

Normes applicables aux banques de gènes

pour les ressources phytogénétiques
pour l'alimentation et l'agriculture



COMMISSION DES
RESSOURCES GÉNÉTIQUES
POUR L'ALIMENTATION ET
L'AGRICULTURE



Normes applicables aux banques de gènes

pour les ressources phytogénétiques
pour l'alimentation et l'agriculture

Édition révisée, 2014

Les appellations employées dans ce produit d'information et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) aucune prise de position quant au statut juridique ou au stade de développement des pays, territoires, villes ou zones ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. La mention de sociétés déterminées ou de produits de fabricants, qu'ils soient ou non brevetés, n'entraîne, de la part de la FAO, aucune approbation ou recommandation desdits produits de préférence à d'autres de nature analogue qui ne sont pas cités.

E-ISBN 978-92-5-208262-0 (PDF)

© FAO, 2013, 2014

La FAO encourage l'utilisation, la reproduction et la diffusion des informations figurant dans ce produit d'information. Sauf indication contraire, le contenu peut être copié, téléchargé et imprimé aux fins d'étude privée, de recherches ou d'enseignement, ainsi que pour utilisation dans des produits ou services non commerciaux, sous réserve que la FAO soit correctement mentionnée comme source et comme titulaire du droit d'auteur et à condition qu'il ne soit sous-entendu en aucune manière que la FAO approuverait les opinions, produits ou services des utilisateurs.

Toute demande relative aux droits de traduction ou d'adaptation, à la revente ou à d'autres droits d'utilisation commerciale doit être présentée au moyen du formulaire en ligne disponible à www.fao.org/contact-us/licence-request ou adressée par courriel à copyright@fao.org.

Les produits d'information de la FAO sont disponibles sur le site web de la FAO (www.fao.org/publications) et peuvent être achetés par courriel adressé à publications-sales@fao.org.

Citation: FAO. 2014. *Normes applicables aux banques de gènes pour les ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture*, éd. rev. Rome.

Couverture:

Triticum spp.
Capsicum annuum
Anacardium occidentale
Carica papaya
Zea mays
Oryza sativa
Punica granatum
Colocasia esculenta
Phaseolus vulgaris
Araucaria angustifolia
Chenopodium quinoa
Cucurbita maxima
Brachycton populneus
Phaseolus vulgaris

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	vi
Avant-propos	viii
Préface	x
1. INTRODUCTION	1
2. PRINCIPES FONDAMENTAUX	7
3. NORMES - STRUCTURE ET DEFINITIONS	15
4. NORMES APPLICABLES AUX BANQUES DE GÈNES	
POUR LES SEMENCES ORTHODOXES	17
4.1 Normes relatives à l'acquisition de matériel génétique	18
4.2 Normes relatives au séchage et à l'entreposage	24
4.3 Normes relatives aux essais de viabilité	30
4.4 Normes relatives à la régénération	36
4.5 Normes relatives à la caractérisation	41
4.6 Normes relatives à l'évaluation	45
4.7 Normes relatives à la documentation	50
4.8 Normes relatives à la distribution	53
4.9 Normes relatives à la duplication de sécurité	57
4.10 Normes relatives à la sécurité et au personnel	61
5. NORMES RELATIVES AUX COLLECTIONS EN CHAMP	65
5.1 Normes relatives au choix de l'emplacement	66
5.2 Normes relatives à l'acquisition de matériel génétique	70
5.3 Normes relatives à l'établissement de collections en champ	76
5.4 Normes relatives à la gestion des terrains	82
5.5 Normes relatives à la régénération et à la propagation	87
5.6 Normes relatives à la caractérisation	91
5.7 Normes relatives à l'évaluation	96
5.8 Normes relatives à la documentation	101
5.9 Normes relatives à la distribution	105
5.10 Normes relatives à la sécurité et à la duplication de sécurité	109

6. NORMES APPLICABLES AUX BANQUES DE GÈNES	
POUR LA CULTURE <i>IN VITRO</i> ET LA CRYOCONSERVATION	115
6.1 Normes relatives à l'acquisition et au traitement initial	121
6.2 Normes relatives au dépistage de comportement non orthodoxe et à l'évaluation de la teneur en eau, de la vigueur et de la viabilité	126
6.3 Normes relatives à l'entreposage à l'humidité de semences récalcitrantes	130
6.4 Normes relatives à l'entreposage de cultures <i>in vitro</i> et en croissance ralentie	134
6.5 Normes relatives à la cryoconservation	139
6.6 Normes relatives à la documentation	149
6.7 Normes relatives à la distribution et aux échanges	152
6.8 Normes relatives à la sécurité et à la duplication de sécurité	155
 ANNEXE 1: LISTE DES ACRONYMES	 160
ANNEXE 2: GLOSSAIRE	162



Remerciements

L'élaboration et la publication des *Normes applicables aux banques de gènes pour les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture* ont été possibles grâce à la contribution de nombreuses personnes. Ont pris part à cette entreprise des points focaux nationaux chargés des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture, ainsi que des scientifiques provenant d'organisations nationales et internationales. La FAO saisit l'occasion de les remercier chaleureusement pour avoir, sans compter, prêté toute leur expertise à l'élaboration de ces Normes.

Les Normes applicables aux banques de gènes ont été préparées par la Division de la production végétale et de la protection des plantes de la FAO, sous la direction de Kakoli Ghosh. Durant l'élaboration de ces normes, l'équipe de la FAO - Kakoli Ghosh, Arshiya Noorani et Chikelu Mba - a travaillé en étroite collaboration avec Ehsan Dulloo, Imke Thormann et Jan Engels, de Bioversity International, qui méritent ici une mention spéciale. Nos remerciements s'adressent également à: Jane Toll, du Fonds fiduciaire mondial pour la diversité des cultures et Patricia Berjak et Norman Pammenter, de l'Université du KwaZulu-Natal, pour leurs précieux apports. De nombreux membres du personnel de la FAO ont également prêté leur contribution à cette publication, notamment Linn Borgen-Nilsen, Stefano Diulgheroff, Alison Hodder, Dan Leskien, NeBambi Lutaladio, Dave Nowell, Michela Paganini et Álvaro Toledo.

Nous voudrions également citer et remercier tous les scientifiques qui ont relu les Normes:

Ananda Aguiar, Adriana Alercia, Nadiya AlSaadi, Ahmed Amri, Catalina Anderson, Miriam Andonie, Åsmund Asdal, Sarah Ashmore, Araceli Barceló, Maria Bassols, M. Elena González Benito, Erica E. Benson, Benoit Bizimungu, Peter Bretting, Zofia Bulinska, Marilia Burle, Patricia Bustamante, Emilia Caboni, Lamis Chalak, Rekha Chaudhury, Xiaoling Chen, Andrea M. Clausen, Carmine Damiano, Hadyatou Dantsey-Barry, Maria Teresa Merino De Hart, Axel Diederichsen, Carmen del Río, Ariana Digilio, Sally Dillon, Andreas W. Ebert, David Ellis, Richard Ellis, Florent Engelmann, Epp Espenberg, Francisco Ricardo Ferreira, Brad Fraleigh, R. Jean Gapusi, Massimo Gardiman, Tatjana Gavrilenko, Daniela Giovannini, Agnès Grapin, Badara Gueye, Eva Hain, Magda-Viola Hanke, Jean Hanson, Keith Harding, Siegfried Harrer, Ir Haryono, Fiona R. Hay, Monika Höfer, Kim Ethel Hummer, Salma Idris, Brian M. Irish, Joseph Kalders, Joachim Keller, Maurizio Lambardi, Ulrike Lohwasser, Judy Loo, Xinxiong Lu, Carmen Martín, Rusudan Mdivani, Carlos Miranda, Javad Mozafari, Gregorio Muñoz, Godfrey Mwila, Fawzy Nawar, Normah M. Noor, Dorota Nowosielska, Anna Nukari, Sushil Pandey, Maria Papaefthimiou, Wiesław Podyma, Lerotholi Qhobela, Robin Probert, Alain Ramanantsoanirina, Morten Rasmussen, B.M.C. Reddy, Bob Redden, Barbara M. Reed, Harriet Falck Rehm, Ken Richards, Maria Victoria Rivero, Jonathan Robinson, Manuel Sigüeñas Saavedra, Izulmé Rita Santos, Viswambharan Sarasan, Sarah Sensen, Fabiano Soares, Artem Sorokin, Chisato Takashina, Ayfer Tan, Mary Taylor, Mohammed Tazi, Bradley J. Till, Roberto Tuberosa, Rishi Kumar

Tyagi, Theo van Hintum, Nguyen Van Kien, Bert Visser, Juan Fajardo Vizcayno, Christina Walters, Wei Wei, Fumiko Yagihashi, et Francis Zee.

Notre gratitude va à Petra Staberg et à l'équipe de Pietro Bartoleschi pour la conception graphique et la mise en page de cette publication. La participation de Munnavara Khamidova, Sitora Khakimova, Diana Gutiérrez Méndez et Suzanne Redfern a également été appréciée.

D'autres personnes encore méritent certainement d'être mentionnées ici. Toutes nos excuses et nos remerciements vont à tous ceux et celles qui n'ont pas été cités et qui ont contribué à la préparation des *Normes applicables aux banques de gènes pour les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture*.



Avant-propos

Les ressources phytogénétiques sont une ressource stratégique primordiale pour la production agricole durable. Une conservation et une utilisation efficaces de ces ressources sont essentielles pour garantir la sécurité alimentaire et nutritionnelle, aujourd'hui comme demain. Pour relever ce défi, il faudra que les méthodes et les variétés soient continuellement améliorées de sorte qu'elles soient adaptées aux conditions particulières des écosystèmes agricoles. L'appauvrissement de la diversité génétique réduit les possibilités de gestion résiliente et durable de l'agriculture dans des environnements défavorables, compte tenu des conditions météorologiques qui changent rapidement.

Des banques de gènes bien gérées préservent la diversité génétique et la rendent en outre accessible aux sélectionneurs. *Les Normes applicables aux banques de gènes pour les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture*, préparées sous la direction de la Commission de la FAO sur les ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture, et approuvées par celle-ci lors de sa quatorzième session ordinaire en 2013, établissent les procédures à suivre pour la conservation des ressources phytogénétiques. La Commission reconnaît leur valeur universelle en matière de conservation du matériel génétique dans le monde entier

Ces normes volontaires recouvrent aussi bien les semences conservées dans des banques de gènes que le matériel végétal reproduit par multiplication végétative, y compris les collections en champ. Elles constituent la référence pour définir les meilleures pratiques scientifiques et techniques actuelles et tiennent compte des principaux instruments internationaux de politique en matière de conservation et d'utilisation des ressources phytogénétiques. Elles sont un outil important pour la mise en œuvre du Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture et constituent un élément d'appui au deuxième Plan d'action mondial pour les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Les 7,5 millions d'accessions des banques de gènes dans le monde se composent en grande partie d'espèces cultivées parmi les plus importantes pour l'alimentation humaine et animale, notamment des variétés sauvages et traditionnelles majeures, mais aussi de semences d'importance locale et des espèces sous-utilisées.

Les Normes encouragent une gestion active des banques de gènes, et envisagent un ensemble d'approches complémentaires. Elles aideront les gestionnaires des banques de gènes à trouver un équilibre entre les objectifs scientifiques, les ressources disponibles et les conditions effectives dans lesquelles ils travaillent, tout en reconnaissant que les plus de 1750 banques de gènes dans le monde diffèrent considérablement par la taille de leurs collections et les ressources humaines et financières à leur disposition. Le défi auquel sont confrontés de nombreux pays en développement pour assurer une conservation fiable sur le long terme est de faire face aux capacités limitées et aux infrastructures inappropriées, qui rendent la tâche difficile.

La conservation des ressources génétiques agricoles n'a d'intérêt que si celles-ci sont utilisées de manière efficace. Cela exige des liens solides tout au long de la filière, qui va de la conservation des ressources *in situ* aux agriculteurs et à leurs communautés jusqu'aux consommateurs, en passant par la récolte, le stockage dans des banques de gènes, sans oublier la recherche et l'élevage. Les conservateurs de banques de gènes, les sélectionneurs et les programmes nationaux doivent travailler ensemble pour assurer la conservation efficace et durable des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture, dont dépend l'humanité. Je demande que des mesures appropriées soit prises aux niveaux national et régional, de sorte que ces Normes internationales primordiales puissent atteindre leur objectif de souscrire à la sécurité alimentaire.



