cycle végétatif (annuel/pérenne)
- Position dans la succession secondaire (pionnier/climacique)
- Environnement naturel / artificiel (laboratoire)
- Variabilité génétique (qui dépend aussi de l'âge des populations)

**->La longévité d'une accession peut varier de 10-30 ans à théoriquement plus de 200 ans**

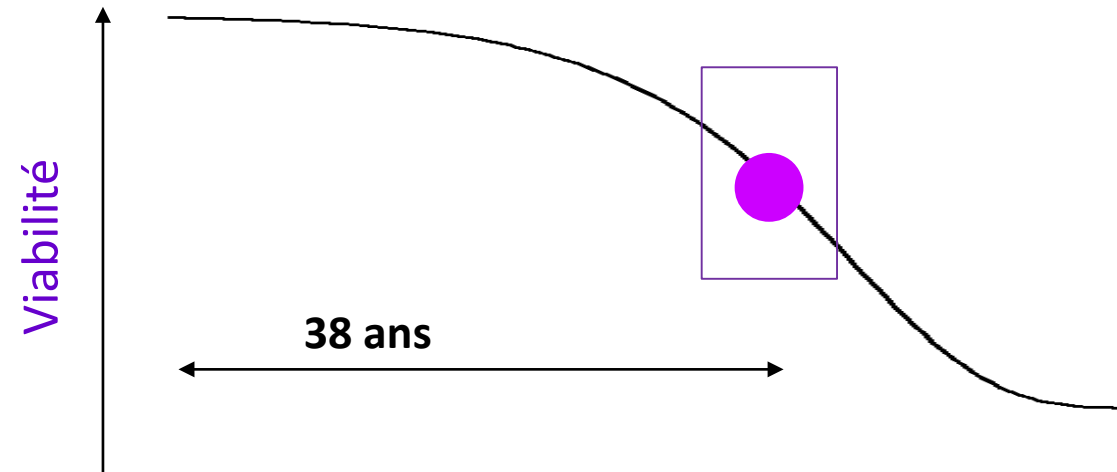
# Question de la régénération des stocks de graines

Comparaison des résultats de l'UPM et de l'USDA  
après 38 ans de conservation au froid (rH variable)

UPM, Madrid  
1966  
Plantes sauvages,  
Surtout  
*Brassicaceae*



USDA, Fort  
Collins, Colorado  
1953  
Plantes cultivées



(Gomez-Campo, 2006, Probert  
& al., 2009)

**Stabilité du taux d'humidité essentiel!**

**Conteneurs hermétiques -> nécessité de la régénération retardée considérablement**



# Conditionnement

*But: conditionner les graines de manière optimale dans des récipients hermétiques pour une conservation longue durée*



A1. Lyophilisateur

*Comment faire?*

*A. Graines orthodoxes*

*Sécher et refroidir les graines, 2 méthodes utilisées*

1. Séchage à l'équilibre à 10-15% rH et 15-20°C (taux d'humidité 3,5-6%, stockage entre -18 à -20°C, congélateur) (Rao & al., 2006)
2. Ultraséchage (taux d'humidité 1,5-3%, stockage quelques degrés sous 0°C, frigo) (Bachetta & al., 2017)

*B. Graines récalcitrantes*

3. Cryconservation dans l'azote liquide



A1 et 2. Cabinet de dessiccation



A2. Déshumidificateur

B. Cryconservation





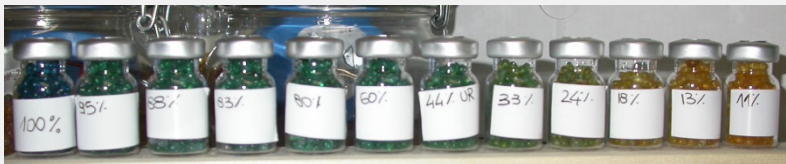
# Conditionnement

*But: conditionner les graines de manière optimale dans des récipients hermétiques pour une conservation longue durée*

*Comment faire?*

*Graines orthodoxes*

- Conditionner les graines dans des containers hermétiques
- Stocker les contenants au froid (frigo, congélateur)
- Contrôler le maintien des taux d'humidité (silicagel)



Systèmes de contenants à 1 ou plusieurs niveaux



Tests du taux de rH



Silicagel : indicateur du taux de rH



# Conditionnement

Les récipients doivent durer... 200 ans!