Ren Wang

Sous-Directeur général

Département de l'agriculture et de la protection des consommateurs



Préface

Les banques de gènes jouent un rôle essentiel dans la conservation, la disponibilité et l'utilisation d'une grande partie de la diversité phytogénétique et sont ainsi utiles pour améliorer les cultures et assurer la sécurité alimentaire et nutritionnelle. Elles contribuent à créer une passerelle entre le passé et le futur, en garantissant la disponibilité permanente de ressources génétiques pour la recherche, la sélection et l'obtention de semences améliorées pour un système d'agriculture résilient et durable. Une gestion efficace des banques de gènes, par l'application de normes et de procédures, est essentielle pour la conservation et l'utilisation durables des ressources phytogénétiques.

Les *Normes applicables aux banques de gènes pour les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture* (Normes applicables aux banques de gènes) sont des normes internationales pour la conservation *ex situ* dans des banques de semences, pour les collections en champ, ainsi que pour la conservation *in vitro* et la cryoconservation. L'équipe des semences et ressources phytogénétiques de la FAO a élaboré ces normes sous la direction de la Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Au cours de la phase préparatoire, les normes pour les semences orthodoxes ont été mises à jour, et d'autres normes ont été développées pour les collections en champ, la conservation *in vitro* et la cryoconservation, en consultation avec le Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale (CGIAR), en particulier Bioversity International. Les gestionnaires des banques de gènes, les institutions universitaires et de recherche concernées et les points focaux nationaux pour les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture ont contribué à fournir des informations précieuses, tout comme les secrétariats du Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture et la Convention internationale pour la protection des végétaux. À sa quatorzième session, en 2013, la Commission a approuvé les Normes applicables aux banques de gènes et a demandé qu'elles fassent au plus vite l'objet d'une adoption universelle.

L'objectif des Normes applicables aux banques de gènes est la conservation des ressources phytogénétiques dans des conditions qui répondent à des normes reconnues et appropriées, sur la base des connaissances techniques et scientifiques disponibles actuellement. Toutes les normes sont fondées sur des principes fondamentaux communs à tous les différents types de banques de gènes. Elles prennent également en compte les changements dans la gestion des semences et des techniques grâce aux progrès de la biologie moléculaire et de la bioinformatique. Elles intègrent les progrès accomplis dans le domaine de la documentation et des systèmes d'information, qui prennent une place toujours plus centrale dans l'amélioration de la gestion des banques de gènes et l'optimisation des ressources. Ce document présente, pour chaque norme, des informations d'ordre général, les aspects techniques, des circonstances particulières ainsi qu'une bibliographie sélective constituée de manuels techniques et de documents protocolaires appropriés.

Les Normes applicables aux banques de gènes sont suffisamment génériques pour être applicables à toutes les banques de gènes et doivent être utilisées conjointement aux informations spécifiques aux espèces. C'est le cas en particulier des plantes qui produisent des semences non orthodoxes et/ou qui sont reproduites par multiplication végétative, étant donné la difficulté d'établir des normes spécifiques valables pour toutes ces espèces qui ont des propriétés de stockage des semences, de formes et de cycles de vie différents. Ces Normes sont non contraignantes et d'application volontaire. Elles mettent en avant l'importance de la sécurisation et du partage de matériel, ainsi que d'une documentation connexe en conformité avec les réglementations nationales et internationales. Un examen périodique des normes sera utile compte tenu des changements de politiques et des évolutions techniques.

Conserver et accroître l'utilisation durable des ressources phytogénétiques est une condition nécessaire pour assurer la sécurité alimentaire et répondre aux besoins nutritionnels des générations présentes et futures. Ainsi, il est essentiel de conserver la diversité des ressources phytogénétiques afin qu'elle soit disponible auprès de la communauté mondiale. Toutefois, l'entretien des banques de gènes peut être coûteux. De nombreuses avancées scientifiques, telles que la cryoconservation, ont un coût, en particulier lorsqu'elles sont utilisées pour des essais à grande échelle. L'entretien des collections en champ est également astreignant en terme de main-d'œuvre et de coût. Par conséquent, l'accent doit être mis sur la gestion proactive des banques de gènes en adoptant une approche complémentaire et un équilibre optimal entre les considérations scientifiques, le personnel disponible, les infrastructures et les ressources financières dans les conditions actuelles. Dans de nombreux pays, la disponibilité de personnel qualifié et de ressources suffisantes pour maintenir les collections des banques de gènes d'une manière durable reste un défi. Des partenariats à long terme aux niveaux national, régional et mondial ainsi que des ressources pour le renforcement des capacités seront nécessaires pour appliquer les normes.



112

600148

600148

112
600148

600148

600148



Chapitre 1

Introduction





Les banques de gènes du monde entier détiennent des collections de ressources phytogénétiques extrêmement variées. Leur objectif global est de conserver le matériel phytogénétique sur le long terme et de le rendre accessible aux sélectionneurs, aux chercheurs et aux autres utilisateurs. Les ressources phytogénétiques sont les matières premières utilisées dans l'amélioration des cultures. Leur conservation et leur utilisation est essentielle à la sécurité alimentaire et nutritionnelle mondiale. Pour pouvoir conserver durablement les ressources phytogénétiques, les banques de gènes doivent être gérées de manière efficace et efficiente grâce à l'application de normes et de procédures qui garantissent la survie et la disponibilité des ressources phytogénétiques.

Les *Normes applicables aux banques de gènes pour la conservation des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture* sont nées de la révision des Normes applicables aux banques de gènes publiées en 1994 par la FAO et l'Institut international des ressources phytogénétiques (IPGRI). Ce processus a été amorcé à la demande de la Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture (CRGAA) à la lumière des évolutions du paysage politique mondial et des avancées réalisées dans le domaine des sciences et des technologies. Les principaux changements de politiques ayant une incidence sur la conservation des ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (RPGAA) dans les banques de gènes ont trait à la disponibilité et à la distribution du matériel génétique. Ces questions sont apparues suite à l'adoption d'instruments internationaux comme la Convention sur la diversité biologique (CDB), le Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (Traité international) et la Convention internationale pour la protection des végétaux (CIPV) ainsi que l'Accord de l'OMC sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires pour ce qui est des règles relatives aux organismes nuisibles. En 2010, la CDB a adopté le Protocole de Nagoya sur l'accès aux ressources génétiques et le partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation. Ce texte pourrait avoir des conséquences sur les échanges de matériel génétique. Sur le plan scientifique, les progrès réalisés en matière d'entreposage de semences, de

biotechnologies et de technologies de l'information et de la communication ont apporté de nouvelles dimensions à la conservation du matériel phytogénétique.

Les *Normes applicables aux banques de gènes pour les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture* servent de directives aux banques de gènes qui conservent des collections végétales (semences, plantes vivantes et explants). Elles ont été élaborées suite à une série de consultations avec un grand nombre d'experts en matière de conservation, cryoconservation et conservation *in vitro* des semences ainsi que de collections en champ à travers le monde. Précisons que les *Normes* sont volontaires et non contraignantes, et qu'elles n'ont pas été élaborées selon une procédure de normalisation officielle. Il faut les considérer comme des cibles à atteindre pour mettre en place un système mondial efficient, efficace, rationnel et transparent de conservation *ex situ* qui permette une préservation optimale de la viabilité et de l'intégrité génétique du matériel entreposé dans les banques de gènes, de manière à garantir l'accès à des semences de qualité issues des ressources phytogénétiques conservées et leur utilisation.

Il est important que ces *Normes* ne soient pas appliquées sans discernement car les méthodes de conservation connaissent des avancées technologiques constantes, souvent spécifiques à une espèce, et le contexte lié à l'affectation et à la durée de conservation et d'utilisation du matériel génétique est en évolution permanente. Il est donc recommandé d'utiliser le projet de révision des *Normes* applicables aux banques de gènes parallèlement à d'autres sources de référence, en particulier des informations propres à chaque espèce, notamment pour les plantes à semences non orthodoxes et/ou multipliées par voie végétative. En effet, celles-ci réagissent différemment à l'entreposage et ont des formes de vies (herbes, arbustes, arbres, lianes/vignes) et des cycles de vie (annuel, bisannuel, pérenne) différents, pour lesquels il est difficile d'établir des normes spécifiques, valables pour toutes les espèces.

Ce document comprend deux parties. La première partie traite des principes fondamentaux qui sous-tendent les *Normes* applicables aux banques de gènes et constituent le cadre global d'une gestion efficace et efficiente des banques de gènes. Les principes clés au cœur du fonctionnement d'une banque de gènes sont la préservation de l'identité, de la viabilité et de l'intégrité génétique du matériel, ainsi que la promotion de l'accès. Ceci comprend également les informations associées facilitant l'utilisation du matériel végétal entreposé, conformément aux instruments réglementaires nationaux et internationaux pertinents. Les principes fondamentaux sont communs à tous les différents types de banques de gènes.

La deuxième partie fournit les normes détaillées pour trois types de banques de gènes, notamment les banques de semences, les collections en champ et les collections *in vitro* ou cryoconservées. Ces *Normes* couvrent toutes les opérations principales effectuées au sein d'une banque de gènes et fournissent une bibliographie sélective pour chaque norme. Bien que les informations techniques essentielles pertinentes soient fournies pour toutes les normes, il convient de souligner la nécessité de consulter les manuels techniques appropriés pour ce qui est des procédures et des protocoles. Les *Normes* relatives aux banques de semences (Chapitre 4) traitent de la conservation de semences orthodoxes tolérantes à la dessiccation c'est-à-dire qui

peuvent être déshydratées jusqu'à de faibles teneurs en eau et qui réagissent bien aux basses températures. L'abaissement du degré d'humidité et de la température ralentit les processus métaboliques, augmentant ainsi la longévité des semences. Parmi les plantes à semences orthodoxes, citons le maïs (*Zea mays* L.), le blé (*Triticum* spp.), le riz (*Oryza* spp.), le pois chiche (*Cicer arietinum*), le coton (*Gossypium* spp.) et le tournesol (*Helianthus annuus*).

Les chapitres 5 et 6 fournissent respectivement les normes traitant de la conservation des végétaux produisant des semences non orthodoxes, appelées aussi semences récalcitrantes ou intermédiaires, et/ou des plantes multipliées par voie végétative. Ces végétaux ne peuvent pas être conservés de la même façon que les semences orthodoxes, c'est-à-dire à basse température et faible teneur en humidité et requièrent d'autres méthodes de conservation *ex situ*.

La méthode la plus couramment utilisée pour les plantes produisant des semences non orthodoxes est celle des collections en champ. Elle est également utilisée pour les plantes produisant très peu de semences ou multipliées par voie végétative et/ou les végétaux dont la reproduction nécessite un cycle de vie long et/ou des matériels de plantation. Malgré l'utilisation du terme « collection en champ », cette méthode comprend également l'entretien de plantes vivantes en pots ou en plateaux, sous abri ou en serre. Des directives techniques et des manuels de formation sont disponibles pour la gestion de collections de matériel génétique maintenues dans les collections en champ (par exemple Bioversity International *et al.*, 2011; Reed *et al.*, 2004; Said Saad et Rao, 2001; Engelmann, 1999; Engelmann et Takagi, 2000; Geburek et Turok, 2005).

La conservation *in vitro* de matériel phytogénétique et la cryoconservation peuvent être effectuées par le biais d'une croissance ralentie (*in vitro*) pour un entreposage à court ou moyen terme, ou par cryoconservation à long-terme. La première méthode consiste à maintenir les cultures (en particulier les méristèmes apicaux, les méristèmes, les embryons somatiques, les suspensions cellulaires ou les cals embryogènes) en milieu de culture artificiel, en conditions limitant la croissance. Le taux de croissance des cultures peut être limité au moyen de diverses méthodes, y compris la diminution de la température, l'abaissement de l'intensité lumineuse ou la manipulation du milieu de culture par l'ajout d'agents osmotiques ou de ralentisseurs de croissance (Engelmann, 1999).

La cryoconservation consiste en l'entreposage de matériel biologique (semences, embryons végétaux, méristèmes apicaux/méristèmes et/ou pollen) à des températures extrêmement basses correspondant généralement à celle de l'azote liquide, soit -196 °C (Engelmann et Takagi, 2000; Reed, 2010). Dans ces conditions, les processus biochimiques et la plupart des processus physiques sont interrompus et les matériels peuvent être conservés à long terme. Ces modes de conservation représentent une approche complémentaire aux autres méthodes et sont nécessaires à une conservation sûre, efficace et rentable (Reed, 2010). Par exemple, les souches cryoconservées peuvent être maintenues comme sauvegarde pour les collections en champ, comme collections de référence de la diversité génétique disponible pour une population et comme source d'allèles nouveaux pour l'avenir.

Les normes suivantes sont fournies pour les types de banques de gènes respectifs:

- **Normes applicables aux banques de gènes pour les semences orthodoxes:** acquisition de matériel génétique, séchage et entreposage des semences, surveillance de la viabilité, régénération, caractérisation, évaluation, documentation, distribution, duplication de sécurité et sécurité/personnel.
- **Normes applicables aux collections en champ:** choix de l'emplacement, acquisition du matériel génétique, établissement des collections en champ, gestion des terrains, régénération et propagation, caractérisation, évaluation, documentation, distribution, sécurité et duplication de sécurité.
- **Normes applicables aux banques de gènes pour la culture *in vitro* et la cryoconservation:** acquisition de matériel génétique, test de comportement non-orthodoxe et évaluation de la teneur en eau, de la vigueur et de la viabilité, entreposage à l'humidité pour les semences récalcitrantes, culture *in vitro* et entreposage en croissance ralentie, cryoconservation, documentation, distribution et échange, sécurité et duplication de sécurité.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Bioversity International/Food and Fertilizer Technology Center/TARI-COA (Taiwan Agricultural Research Institute-Council of Agriculture). 2011. *A training module for the international course on the management and utilisation of field genebanks and in vitro collections*. Fengshan, Taïwan, TARI.

Engelmann, F., éd. 1999. *Management of field and in vitro germplasm collections*. Actes d'une réunion consultative, 15-20 janvier 1996. Cali, Colombie, CIAT, et Rome, IPGRI.

Engelmann, F. et Takagi, H., édés. 2000. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Tsukuba, Japon, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, et Rome, IPGRI.

Geburek, T. et Turok, J., édés. 2005. *Conservation and management of forest genetic resources in Europe*. Zvolen, Slovaquie, Arbora Publishers.

Reed, B.M. 2010. *Plant cryopreservation. A practical guide*. New York, États-Unis, Springer.

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. et Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, IPGRI.

Said Saad, M. et Rao, V.R., édés. 2001. *Establishment and management of field genebank training manual*. Serdang, Malaisie, IPGRI-APO.

SGRP-CGIAR (Programme sur les ressources génétiques du Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale). Crop Genebank Knowledge Base (disponible à l'adresse suivante: <http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org>).





Chapitre 2

Principes fondamentaux





Les banques de gènes du monde entier partagent les mêmes objectifs principaux mais leurs missions, leurs ressources et leurs systèmes de fonctionnement diffèrent souvent. C'est pourquoi les conservateurs doivent s'efforcer d'optimiser le système global de leur banque de gènes, ce qui nécessite des solutions de gestion qui peuvent varier de façon substantielle d'une institution à l'autre, même si les objectifs visés demeurent identiques. Les principes fondamentaux expliquent pourquoi et à quelle fin on conserve des ressources phylogénétiques. Ils servent de base à l'établissement de normes sans lesquelles les banques de gènes ne pourraient fonctionner de manière fluide. Les plus essentiels en matière de conservation sont décrits dans la section suivante.

Identité des accessions

Il convient de veiller à ce que l'identité des accessions de semences conservées dans les banques de gènes soit préservée tout au long des divers processus, de l'acquisition à la distribution en passant par l'entreposage. L'identification des accessions est fortement tributaire du recueil minutieux de données et d'informations concernant le matériel. Ce processus commence par l'enregistrement de données d'identification comprenant des informations sur la collecte et, le cas échéant, sur le donateur. Il est également nécessaire d'enregistrer des informations relatives aux collections plus anciennes dont les données d'identification n'ont pas été notées précédemment ou sont incomplètes. Bien souvent, les spécimens d'herbier et les collections de référence peuvent contribuer largement à l'identification des accessions. L'identification des accessions sur le terrain est primordiale. En effet, un mauvais étiquetage peut conduire à une érosion génétique importante. L'étiquetage sur le terrain doit être complété par des plans de masse correctement documentés, de façon à assurer une identification correcte des accessions au sein des collections. Divers facteurs externes, tels que les mauvaises conditions climatiques, peuvent entraîner la perte des étiquettes utilisées sur le terrain. Les techniques modernes telles que les

étiquettes d'accessions comportant des codes-barres, les étiquettes d'identification par radiofréquence (RFID) et les marqueurs moléculaires peuvent faciliter la gestion du matériel génétique en réduisant les possibilités d'erreurs et garantissent l'identité des accessions concernées.

Préservation de la viabilité

Préserver la viabilité, l'intégrité génétique et la qualité des accessions conservées dans les banques de gènes et les rendre disponibles à l'utilisation est le but ultime de la gestion des banques de gènes. Il est donc crucial que tous les processus des banques de gènes soient conformes aux normes permettant de maintenir la viabilité à un niveau acceptable. Pour atteindre ces objectifs, il convient de porter une attention particulière aux normes relatives à l'acquisition, au traitement et à l'entreposage de matériel génétique. Pour les semences récalcitrantes et d'autres types non orthodoxes, ceci est évalué par vérification visuelle de l'absence de dommages ainsi qu'à l'aide du taux de germination et de la germination totale. Toutefois, la présence à l'intérieur des graines de moisissures et de bactéries indécélables à l'œil nu peut compromettre la qualité. En général dans les banques de gènes de semences, les accessions acceptées dans une banque de gènes à l'étape de l'acquisition doivent présenter une viabilité élevée et être conformes, autant que possible, aux normes relatives à l'acquisition de matériel génétique. Collecter les semences le plus rapidement possible après la maturation et avant la dispersion naturelle, en évitant de ramasser celles qui sont disséminées au sol, souillées ou qui peuvent être porteuses de champignons ou de bactéries saprophytes ou pathogènes permet de s'assurer qu'elles sont de la meilleure qualité qui soit sur le plan physiologique. Les banques de gènes doivent aussi veiller à ce que le matériel génétique collecté soit représentatif de la population d'origine d'un point de vue génétique, tout en tenant compte du nombre de propagules vivantes, de manière à ne pas compromettre la qualité de l'échantillon. Il est indispensable de contrôler l'état des échantillons entreposés en réalisant des essais de viabilité à des intervalles déterminés par la longévité attendue des semences. On peut éviter une régénération coûteuse ou, tout au moins, la retarder en portant suffisamment d'attention à la manipulation, au séchage et à l'entreposage post-récolte. Dans le contexte d'une collection en champ, le terme de propagabilité (qualité de ce qui est propageable) est plus approprié que le terme de viabilité, plus spécifiquement lié à la capacité des graines à germer et à produire une plantule. Les collections en champ sont sensibles à l'impact de facteurs environnementaux tels que les conditions climatiques ou l'incidence des organismes nuisibles. Ces impacts sont différents suivant les différents types d'espèces et de cycles de croissance (plantes annuelles, bisannuelles ou vivaces). Dans le cas des espèces dont le comportement des semences après l'entreposage est inconnu (à savoir si elles sont récalcitrantes, autrement non orthodoxes ou orthodoxes), la condition préalable à l'établissement de toute stratégie d'entreposage de matériel génétique est la vérification des réponses des semences (généralement à la déshydratation lente).

Préservation de l'intégrité génétique

La nécessité de préserver l'intégrité génétique est étroitement liée au maintien de la viabilité et de la diversité de l'échantillon original qui a été recueilli. Tous les processus des banques de gènes, de la collecte à l'acquisition en passant par l'entreposage, la régénération et la distribution, sont importants pour préserver l'intégrité génétique. En veillant au maintien de la viabilité conformément aux normes établies, on contribue à la préservation de l'intégrité génétique. L'évaluation du maintien de la stabilité génomique, en particulier lorsque les échantillons sont récupérés du cryostockage, fait appel à diverses techniques moléculaires, y compris les études d'éventuelles modifications épigénétiques réversibles ou non. Chez les plantes nécessitant de longues périodes entre l'ensemencement et la maturité sexuelle, la régénération des semences sur le terrain serait difficilement envisageable. Un ré-échantillonnage de la population originale doit être entrepris lorsque l'on observe des signes indiquant une baisse de la force et de la viabilité. La préservation de l'intégrité génétique est également très importante pour le matériel génétique conservé *in vitro*, en particulier en ce qui concerne le risque de variation somaclonale. C'est la raison principale pour laquelle il faut éviter l'embryogenèse somatique indirecte (c'est-à-dire le passage par l'étape de cal) pour la production de types de matériel génétique destinés à la conservation; sauf s'il n'existe aucune autre alternative. Dans la mesure du possible, l'étape d'acquisition doit permettre d'obtenir des échantillons de semences représentatifs, de bonne qualité et en quantité suffisante. Cependant, on admet que l'échantillon ne soit pas nécessairement représentatif de la population d'origine lorsque l'objectif est de cibler des caractéristiques particulières. Pour limiter autant que possible l'érosion génétique, il est important de suivre les protocoles recommandés¹ en matière de régénération, en limitant le nombre de cycles de régénération, en veillant à ce que la taille réelle de la population soit suffisamment importante, en procédant à un échantillonnage équilibré et en contrôlant la pollinisation. Soulignons tout particulièrement l'importance de la duplication de sécurité, qui permet de faire face aux risques qui peuvent exister au sein des banques de gènes.

Préservation de la santé du matériel génétique

Les banques de gènes doivent s'efforcer, dans la mesure du possible, de veiller à ce que les semences qu'elles conservent et distribuent soient exemptes d'organismes de quarantaine et d'organismes nuisibles réglementés (bactéries, virus, champignons et insectes). Les surfaces externes peuvent généralement être assainies de manière efficace à l'aide de procédures de désinfection superficielle. Elles n'ont souvent pas les capacités ou les ressources nécessaires pour tester elles-mêmes les échantillons collectés, acquis

¹ Dullo, M.E., Hanson, J., Jorge, M.A. et Thormann, I. 2008. Regeneration guidelines: general guiding principles. Dans: M.E. Dulloo, I. Thormann, M.A. Jorge et J. Hanson, éd. *Crop specific regeneration guidelines. Programme sur les ressources génétiques à l'échelle du Système (PRGS) du CGIAR*, Rome. Voir aussi <http://croppgenebank.sgrp.cgiar.org/>.

ou issus de parcelles de régénération ou de multiplication afin de s'assurer qu'ils sont exempts d'organismes de quarantaine. Ce problème se pose en particulier lorsque le matériel génétique provient de tierces parties. Ces problèmes sont aggravés dans le cas de la conservation d'espèces à semences récalcitrantes. Les contaminants internes ne sont révélés que lorsque les semences récalcitrantes sont conservées à court ou moyen terme en entreposage à l'humidité, ou lorsque des explants obtenus à partir des semences sont mis en culture de tissus. La solution peu satisfaisante à l'heure actuelle est de se débarrasser de toute semence/explant contaminé et constitue le seul moyen de garantir un matériel génétique non contaminé. C'est pourquoi il est important que les certificats d'importation et phytosanitaires pertinents accompagnent les semences en cas d'échange de matériel génétique, afin de garantir le statut sanitaire des échantillons reçus. Certains échantillons infectés ou infestés peuvent être aisément nettoyés, mais d'autres nécessitent de recourir à des méthodes plus sophistiquées.

Sécurité physique des collections

Les constructions abritant des banques de gènes doivent respecter des normes suffisantes visant à protéger le matériel génétique contre tout facteur extérieur, notamment les catastrophes naturelles et les dommages imputables aux êtres humains. C'est l'un des principes fondamentaux de la conservation des ressources génétiques. Des systèmes de sécurité adaptés sont également nécessaires pour contrôler le fonctionnement des équipements de refroidissement et des appareils permettant le suivi des paramètres essentiels en fonction du temps. La cryconservation nécessite de l'azote liquide. Ce produit cryogène doit donc être disponible en permanence. Par ailleurs, les niveaux d'azote liquide doivent absolument être maintenus, peu importe que le remplissage des cuves de stockage ou des congélateurs à azote liquide se fasse manuellement ou automatiquement. Une autre question importante se pose en matière de sécurité: celle de veiller à ce que le matériel soit dupliqué et conservé avec toutes les précautions qui s'imposent sur un ou plusieurs sites. De cette façon, si la collection est détruite pour une raison quelconque, elle peut être restaurée à partir des échantillons dupliqués.

Disponibilité et utilisation du matériel génétique

Le matériel conservé doit être disponible en vue d'une utilisation immédiate ou ultérieure. Il est donc important que l'ensemble des processus ayant trait au fonctionnement et à la gestion des banques de gènes contribuent à cet objectif. Il sera nécessaire de conserver des quantités suffisantes de semences, accompagnées des informations qui s'y rapportent. Bien que les collections en champ ne comportent que peu d'accessions et possèdent donc une capacité limitée de distribution aux utilisateurs, la banque de gènes doit disposer d'une stratégie lui permettant de multiplier rapidement n'importe quel matériel génétique à des fins de distribution.