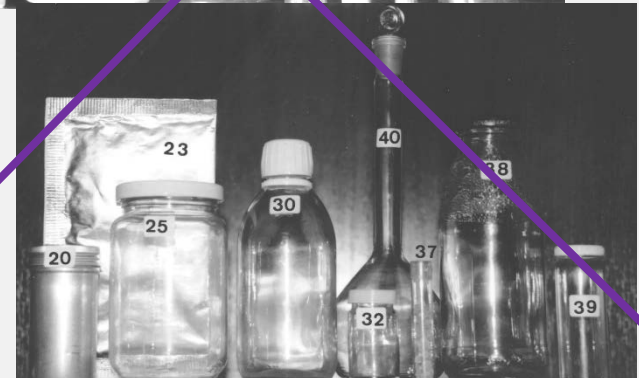
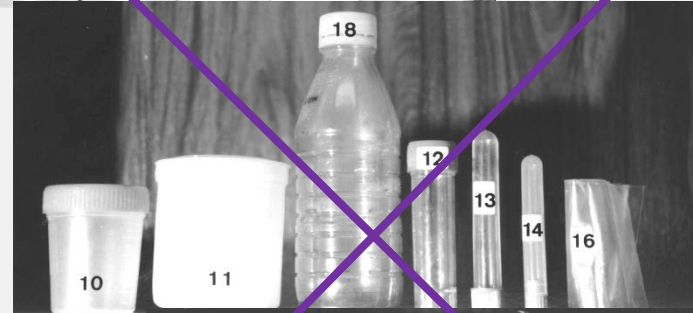
Essai à Madrid UPM:

Seuls 4 types de récipients (10%) se sont montrés totalement hermétiques à la vapeur d'eau après 7 ans d'observation. Tous les autres (90%) ont laissé entrer de l'humidité après une période de 2 mois à 3 ans.

Conclusion:

**Tester les récipients!!!**

Gomez-Campo, 2006



# Etape 7: le conditionnement

Chaque institution peut s'équiper d'une banque de semences en développant des procédures adaptées aux équipements et au personnel à disposition

Exemple: protocole des CJB: chambre sèche 10-15% rH & congélateur -20°C

- Chambre sèche pour le séchage ET le conditionnement à la flamme
- Double enceinte de contenants, en verre (visibilité favorisée)
- Duplication du stock à long terme (CJB, Agroscope, MSB)



Tube Pyrex scellé à la flamme avec gaz et oxygène

Bocal à conserve hermétique



2<sup>e</sup> enceinte

Code de rangement

Lit de Silicagel

18 tubes

1<sup>ère</sup> enceinte

Tube Pyrex hermétique avec Silicagel et ouate



# Manuels pour les banques de semences

- Seed storage behaviour : A compendium. Handbooks for Genebanks No 4. IPGRI, Rome, 1996.
- Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes. Biodiv. Int., ILRI, FAO, 2006 (traduction française, original en anglais).
- Manuel pour la récolte, l'étude, la conservation et la gestion *ex situ* de matériel végétal. APAT, CBNMed, 2007 (trad. française, original en italien).
- A guide to efficient long term seed preservation. Monographs ETSIA, Univ. Poliec. Madrid 170: 1-17, 2007.
- Manuel de Collecte de Graines pour les espèces sauvages. ENSCONET, RBG Kew, UPM, 2009 (trad. française, original en anglais).
- Protocoles de conservation et recommandation. Protokolle und Empfehlungen für Saatgutbanken. ENSCONET, RBG Kew, 2009 (trad. française et allemande, original en anglais).
- Draft revised genebank standards for the conservation of orthodox seeds. Commission on genetic resources for food and agriculture, 2011.
- *Recommandations pour la conservation ex situ et l'introduction de plantes menacées. Info Flora, site web, (allemand, français, italien).*
- *Manuel de fonctionnement de la banque de semences. Laboratoire de Conservation des CJBG, 2016 (français).*

Merci de votre attention  
Des questions?



CDc18

1E1

C68

TG17