Disponibilité des informations

Pour favoriser la communication des informations et la responsabilisation, des données essentielles, détaillées, précises et à jour doivent être enregistrées à toutes les étapes. Il peut s'agir d'informations historiques ou actuelles, intéressant en particulier la gestion de chaque accession après son acquisition. L'accès à ces informations, leur disponibilité et leur partage doivent être considérés comme hautement prioritaires car ils contribuent à améliorer et rationaliser la conservation. Des bases de données interactives comportant une fonction de recherche et regroupant des données d'évaluation phénotypique peuvent aider les acquéreurs de matériel génétique à cibler leurs demandes. Par ailleurs, la communication de nouvelles données d'évaluation ne fait qu'accroître la valeur et l'utilité de la collection. En rendant disponibles et facilement accessibles les informations relatives au matériel génétique conservé, on améliorera l'utilisation de celui-ci. En outre, on aidera ainsi les conservateurs de banques de gènes à mieux planifier leurs activités de multiplication et de régénération afin qu'ils puissent disposer de stocks suffisants de leurs accessions. Pour ce qui est des systèmes d'information basés sur les banques de gènes, il est recommandé de disposer d'une base de données interactive comportant une fonction de recherche. Un bon exemple de la valeur de ce type de base de données est la Base de données d'informations sur les semences (SID)² de la Banque de semences du Millénaire de Kew. Le Système de gestion des herbiers et de la recherche en botanique (BRAHMS)³ a été mis en place à des fins de conservation et de gestion des données relatives aux matériels génétiques. D'autre part, EURISCO⁴ est un catalogue Internet fournissant des informations concernant les collections végétales européennes *ex situ*.

Gestion volontariste des banques de gènes

La durabilité et l'efficacité de la conservation des ressources génétiques dépendent de la gestion active du matériel conservé. Une gestion volontariste est essentielle pour veiller à ce que le matériel génétique soit conservé efficacement et rendu disponible en temps voulu et en quantité suffisante afin qu'il puisse servir ultérieurement à des sélectionneurs, des agriculteurs, des chercheurs et d'autres utilisateurs. Elle souligne l'importance d'obtenir et de partager du matériel ainsi que les informations qui s'y rapportent, et met en place une stratégie fonctionnelle de gestion des ressources humaines et financières permettant de rationaliser le système. Elle comporte une stratégie de gestion des risques et encourage les collaborations avec des tierces parties pour la mise à disposition de services aux banques de gènes dans un effort de conservation de la biodiversité. Il est à noter que la préservation de collections en

2 <http://data.kew.org/sid>.

3 <http://dps.plants.ox.ac.uk/bol>.

4 <http://eurisco.ecpgr.org>.

champ est onéreuse. Tous les efforts doivent donc être entrepris pour le développement de collections complémentaires *in vitro* ou en cryoconservation. L'adhésion aux cadres juridiques et réglementaires nationaux et internationaux, en particulier ceux qui ont trait à l'accès, à la disponibilité et à la distribution du matériel, ainsi qu'à la santé des végétaux et des semences, est indispensable. Un Accord type de transfert de matériel (ATTM) devrait être utilisé pour les espèces cultivées dans le cadre du Système multilatéral du Traité international. Les réglementations de la CIPV servent de cadre à celles qui concernent la quarantaine et la santé afin de prévenir l'introduction et la propagation d'organismes nuisibles et de maladies. Surtout, les institutions détenant des banques de gènes doivent prendre des engagements permanents et à long terme quant à la disponibilité de ressources humaines et financières.

De plus, une gestion volontariste encouragerait l'application d'expériences et de connaissances empiriques au nouveau matériel génétique et viserait à mettre en œuvre, dans la mesure du possible, les normes applicables aux banques de gènes dans les conditions locales. Ainsi, même si une norme particulière n'est pas totalement respectée, des mesures conservatoires sont prises pour garantir le respect des principes fondamentaux de la gestion des banques de gènes.







Chapitre 3

Normes – structure et définitions

Les Normes, telles qu'elles sont décrites dans ce document, définissent le niveau de performance du fonctionnement ordinaire d'une banque de gènes, en-deçà duquel il existe un risque élevé de perte d'intégrité génétique (par exemple, une probabilité de cinq pour cent ou plus de disparition d'un allèle dans une accession au cours de la période d'entreposage). Chaque section se divise comme suit:

- Normes
- Informations générales
- Aspects techniques
- Circonstances particulières
- Bibliographie sélective

Les **INFORMATIONS GÉNÉRALES** regroupent les principaux éléments nécessaires à l'application des normes. Elles fournissent une brève description de l'activité ordinaire d'une banque de gènes concernée par ces normes et présentent les principes qui les sous-tendent. Les **ASPECTS TECHNIQUES** font référence aux principes techniques et scientifiques permettant de comprendre et d'étayer les normes. Les **CIRCONSTANCES PARTICULIÈRES** sont les dispositions à prendre dans les cas où les normes ne peuvent pas être appliquées, par exemple à une espèce donnée. Elles traitent des exceptions, des voies alternatives et des options en matière de gestion des risques. À la fin de chaque section, une **BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE** réunit des sources d'information et des références.







Chapitre 4

Normes applicables aux banques de gènes pour les semences orthodoxes



4.1. Normes relatives à l'acquisition de matériel génétique

Normes

- 4.1.1 Tous les échantillons de semences ajoutés à la collection d'une banque de gènes ont été acquis légalement et sont accompagnés de la documentation technique pertinente.
- 4.1.2 La collecte des semences doit être effectuée le plus rapidement possible après la maturation et avant la dispersion naturelle, en évitant une éventuelle contamination génétique, afin d'obtenir des semences d'une qualité maximale.
- 4.1.3 Pour ce faire, le délai séparant la collecte des semences de leur transfert vers un environnement de séchage contrôlé doit être de trois à cinq jours ou le plus court possible; sachant que les semences ne doivent pas être exposées à des températures élevées ni à une lumière intense et que les semences immatures de certaines espèces nécessitent une post-maturation pour que des embryons se développent.
- 4.1.4 Tous les échantillons de semences doivent être accompagnés d'au moins un minimum de données associées, telles que détaillées dans les descripteurs de passeport multi-cultures élaborés par la FAO et Bioversity.
- 4.1.5 Les semences doivent être collectées à partir d'un minimum de 30 à 60 plantes selon le système de reproduction de l'espèce cible.

Informations générales

L'acquisition est le processus de collecte ou de demande de semences – ainsi que des informations qui s'y rapportent – en vue de les intégrer dans une banque de gènes. Le matériel doit être acquis légalement, de bonne qualité et accompagné des documents appropriés.

L'acquisition doit respecter les réglementations internationales et nationales pertinentes comme les lois phytosanitaires ou relatives à la quarantaine, les réglementations d'accès établies par le Traité international et la CDB, ainsi que les lois nationales régissant l'accès aux ressources génétiques. L'adhésion à la Norme 4.1.1 permettra l'exportation de semences depuis le pays d'origine ou donateur et leur importation dans le pays où se trouve la banque de gènes. Par ailleurs, elle déterminera le régime de gestion et de distribution (ATTM ou Accords de transfert de matériel [ATM], par exemple).

Il est nécessaire de veiller à ce que les semences soient de la meilleure qualité possible et d'éviter de conserver des semences immatures ou ayant été exposées trop longtemps aux éléments naturels. La manière dont les semences sont manipulées entre leur collecte et leur transfert vers une atmosphère contrôlée est déterminante quant à leur qualité. Une température et une humidité extrêmes lors de la période suivant la collecte et du transport vers la banque de gènes peuvent provoquer une perte rapide de viabilité et réduire la longévité des semences entreposées. Il en est de même pour la manipulation post-récolte au sein de la banque de gènes. La qualité et la longévité des semences dépendent notamment des conditions préalables à l'entreposage dans la banque de gènes. Il est recommandé de procéder à un essai de germination immédiatement après la collecte afin de déterminer la qualité des semences.

Au moment de l'acquisition, il est important de veiller à ce que les données d'identification de chaque accession soient aussi complètes que possible et pleinement étayées, en particulier les données de géoréférencement qui aident à localiser les sites de collecte. En effet, elles sont essentielles pour identifier et classer les accessions, et serviront de point d'entrée pour leur sélection et leur utilisation.

Aspects techniques

L'accès aux ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture qui relève du Système multilatéral du Traité international doit se faire dans le cadre du ATTM. Les acquéreurs doivent respecter les dispositions pertinentes du Traité international ou de la CDB et un ATM doit être signé par les personnes autorisées dans le pays de collecte, conformément aux lois nationales régissant l'accès aux ressources génétiques du pays ou se fera la collecte (ENSCONET, 2009). En outre, à la demande du pays fournisseur, l'accès peut être soumis à son consentement préalable et informé. Il convient de s'enquérir des réglementations phytosanitaires et autres conditions d'importation auprès des autorités compétentes dans le pays receveur.

La teneur en eau des semences fraîchement récoltées dans les champs peut être élevée. Dans ce cas, il faut les ventiler afin de prévenir la fermentation. On doit les placer dans des récipients adaptés permettant une bonne circulation de l'air et empêchant ainsi leur contenu de devenir humide. Grâce à ce système, les semences ne se mélangent pas et ne sont pas abîmées pendant la collecte et le transport. En veillant à ce que la température ne dépasse pas 30 °C et que l'humidité relative (HR) reste inférieure à 85 pour cent après la collecte et le transport, ainsi que pendant le traitement post-récolte, on contribue à préserver la qualité des semences. Si des semences totalement mures doivent être traitées et séchées sur place, il convient de suivre les recommandations techniques applicables à l'espèce en question ou à une espèce similaire afin de limiter le risque de détérioration.

Les formulaires prévus à cet effet doivent être utilisés pour inscrire les données de collecte. Ils doivent contenir des informations comme la classification taxonomique initiale de l'échantillon, les coordonnées du site de collecte selon le Système de positionnement mondial (GPS), une description de l'habitat des végétaux collectés, le nombre de végétaux échantillonnés et les autres données pertinentes quant à la qualité de la conservation. Si possible, les descripteurs de passeport multi-cultures doivent être utilisés (Alercia *et al.*, 2012). Lorsque le matériel est collecté à partir de champs ou d'entrepôts d'agriculteurs, des informations complémentaires très utiles peuvent être obtenues en questionnant les agriculteurs, notamment sur les pratiques culturales, l'historique et l'origine des générations précédentes de semences, les utilisations etc. Lors de la collecte, l'opérateur doit aussi être attentif à l'épuisement de la population naturelle visée. Selon les recommandations du manuel de collecte du Réseau européen de conservation de graines indigènes (ENSCONET), la collecte ne doit pas dépasser 20 pour cent du total des semences disponibles au sein d'une population (ENSCONET, 2009). En outre, il peut s'avérer utile de répéter l'échantillonnage d'un site donné afin d'optimiser la capture de la variabilité génétique qui peut être présente à divers moments.

L'échantillon doit inclure au moins un exemplaire des 95 pour cent d'allèles que l'on trouve dans la population cible à une fréquence supérieure à 0,05 (Marshall et Brown, 1975). Un échantillon aléatoire de 59 gamètes totalement distincts suffit à atteindre cet objectif. Cela correspond à 30 individus dans une espèce où les croisements sont complètement aléatoires et à 60 chez une espèce intégralement autogame (Brown et Hardner, 2000). En d'autres termes, la taille de l'échantillon permettant d'obtenir 95 pour cent des allèles peut varier de 30 à 60 plantes, selon le système de reproduction de l'espèce visée. En pratique, des quantités adéquates de semences doivent être collectées pour la distribution afin d'éviter des régénérations fréquentes. Cependant, il faut reconnaître que cet objectif n'est pas toujours atteint puisqu'il dépend de la disponibilité des semences.

En cas de don de semences (par une société semencière, un programme de recherche ou une banque de gènes), la classification taxonomique, ainsi que le nom et le numéro d'identification du donateur, doivent compléter les données d'identification disponibles. On doit s'enquérir auprès du donateur de la manière dont le matériel génétique reçu a été entretenu, notamment du pedigree ou de la lignée, ainsi que de la chaîne de responsabilité, si possible. On doit assigner aux semences un numéro d'identification



unique (temporaire ou définitif, selon la pratique en vigueur dans la banque de gènes) qui les accompagne en permanence, les lie aux données d'identification et à toute autre information collectée, et garantit l'authenticité de l'échantillon. Lorsque la situation le permet, il convient de prélever un spécimen d'herbier dans la même population que les échantillons, en précisant la méthode et la raison de l'acquisition.

Circonstances particulières

La collecte doit impérativement respecter les dispositions légales, en particulier si le matériel génétique est destiné à quitter le pays d'origine.

Lorsque les collections contiennent une proportion importante (plus de 10 pour cent) de semences immatures ou de fruits, des mesures doivent être prises pour favoriser la maturation post-récolte. On peut généralement y parvenir en entreposant le matériel dans des locaux bien ventilés, à température ambiante et à l'abri de la pluie. Les améliorations visibles en termes de maturité doivent être suivies et le matériel doit être transféré dans un lieu où les conditions de séchage sont contrôlées dès que l'on considère que les semences collectées sont plus mures.

Des exceptions relatives aux normes mentionnées plus haut (concernant la taille des échantillons, par exemple) devront être faites pour les espèces sauvages et rares dont les semences ne sont pas nécessairement disponibles dans l'état idéal ou en quantité optimale.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Alercia, A., Diulgheroff, S. et Mackay, M. 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors* (MCPD V.2). Rome, FAO et Bioversity International (disponible à l'adresse suivante: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).

Brown, A.H.D. et Hardner, C.M. 2000. Sampling the gene pools of forest trees for *ex situ* conservation. Dans A. Young, D. Boshier et T. Boyle. *Forest conservation genetics. Principles and practice*, pp.185-196. CSIRO et CABI.

Engels, J.M.M. et Visser, L., éd. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.

ENSCONET (Réseau européen de conservation de graines indigènes). 2009. *Manuel de collecte de graines pour les espèces sauvages* (disponible à l'adresse suivante: <http://ensconet.maich.gr/>).

Eymann, J., Degreef, J., Häuser, C., Monje, J.C., Samyn, Y. et VandenSpiegel, D., éd. 2010. *Manual on Field Recording Techniques and Protocols for All Taxa Biodiversity Inventories and Monitoring*, Vol. 8. (disponible à l'adresse suivante: <http://www.abctaxa.be/volumes/volume-8-manual-atbi>).

FAO/IPGRI. 1994. *Genebank standards*. Rome, FAO et IPGRI (disponible à l'adresse suivante: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/015/aj680e.pdf>).

Guarino, L., Rao R.V. et Reid, R., éd. 1995. *Collecting plant genetic diversity. Technical guidelines*. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International.

Guerrant, E.O., Havens, K. et Maunder, M., éd. 2004. *Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild*. Washington, DC, Island Press.

Lockwood, D.R., Richards, C.M. et Volk, G.M. 2007. Probabilistic models for collecting genetic diversity: comparisons, caveats and limitations. *Crop Science*, 47: 859-866.

Marshall, D.R. et Brown, A.H.D. 1975. Optimum sampling strategies in genetic resources conservation, pp. 53-80. Dans O.H. Frankel et J.G. Hawkes, éd. *Crop genetic resources for today and tomorrow*. Cambridge, Royaume-Uni, Cambridge University Press.

Probert, R., Adams, J., Coneybeer, J., Crawford, A. et Hay, F. 2007. Seed quality for conservation is critically affected by pre-storage factors. *Australian Journal of Botany*, 55: 326-335.

Probert, R.J. 2003. Seed viability under ambient conditions and the importance of drying. Dans R.D. Smith, J.B. Dickie, S.H. Linington, H.W. Pritchard et R.J. Probert, éd. *Seed conservation: turning science into practice*, pp. 337-365. Kew, Royaume-Uni, Royal Botanic Gardens.

Royal Botanic Gardens, Kew. *Millennium Seed Bank technical information sheet 04: post-harvest handling of seed collections*. Kew, Royaume-Uni (disponible à l'adresse suivante: <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/04-Post%20harvest%20handling.pdf>).

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base (disponible à l'adresse suivante: <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org>).

Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W. et Probert, R.J., éd. 2003. *Seed conservation: turning science into practice*. Kew, Royaume-Uni, Royal Botanic Gardens (disponible à l'adresse suivante: <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/sctsip.htm>).

Upadhyaya, H.D. et Gowda, C.L.L. 2009. *Managing and enhancing the use of germplasm -strategies and methodologies*. Technical Manual No. 10, Hyderabad, Inde, ICRISAT.

4.2 Normes relatives au séchage et à l'entreposage

Normes

- 4.2.1 Tous les échantillons de semences doivent être séchés jusqu'au degré d'humidité d'équilibre dans un environnement contrôlé à 5-20 °C et 10-25 pour cent d'humidité relative, selon l'espèce.
- 4.2.2 Après le séchage, tous les échantillons doivent être placés dans un récipient hermétique en vue de leur entreposage à long terme. Lorsqu'il est nécessaire d'accéder fréquemment aux semences ou que les collections risquent de s'épuiser avant la date à laquelle il est prévu qu'elles ne soient plus viables, il est possible d'entreposer les semences dans des récipients non hermétiques.
- 4.2.3 Les échantillons les plus originaux et les doublons de sécurité doivent être maintenus dans des conditions permettant de les entreposer sur le long terme (collections de base) à une température de -18 °C ± 3 °C et à une humidité relative de 15 pour cent ± trois pour cent.
- 4.2.4 Pour le stockage à moyen terme (collection active), les échantillons doivent être réfrigérés à 5-10 °C et à une humidité relative de 15 pour cent ± trois pour cent.

Informations générales

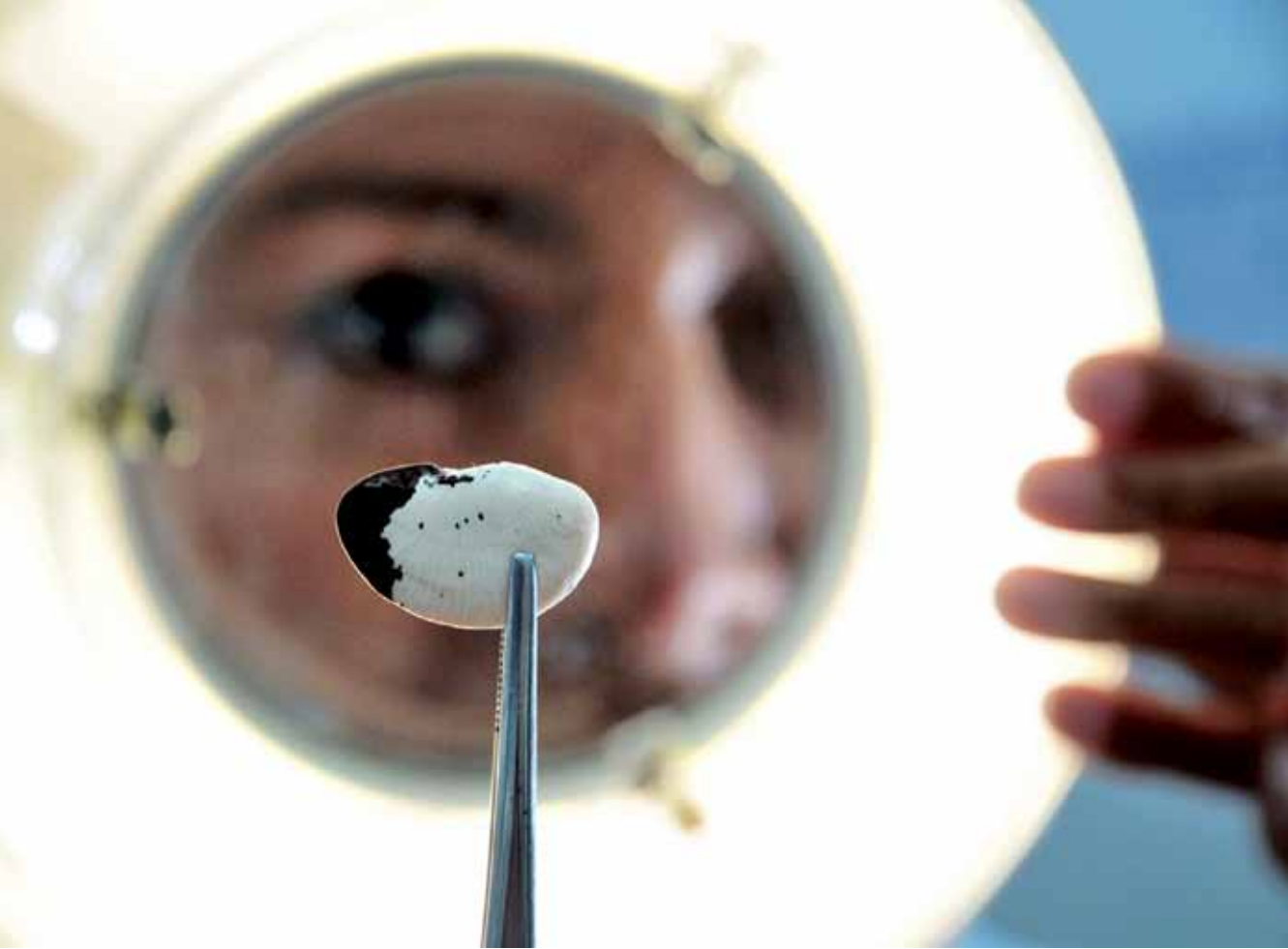
La préservation de la viabilité des semences est l'une des missions cruciales des banques de gènes, qui garantit que le matériel génétique est à la disposition des utilisateurs et qu'il est représentatif, du point de vue génétique, de la population dont il est issu (c'est-à-dire l'échantillon le plus original). L'un des objectifs essentiels des normes relatives au séchage et à l'entreposage des semences consiste à réduire la fréquence de régénération de l'échantillon le plus original en maximisant la longévité des semences et en réduisant ainsi le coût de la conservation en banque de gènes et les risques d'érosion génétique.

À cet effet, tous les échantillons les plus originaux ainsi que les doublons de sécurité de la collection doivent être entreposés durablement (voir les normes relatives à la duplication de sécurité). En outre, les normes concernant l'entreposage s'avèrent nécessaires lorsque l'objectif est de conserver des semences à moyen ou court terme afin de les maintenir en vie suffisamment longtemps pour les distribuer aux utilisateurs et évaluer le matériel génétique. En pareil cas, les normes n'ont nul besoin d'être aussi rigoureuses que pour la conservation à long terme.

Avant l'entreposage, les échantillons doivent être séchés jusqu'au degré d'humidité approprié. On peut avoir recours à diverses méthodes, dont la plus courante consiste à utiliser un produit dessiccatif ou une chambre de séchage déshumidifiée. Le choix de la méthode dépend de l'équipement disponible, du nombre et de la taille des échantillons à sécher, des conditions climatiques locales et des coûts. Cependant, le séchage ne peut accroître la longévité que dans une certaine mesure. À un degré d'humidité particulier, la longévité maximale pour une température d'entreposage donnée est atteinte et le fait de continuer à sécher les semences n'améliorera pas davantage leur longévité. Pour tirer le meilleur parti de la réfrigération ou de la congélation lors de l'entreposage, il est recommandé aux banques de gènes de sécher les semences jusqu'au degré d'humidité critique. On peut opter pour différentes combinaisons d'HR et de température lors du séchage, sachant qu'il est possible d'accélérer ce processus en augmentant la température mais que le potentiel de vieillissement physiologique se réduit lorsque l'on abaisse la température.

Les conditions de stockage à long terme recommandées plus haut doivent garantir la bonne qualité des semences pendant une longue durée, qui dépend de l'espèce concernée. Les conditions d'entreposage à moyen terme, en revanche, sont adaptées à une durée de 30 ans et nécessitent généralement une réfrigération. L'entreposage à court terme doit permettre de disposer de semences de bonne qualité pendant au moins huit ans. Les semences peuvent être maintenues à température ambiante (à condition que celle-ci soit aussi fraîche et stable que possible, et ne dépasse pas 25 °C) pour certaines des espèces présentant une grande longévité si l'humidité est contrôlée conformément à la Norme 4.2.2. Précisons que la longévité des semences matures de bonne qualité peut varier d'une espèce à l'autre, voire d'un lot à l'autre au sein d'une même espèce (Probert *et al.*, 2009; Nagel et Börner, 2010; Walters *et al.*, 2005). En raison de cette variation, particulièrement importante lorsque les semences sont récoltées à des degrés de maturité différents, le conservateur de la banque de gènes doit se montrer vigilant quant à la viabilité (voir les normes relatives aux essais de viabilité).

Puisque le degré d'humidité d'équilibre des semences est fonction de leur teneur en huile, la meilleure mesure correspondant à la norme relative au séchage est l'humidité relative à l'équilibre (HRE). Cette constante est déterminée par l'HR et la température de l'environnement de séchage. Cependant, il convient de noter que l'HRE des semences conservées dans des récipients fermés diminuera ou augmentera selon que la température d'entreposage est inférieure ou supérieure à la température de séchage.



Aspects techniques

La longévité des semences est déterminée par les interactions entre des facteurs biologiques intrinsèques et la qualité et l'homogénéité de l'environnement d'entreposage, à savoir la température et le degré d'humidité de la semence (HRE), mais elle dépend également de l'espèce. Il est établi que la longévité des semences s'accroît, dans une certaine mesure, lorsque leur degré d'humidité et la température d'entreposage baissent (Ellis et Roberts, 1980; Harrington, 1972). Des études ont démontré que le fait de sécher des semences au-delà d'un certain degré n'apportait pas ou peu de bénéfice supplémentaire en termes de longévité (Ellis *et al.*, 1985; Ellis et Hong, 2006) et pouvait même accélérer le vieillissement des semences (Vertucci et Roos, 1990; Walters, 1998). Les normes relatives à l'entreposage, telles qu'elles sont présentées, ont vocation à garantir que les semences sont conservées au degré d'humidité optimal. Cependant, il a été prouvé que le fait de réduire la température d'entreposage accroissait le degré d'humidité optimal des semences (Walters et Engels, 1998; Ellis et Hong, 2006). Il peut donc exister un risque de trop sécher les semences. *A contrario*, certaines informations indiquent que des semences ont pu être entreposées sur le long terme dans des conditions de séchage

extrême (Pérez- García *et al.*, 2009). Néanmoins, des incertitudes demeurent et des recherches plus approfondies sont nécessaires (Ellis et Hong, 2006; Vertucci et Roos, 1990; Walters, 1998).

Les conditions de séchage qui permettent d'atteindre le degré d'humidité critique correspondant à la température d'entreposage voulue doivent être déterminées en utilisant les isothermes d'hydosorption. Ces équations mettent en évidence la relation entre la quantité d'eau présente dans les semences, généralement exprimée en pourcentage de leur poids total, et leur HR. Pour une espèce donnée, il pourrait y avoir plusieurs combinaisons valables entre l'HR et la température de séchage. Les relations isothermes, fondées sur la teneur en huile, sont disponibles en ligne sur le site de la SID de Kew (voir les références). Les opérateurs des banques de gènes doivent bien comprendre la relation entre l'HR et la température d'entreposage pour être en mesure de décider de la combinaison la mieux adaptée à l'environnement de séchage des semences.

Dès que les semences ont atteint le degré d'humidité souhaité, elles doivent être emballées et entreposées. Après le séchage, l'humidité des semences doit être maintenue grâce à des récipients résistants à l'humidité. Différents types de récipients peuvent être utilisés, notamment en verre, en étain et en plastique, ainsi que du papier d'aluminium, chacun présentant des avantages et des inconvénients (Gómez-Campo, 2006). Par exemple, on considère que les récipients en verre peuvent accumuler de l'humidité et que les sacs en plastique aluminisés sont beaucoup plus adaptés, à condition qu'ils puissent contenir les semences. Dans tous les cas, des récipients en verre suffisamment épais pour ne pas se briser ou des emballages composés notamment d'une feuille de métal d'une épaisseur suffisante permettront de maintenir le degré d'humidité désiré jusqu'à 40 ans, selon l'HR ambiante et l'étanchéité de la fermeture. La banque de gènes allemande, par exemple, utilise du papier d'aluminium multicouches de 11 μm d'épaisseur, tandis que les échantillons conservés à Svalbard sont stockés dans des feuilles d'aluminium multicouches de 20 μm . Le degré d'humidité des semences ou le degré d'humidité à l'équilibre doit être mesuré périodiquement pendant la période d'entreposage pour s'assurer qu'il ne fluctue pas.

La température d'entreposage détermine la longévité maximale qu'un échantillon peut atteindre et la stabilité de l'environnement est essentielle pour préserver la viabilité des semences. Cependant, les données concernant l'entreposage à long terme à basse température sont limitées. Par le passé, il a été recommandé de maintenir une température de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ car c'est la valeur la plus basse que puisse atteindre un compresseur de congélateur standard à un étage. On doit s'efforcer de maintenir les températures d'entreposage dans une fourchette de $\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ par rapport à la valeur fixée et de limiter à moins d'une semaine par an la durée totale des fluctuations de plus grande ampleur. Les banques de gènes doivent enregistrer les écarts de température ainsi que les périodes pendant lesquelles les accessions sont extraites de l'environnement d'entreposage. Pour la conservation à court terme, les semences doivent être séchées et entreposées à la même température. Par exemple, si la température ambiante est de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, les semences doivent être séchées à cette température.

Circonstances particulières

Les semences destinées à être entreposées à long terme doivent être extraites le plus rarement possible et uniquement lorsque les échantillons conservés à moyen terme sont épuisés. On ne peut obtenir les conditions de stockage désirées lorsque le contrôle de l'environnement mécanique est défaillant ou que les semences sont sorties à plusieurs reprises de l'environnement d'entreposage contrôlé. Des générateurs de secours et une réserve de combustible suffisante doivent être disponibles sur le site.

Aucun récipient n'est totalement étanche et l'humidité des semences finira par rattraper celle de la chambre forte d'entreposage. Ce processus est plus rapide lorsqu'il s'agit de récipients fabriqués à partir de plastique isotherme ou bien si des récipients en verre ou multicouches ont été mal fermés ou présentent des défauts. Il arrive que des semences doivent être séchées de nouveau de temps en temps, et il convient de remplacer les récipients ou les joints d'étanchéité tous les 20 à 40 ans.

Si l'on utilise des récipients translucides, des sachets perforés en plastique transparent, remplis de gel de silice amené à température ambiante et contenant un indicateur coloré, peuvent servir à évaluer la performance du récipient pendant l'entreposage à long terme. Le changement de couleur du gel (stocké au milieu des semences) mettra en évidence des infiltrations d'humidité si le récipient n'est pas correctement fermé. Les semences orthodoxes présentant une longévité peu élevée ou les semences de mauvaise qualité dès l'origine risquent de se détériorer plus rapidement et de ne pas respecter les normes de stockage à long terme, à moins d'avoir recours à la cryogénie.



BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

- Dickie, J.B., Ellis, R.H., Kraak, H.L., Ryder, K. et Tompsett, P.B. 1990. Temperature and seed storage longevity. *Annals of Botany*, 65: 197-204.
- Ellis, R.H. et Hong, T.D. 2006. Temperature sensitivity of the low-moisture-content limit to negative seed longevity-moisture content relationships in hermetic storage. *Annals of Botany*, 97: 785-91.
- Ellis, R.H. et Roberts, E.H. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45: 13-30.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. et Roberts, E.H. 1985. Sequential germination test plans and summary of preferred germination test procedures. *Handbook of seed technology for genebanks. Vol I. Principles and methodology*. Chapitre 15, pp. 179-206. Rome, IBPGR.
- Engels, J.M.M. et Visser, L., éd. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.
- Gómez-Campo, C. 2006. Erosion of genetic resources within seedbanks: the role of seed containers. *Seed Science Research*, 16: 291-294.
- Harrington, J.F. 1972. Seed storage longevity. Dans T.T. Kozłowski, éd. *Seed biology*, Vol. III. pp. 145-245. New York, États-Unis, Academic Press.
- Nagel, M. et Börner, A. 2010. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Sci. Res.*, 20: 1-12.
- Pérez-García, F., Gómez-Campo, C. et Ellis, R.H. 2009. Successful long-term ultra dry storage of seed of 15 species of Brassicaceae in a genebank: variation in ability to germinate over 40 years and dormancy. *Seed Science and Technology*, 37(3): 640-649.
- Probert, R.J., Daws, M.I. et Hay, F.R. 2009. Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: a comparative study on 195 species. *Annals of Botany*, 104 (1): 57-69.
- Royal Botanic Gardens, Kew. Seed Information Database (SID) [Base de données d'informations sur les semences]. Predict seed viability module (disponible à l'adresse suivante: <http://data.kew.org/sid/viability/percent1.jsp>). Convert RH to water content (disponible à l'adresse suivante: <http://data.kew.org/sid/viability/mc1.jsp>). Convert water content to RH (disponible à l'adresse suivante: <http://data.kew.org/sid/viability/rh.jsp>). Kew, Royaume-Uni.
- Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W. et Probert, R.J., éd. 2003. *Seed conservation: turning science into practice*. Chapitres 17 et 24. Kew, Royaume-Uni, Royal Botanic Gardens (disponible à l'adresse suivante: <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/sctsip.htm>).
- Vertucci, C.W. et Roos, E.E. 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiol.*, 94:1019-1023.
- Walters, C. 1998. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci. Res.*, 8: 223-244.
- Walters, C. 2007. Materials used for seed storage containers. *Seed Sci. Res.*, 17: 233-242.
- Walters, C. et Engels, J. 1998. The effect of storing seeds under extremely dry conditions. *Seed Sci. Res.*, 8. Supplement 1, pp. 3-8.
- Walters, C., Wheeler, L.J. et Grotenhuis, J. 2005. Longevity of seeds stored in a genebank: species characteristics. *Seed Science Research*, 15: 1-20.
- Walters, C., Wheeler, L.J. et Stanwood, P.C. 2004. Longevity of cryogenically-stored seeds. *Cryobiology*, 48: 229-244.

4.3 Normes relatives aux essais de viabilité

Normes

- 4.3.1 Le test de viabilité initiale des semences doit être réalisé après nettoyage et séchage de l'accession ou, au plus tard, dans les 12 mois qui suivent sa réception par la banque de gènes.
- 4.3.2 La valeur germinative initiale doit être supérieure à 85 pour cent pour la plupart des semences d'espèces cultivées. Pour certaines accessions et espèces sauvages ou forestières qui ne présentent pas en temps normal des niveaux de germination élevés, un pourcentage plus faible est acceptable.
- 4.3.3 Les intervalles séparant les essais de viabilité doivent être fixés à un tiers du délai au bout duquel on estime que la viabilité sera tombée à 85 pour cent¹ de la viabilité initiale ou plus bas, selon l'espèce et l'accession concernée, sans toutefois dépasser 40 ans. Si cette période de détérioration ne peut pas être évaluée et que les accessions sont destinées à être entreposées sur le long terme à -18 °C dans des récipients hermétiques, l'intervalle doit être de 10 ans pour les espèces dont on attend une longévité importante et de cinq ans pour les autres.
- 4.3.4 Le seuil de viabilité pour la régénération ou d'autres décisions de gestion comme la réalisation d'une nouvelle collecte doit être fixé à 85 pour cent de la viabilité initiale ou plus bas, selon l'espèce et l'accession concernée.

¹ Le moment de la perte de viabilité peut être prévu pour une large variété d'espèces cultivées grâce à une application en ligne fondée sur les équations de viabilité d'Ellis et Roberts (voir <http://data.kew.org/sid/viability/>).

Informations générales

De bonnes conditions d'entreposage permettent de préserver la viabilité du matériel génétique mais ne l'empêchent pas de baisser. Les banques de gènes s'intéressent à la viabilité du point de vue du potentiel germinatif pour la conservation, ainsi que des essais de germination en vue de créer une population qui se régénère. Il est donc nécessaire d'évaluer périodiquement la viabilité. Le test de viabilité initiale doit être réalisé le plus tôt possible, avant que les semences ne soient emballées et stockées; les essais suivants sont effectués à intervalles réguliers pendant l'entreposage. Si, pour des raisons pratiques liées au flux de travail et à l'efficacité, le test de viabilité initiale ne peut être pratiqué préalablement à l'entreposage, il doit se dérouler dès que possible et au plus tard dans les 12 mois qui suivent la réception. Ce cas peut se présenter dans des banques de gènes abritant plusieurs espèces car les régimes de germination sont extrêmement variés et les échantillons d'une même espèce sont testés tous en même temps, une fois par an.

L'objectif de ces essais est de détecter les pertes de viabilité pendant l'entreposage à long terme, avant que celle-ci ne tombe au-dessous du seuil de régénération. Le principe directeur fondamental est la gestion active de la collection. Des tests trop fréquents engendreront un gaspillage inutile de semences et de ressources. D'autre part, une chute importante de la viabilité peut échapper à la détection si les essais sont retardés ou irréguliers. Le vieillissement avancé peut entraîner des transformations génétiques (sélection aléatoire ou ciblée), la fixation de mutations non réparées, voire la disparition totale de l'échantillon.

Lorsque l'on prévoit que la viabilité tombera à 85 pour cent avant le prochain essai programmé, celui-ci doit être avancé ou l'échantillon doit être directement affecté à la régénération.

Le risque d'érosion génétique lors du stockage est inférieur pour les échantillons homogènes et la baisse de la valeur germinative au-dessous de 85 pour cent est acceptable tant que l'établissement des plantes au moment de la régénération demeure suffisant. Pour ceux qui proviennent d'espèces sauvages ou de variétés locales, la norme de 85 pour cent doit être respectée. Les semences fraîchement renouvelées de certains échantillons spécifiques, variétés locales, espèces sauvages ou forestières atteignent rarement une viabilité de 85 pour cent. Le conservateur peut alors fixer le seuil de viabilité à une valeur inférieure pour des espèces données, par exemple, 70 pour cent ou moins.

Des modèles permettant de prévoir la longévité des semences conservées à température ambiante, réfrigérées ou congelées sont disponibles pour diverses espèces agricoles. Le personnel des banques de gènes doit utiliser les outils prédictifs mis à sa disposition et étudiés pour des espèces particulières et tenir compte des conditions de stockage pour anticiper la durée pendant laquelle les semences vont conserver une viabilité élevée et pour orienter les autres opérations des banques de gènes, comme les essais de viabilité et la détermination des fréquences de régénération (voir les normes relatives aux essais de viabilité et à la régénération). Les prévisions de longévité fondées sur les caractéristiques générales de l'espèce doivent être considérées comme des estimations présentant des intervalles de confiance larges. Les banques de gènes sont encouragées à générer et à communiquer de nouvelles informations décrivant les réponses des espèces aux conditions d'entreposage, et à les actualiser.

Aspects techniques

Les intervalles séparant les essais de viabilité doivent être ajustés en fonction des données issues des essais de germination. Dès que l'on détecte une baisse significative, il faut les réduire pour affiner la prévision afin de respecter la norme de viabilité.

Lorsque la viabilité initiale est très élevée (supérieure à 98 pour cent), elle peut connaître une chute significative d'un point de vue statistique, et ce bien avant la date à laquelle elle aurait dû tomber à 85 pour cent, alors que la germination est encore bien supérieure à 90 pour cent. À ce stade, il est probablement prématuré et inutile d'opter pour une régénération ou une nouvelle collecte. Cependant, les intervalles entre les essais suivants doivent être raccourcis (par exemple, cinq ans au lieu de dix) afin de suivre plus précisément la baisse.

Les accessions de moindre qualité peuvent être extrêmement proches du point de basculement si la viabilité chute relativement rapidement, ce qui est inquiétant. Elles doivent être gérées avec soin et, dans un premier temps, les essais de viabilité doivent être pratiqués tous les trois à cinq ans pendant la période d'entreposage. Des tests peu fréquents (tous les 10 ans, par exemple) ne permettent pas toujours de détecter une détérioration rapide et le seuil de viabilité de 85 pour cent peut être manqué, ce qui a des conséquences négatives sur l'intégrité génétique de la collection. À cet égard, l'utilisation de modèles statistiques peut aider à prévoir le point de basculement et un calendrier adapté pour une régénération convenable.

Les essais de viabilité doivent fournir au gestionnaire une approximation de la viabilité de l'échantillon. L'objectif doit être de détecter des différences de + 5 pour cent environ, et non de + 0,1 pour cent. La taille des échantillons destinés aux essais de viabilité sera inévitablement dépendant de la taille de l'accession, mais doit être maximisée afin d'obtenir une certitude statistique. Cependant, la taille de l'échantillon doit être réduite autant que possible pour éviter de gaspiller des semences. Les semences conservées dans une banque de gènes constituent une ressource précieuse et ne doivent pas être gaspillées.

Il est difficile d'établir une norme stricte relative au nombre de semences destinées aux essais de germination dans les banques de gènes, cependant, les protocoles standards tels que décrits par l'Association internationale d'essais de semences (ISTA) sont souvent largement utilisés. En règle générale, on recommande d'utiliser 200 semences pour les essais de germination initiale (ISTA, 2008) – suivis de tests séquentiels, si la germination initiale est inférieure à 90 pour cent (Ellis *et al.*, 1985) pendant l'entreposage. Cependant, dans le cas où l'on ne dispose pas des quantités suffisantes, des échantillons de 100 semences ou moins peuvent suffire et doivent être répliqués. L'essai de germination fournit un indice de viabilité et même de petits échantillons peuvent apporter au gestionnaire des informations utiles. En pratique, la taille réelle de l'échantillon destiné à la germination dépendra de celle de l'accession, qui est généralement très limitée dans les banques de gènes (idéalement, la taille minimale recommandée est de 1 500 semences pour les espèces autogames et de 3 000 pour celles à pollinisation croisée). Il est important de

réduire autant que possible l'utilisation des précieuses semences nécessaires aux essais de germination. Pour les accessions de petite taille (comme c'est souvent le cas pour les espèces sauvages), des échantillons de 50 semences ou moins sont acceptables. Cependant, il faut avoir conscience que les taux de germination peuvent être plus élevés en-deçà du seuil. Le conservateur de la banque de gènes doit donc évaluer ce risque.

L'essai de germination doit toujours être préféré à d'autres méthodes comme le test au tétrazolium. Cependant, dans les circonstances où il est impossible de supprimer la dormance, d'autres types de tests peuvent être réalisés. Il est recommandé de mesurer la germination en deux occasions afin de déterminer quelles sont les semences qui germent lentement ou rapidement. Le nombre de semences qui germent de manière anormale doit être enregistré. Le ralentissement de la germination et l'accroissement du nombre de semences qui germent anormalement sont souvent des indicateurs précoces de détérioration.

On doit s'efforcer de faire germer toutes les semences viables d'une collection en réunissant les conditions optimales et en utilisant des traitements appropriés d'interruption de la dormance, si besoin est. À la fin de l'essai, les semences qui n'ont pas germé doivent être soumises à un test de recouplement pour déterminer si elles sont mortes ou en dormance. Les semences dont le tissu est ferme et frais sont susceptibles d'être en dormance et doivent donc être comptées comme des semences viables.

Toutes les données et informations obtenues à l'occasion des essais de viabilité doivent être enregistrées et entrées dans le système de documentation.

Circonstances particulières

Il est reconnu que le suivi de la viabilité est une activité coûteuse et que les banques de gènes souhaiteraient trouver des procédures permettant de réduire les coûts. Une telle procédure peut nécessiter de mesurer la qualité des semences dans un sous-échantillon d'accessions de la même espèce et récoltées la même année. Cette pratique peut mettre en évidence des tendances globales concernant l'effet de l'année de récolte sur la qualité des semences, mais ne prend pas en compte les interactions entre le génotype et l'année de récolte dont on sait qu'elles sont importantes pour la qualité des semences.

Lorsque les conditions de récolte et les degrés de maturité sont variables d'une accession à l'autre, la stratégie d'échantillonnage peut consister à former des sous-groupes. Une autre stratégie consisterait à procéder à de nouveaux tests sur les accessions qui présentaient les résultats de viabilité les plus faibles lors des tests initiaux. Les données obtenues doivent alerter rapidement sur la performance du lot dans son ensemble.

Le résultat du test de germination initiale pratiqué au moment de la récolte pour les espèces réputées à graine dure et les accessions que l'on trouve fréquemment dans certaines espèces de légumineuses fourragères et de plantes sauvages apparentées aux espèces cultivées ne dépasse pas toujours 45 pour cent. Cette valeur peut augmenter jusqu'à 95 pour cent ou plus au bout de 10-15 ans et se maintenir à ce niveau pendant

de longues périodes. Si la germination initiale est inférieure à 90 pour cent, il faut alors régénérer les semences ou en collecter de nouvelles à la première baisse significative qui sera détectée à l'issue d'un test statistique approprié.

Cependant, il est reconnu qu'une variation intraspécifique au sein des accessions a été observée pour une gamme très large d'accessions. Les stratégies décrites plus haut impliquent donc des risques qui doivent être pris en considération. Les essais de viabilité sont généralement plus problématiques pour les accessions des espèces sauvages que pour celles des espèces cultivées. La dormance des semences est susceptible d'être beaucoup plus répandue et la taille des accessions est souvent petite. Les essais de germination doivent donc être réalisés sur des échantillons dont la taille minimale est plus petite car cela affectera inévitablement la capacité à détecter le début de la détérioration des semences.

Pour ce qui est du test de viabilité initiale, il est également possible que les banques de gènes reçoivent de petites quantités de semences. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de tester la viabilité initiale des semences puisque les échantillons sont destinés à la régénération. Cependant, la viabilité des semences régénérées doit être testée avant l'entreposage.

La fourchette de longévité intrinsèque est également plus large chez les espèces sauvages. Les espèces de la Méditerranée ou d'habitats tropicaux arides présentent généralement une longévité très importante et, à l'inverse, certaines espèces des régions froides et tempérées sont réputées comme ayant une longévité plus courte. Pour ces dernières, il faut envisager des intervalles de test ne dépassant pas trois ans ainsi qu'une duplication en cryostockage à titre de mesure conservatoire. Si les conditions d'entreposage ne sont pas réunies (comme en cas de coupure d'électricité prolongée lorsque les semences sont stockées dans des unités de réfrigération), cela aura un impact négatif sur la viabilité qui dépendra de l'espèce, de la durée de la perturbation et des conditions prévalant à ce moment-là. En pareil cas, un plan de gestion des catastrophes doit être déclenché. Par exemple, il peut être nécessaire de tester certains échantillons représentatifs immédiatement après le retour aux conditions de stockage adaptées.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

AOSA (Association of Official Seed Analysts). 2005. Page 113 dans Capashew, éd. *Rules for testing seeds*, 4-0, 4-11. Las Cruces, New Mexico, États-Unis.

Dickie, J.B., Ellis, R.H., Kraak, H.L., Ryder, K. et Tompsett, P.B. 1990. Temperature and seed storage longevity. *Annals of Botany*, 65: 197-204.

Ellis, R.H. et Roberts, E.H. 1980. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany*, 45: 13-30.

Ellis, R.H., Hong, T.D. et Roberts, E.H. 1985. Sequential germination test plans and summary of preferred germination test procedures. *Handbook of seed technology for genebanks*. Vol I. Principles and methodology. Chapitre 15, pp. 179-206. Rome, IBPGR.

Engels, J.M.M. et Visser, L., éd. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.

ENSCONET. 2009. Manuels (disponibles à l'adresse suivante: <http://ensconet.maich.gr/Download.htm>).

Harrington, J.F. 1972. Seed storage longevity. Dans T.T. Kozłowski, éd. *Seed biology*, Vol III, pp. 145-245, New York, États-Unis, Academic Press.

ISTA (Association internationale d'essais de semences). 2008. *International rules for seed testing*. Bassersdorf, Suisse.

Nagel, M. et Börner, A. 2010. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research*, 20: 1-12.

Nagel, M., Rehman Arif, M.A., Rosenhauer, M. et Börner, A. 2010. *Longevity of seeds - intraspecific differences in the Gatersleben genebank collections*. Tagungsband der 60. Jahrestagung der Vereinigung der Pflanzenzüchter und Saatgutkaufleute Österreichs 2009, 179-181.

Royal Botanical Gardens, Kew. Seed information database (SID). Kew, Royaume-Uni (disponible à l'adresse suivante: <http://data.kew.org/sid/>).

Smith, R.D., Dickie, J.B., Linington, S.H., Pritchard, H.W. et Probert, R.J., éd. 2003. *Seed conservation: turning science into practice*. Chapitres 17 et 24. Kew, Royaume-Uni, Royal Botanic Gardens (disponible à l'adresse suivante: <http://www.kew.org/msbp/scitech/publications/sctsisip.htm>).



4.4 Normes relatives à la régénération

Normes

- 4.4.1 Il convient de procéder à une régénération lorsque la viabilité chute sous le seuil de 85 pour cent de sa valeur initiale ou lorsque la quantité de semences restante ne suffit pas à réaliser trois ensemencements d'une population représentative de l'accession. L'échantillon le plus original doit servir à régénérer ces accessions.
- 4.4.2 La régénération doit être réalisée de manière à préserver l'intégrité génétique d'une accession donnée. Des mesures de régénération spécifiques à chaque espèce doivent être prises pour prévenir les mélanges et la contamination génétique imputables à la dispersion de gènes par le biais du pollen issu d'autres accessions de la même espèce ou d'autres espèces situées autour des champs de régénération.
- 4.4.3 Si possible, au moins 50 semences de l'échantillon original et des échantillons les plus originaux suivants sont archivées en vue d'un entreposage à long terme à des fins de référence.

Informations générales

La régénération est une opération essentielle, qui relève pleinement de la responsabilité de toute banque de gènes conservant des semences orthodoxes. Ce processus conduit à une augmentation du nombre de semences stockées (aussi appelée « multiplication ») dans la banque de gènes et/ou à un accroissement de la viabilité des semences égal ou supérieur à un niveau minimal convenu, que l'on qualifie de seuil de régénération. On régénère une accession lorsqu'elle ne contient pas suffisamment de semences pour un stockage à long terme (par exemple, 1 500 graines pour une espèce autogame et 3 000 pour une

espèce à fécondation croisée) ou lorsque sa viabilité a chuté au-dessous du seuil minimal établi (c'est-à-dire au-dessous de 85 pour cent de la viabilité initiale). On doit également procéder à une régénération lorsque le nombre de semences s'est réduit en raison de l'utilisation fréquente de l'accession. Si une accession est rarement demandée et que sa viabilité est acceptable, le nombre de semences peut alors être inférieur à 1 000 avant la régénération. À chaque régénération, en particulier pour les espèces à fécondation croisée, l'échantillon risque de perdre des allèles rares ou de voir son profil génétique transformé. La fréquence de régénération doit donc être réduite autant que faire se peut. Il n'est pas nécessaire de disposer d'un nombre élevé de semences pour les accessions ou espèces rarement demandées.

La régénération pouvant aisément modifier la composition génétique d'une accession (et, par là, son intégrité génétique), il faut prendre toutes les précautions possibles. Par conséquent, les opérateurs de banques de gènes devront trouver un équilibre subtil entre la perte éventuelle de viabilité et le fait de limiter la régénération, qui peut avoir une incidence sur l'intégrité génétique de l'accession. Une gestion active des collections contribue grandement à déterminer le moment le plus approprié pour la régénération.

La régénération doit avoir le moins d'impact possible sur l'intégrité génétique de l'accession en question. Cela signifie qu'outre les considérations liées à l'échantillonnage de l'accession concernée (voir le paragraphe ci-après), il convient de porter l'attention nécessaire à l'environnement dans lequel l'activité sera réalisée afin d'éviter toute pression de sélection importante sur l'accession. L'environnement de régénération doit être aussi semblable que possible au site de collecte, en particulier lorsque la régénération concerne une population recueillie dans la nature, afin de réduire au maximum la dérive génétique et d'obtenir la meilleure qualité de semences possible. Il est souvent difficile de récolter en quantité suffisante des semences de plantes sauvages apparentées aux espèces cultivées car les graines ou les plantes sont moins nombreuses que chez d'autres espèces, ou en raison des mécanismes de dissémination des plantes comme l'égrenage spontané. Il est donc nécessaire de veiller à l'utilisation de pratiques techniques appropriées pour recueillir autant de semences que possible (par exemple, en utilisant des filets pour capturer les semences tombées). En outre, plusieurs cycles de régénération peuvent être nécessaires pour s'assurer que l'on conserve suffisamment de semences. Pour la régénération, il convient de créer des conditions environnementales favorables à la production de semences et de réduire autant que possible la concurrence entre les plantes. Les conditions prévalant sur les sites de collecte présentent souvent au moins un aspect qui empêche de maximiser la production de semences. Il faut donc trouver un réel compromis entre des conditions totalement favorables et les signaux particuliers (qu'ils soient photopériodiques, nutritionnels ou climatiques) qui relèvent de l'adaptation locale de chaque accession. Cela fait partie de l'art du conservateur. Si le site de la banque de gènes n'offre pas les conditions favorables au niveau local, le conservateur doit examiner les possibilités de régénérer l'accession dans un environnement adapté. La reproduction de l'environnement de collecte ne doit pas nécessairement être l'objectif du conservateur.

Pour préserver l'intégrité génétique des collections de banques de gènes pendant la régénération des semences, il est important que l'échantillonnage des accessions soit réalisé de manière efficace. Le nombre de semences à utiliser pour le processus de régénération doit être suffisant pour que celles-ci soient représentatives de la diversité génétique d'une accession et pour capturer au moins un allèle rare avec une certaine probabilité.

La méthodologie à utiliser pour la régénération peut varier d'une espèce à l'autre et dépend, entre autres facteurs, de la taille de la population, du système de reproduction et de l'efficacité de la pollinisation. Par conséquent, il est extrêmement important de collationner autant d'informations biologiques pertinentes que possible au sujet de l'espèce concernée. En outre, lorsque cela est possible et utile, il est recommandé de se servir du processus de régénération pour caractériser les accessions (voir les normes relatives à la caractérisation). Cependant, dans le cas des espèces à pollinisation croisée, il est souvent difficile de le faire pour des raisons logistiques.

Aspects techniques

Pour préserver l'intégrité génétique des accessions, il est recommandé d'utiliser des semences issues de l'échantillon le plus original aux fins de la régénération. Pour la multiplication, il est recommandé d'utiliser des semences provenant de la collection de travail pour un maximum de cinq cycles, sans revenir à l'échantillon le plus original (Engels et Visser, 2003).

Précisons que, dans les cas où la collection ou le don original est constitué d'un petit échantillon, il est nécessaire de régénérer immédiatement le matériel dès sa réception afin d'obtenir une quantité de semences permettant l'entreposage à long terme. Il est important de noter le numéro du cycle de régénération et d'entrer les informations dans le système de documentation. Il est recommandé à la banque de gènes receveuse de toujours mettre de côté des semences de l'échantillon initial à des fins de référence ultérieure. Même si ces semences originales perdent leur viabilité, elles peuvent permettre de confirmer la morphologie ou le génotype de nouvelles générations de l'accession concernée.

La taille de l'échantillon à utiliser pour la régénération doit refléter la composition génétique de l'accession. À cet effet, la taille effective de la population (N_e) est un paramètre clé qui aura une incidence sur le degré de dérive génétique associé à la régénération de l'accession. La taille effective minimale permettant de limiter la perte d'allèles peut être estimée pour chaque accession en se fondant sur la biologie de la pollinisation et les conditions de culture. Les meilleures pratiques de récolte doivent être utilisées pour éviter le mélange des semences pendant le semis, la récolte et le conditionnement. Les recherches menées par Johnson *et al.* (2002, 2004) sur la régénération des espèces pérennes allogames (par exemple les graminées) ont montré que 100 plantes est le nombre minimum nécessaire pour la préservation du pool génétique du taxon. Le principe de récolter des semences de 3 à 5 inflorescences pour chaque plante est recommandé.

Pour éviter la dispersion de gènes ou la contamination, il est extrêmement important d'utiliser des méthodes qui permettent d'isoler efficacement les parcelles des accessions d'espèces à pollinisation croisée qui doivent être régénérées. Cela s'applique également aux espèces autogames, selon l'environnement de régénération. Pour les espèces dépendantes de pollinisateurs spécifiques, des cages d'isolement et les pollinisateurs correspondants doivent être utilisés (Dulloo *et al.*, 2008). La contamination et la dérive génétique peuvent être évaluées grâce aux caractéristiques morphologiques et enzymatiques ou à d'autres caractéristiques distinctives qui peuvent servir de marqueurs (par exemple, la couleur des fleurs, des graines, etc.) ou grâce à des marqueurs moléculaires.

Les collections de référence (spécimens d'herbier, photographies et/ou descriptions des accessions originales) sont essentielles pour vérifier la conformité au type (Lehmann et Mansfeld, 1957). Il est nécessaire de procéder à des inspections minutieuses des semences obtenues et lors de la première régénération d'une nouvelle accession afin de collecter d'importantes informations de référence. Pour éviter les disparités de maturité entre les semences d'un échantillon, plusieurs récoltes doivent être réalisées pendant la saison de fructification.

Circonstances particulières

Le rôle du conservateur présentera toujours une dimension relative à la gestion des risques. Une solide connaissance biologique de l'espèce en question est un élément clé qui aide à prendre les meilleures décisions possibles pour la régénération dans des situations difficiles. Les facteurs comme la taille de l'échantillon, la distance entre les accessions et les autres formes d'isolement, le respect des seuils de perte de viabilité établis et les conditions de culture doivent tous être pris en compte comme il se doit lorsque l'on planifie une activité de régénération.

Au vu de cette complexité, il n'est pas utile de rechercher d'éventuelles circonstances particulières. En cas d'urgence, il serait judicieux de demander conseil à des experts et/ou de collaborer avec d'autres banques de gènes en mesure d'apporter leur aide.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Breese, E.L. 1989. *Regeneration and multiplication of germplasm resources in seed genebanks: the scientific background*. Rome, IBPGR.

Crossa, J. 1995. Sample size and effective population size in seed regeneration of monoecious species. Dans J.M.M. Engels et R. Rao, éd. *Regeneration of seed crops and their wild relatives*, pp. 140-143. Actes d'une réunion consultative, 4-7 décembre 1995. Hyderabad, Inde, ICRISAT, et Rome, IPGRI.

Dulloo, M.E., Hanson, J., Jorge, M.A. et Thormann, I. 2008. Regeneration guidelines: general guiding principles. Dans M.E. Dulloo, I. Thormann, M.A. Jorge et J. Hanson, éd. *Crop specific regeneration guidelines*. [CD-ROM], Rome, SGRP-CGIAR.

Engels, J.M.M. et Rao, R., éd. 1995. *Regeneration of seed crops and their wild relatives*, pp. 140-143. Actes d'une réunion consultative, 4-7 décembre 1995. Hyderabad, Inde, ICRISAT, et Rome, IPGRI.

Engels, J.M.M. et Visser, L., éd. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.

Johnson, R.C., Bradley, V.L. et Evans, M.A. 2002. Effective population size during grass germplasm seed regeneration. *Crop Science*, 42: 286-290.

Johnson, R.C., Bradley, V.L. et Evans, M.A. 2004. Inflorescence sampling improves effective population size of grasses. *Crop Science*, 44: 1450-1455.

Lawrence, L. 2002. A comprehensive collection and regeneration strategy for *ex situ* conservation. *Genetic resources and crop evolution*, 49(2): 199-209.

Lehmann, C.O. et Mansfeld, R. 1957. Zur Technik der Sortimentserhaltung. *Kulturpflanze*, 5: 108-138.

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. et Larinde, M. 2006. *Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes*. Manuels pour les banques de gènes No. 8. Rome, Bioversity International.

Sackville Hamilton, N.R. et Chorlton, K.H. 1997. *Regeneration of accessions in seed collections: a decision guide*. J. Engels, éd. Handbooks for Genebanks No. 5. Rome, IPGRI.

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base (disponible à l'adresse suivante: <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org>).

4.5 Normes relatives à la caractérisation

Normes

- 4.5.1 Environ 60 pour cent des accessions doivent être caractérisées dans les cinq à sept ans suivant leur acquisition ou pendant le premier cycle de régénération.
- 4.5.2 La caractérisation doit être fondée sur des formats de mesure standardisés et calibrés. Les données qui s’y rapportent s’appuient sur la liste de descripteurs convenue au niveau international et sont mises à la disposition du public.

Informations générales

La caractérisation est la description du matériel phylogénétique. Elle détermine l’expression des caractères hautement héréditaires – qui vont des aspects morphologiques, physiologiques et agronomiques aux protéines, huiles et marqueurs moléculaire contenus dans les semences.

La caractérisation peut être réalisée à n’importe quel stade du processus de conservation, tant que le nombre de semences est suffisant pour un échantillonnage. Il est essentiel que le matériel génétique conservé soit connu et décrit de façon aussi étendue que possible afin de garantir son utilisation maximale par les sélectionneurs. Par conséquent, la caractérisation doit être effectuée dès que possible pour ajouter de la valeur à la collection. Le recours à une série minimale de caractéristiques phénotypiques, physiologiques et qualitatives ainsi qu’à des descripteurs morphologiques et à des informations relatives au système de reproduction, comme celles publiées par Bioversity International, est utile pour la caractérisation. On peut aussi trouver des descripteurs pertinents dans les publications de l’Union internationale pour la protection des obtentions végétales (UPOV) et du Système national de gestion du matériel génétique végétal (NPGS) du Département de l’agriculture des États-Unis d’Amérique (USDA). L’application aux données de caractérisation de normes convenues au niveau international accroît leur utilité.

La caractérisation permettra de détecter la diversité inter- et intra-accession. Il peut être nécessaire de recourir à des stratégies appropriées pour assurer la préservation des allèles rares ou améliorer l'accès à des allèles donnés. Il est extrêmement important de conserver une trace des observations réalisées et des mesures effectuées.

Aspects techniques

La caractérisation est coûteuse et demande beaucoup de temps. On peut s'efforcer, dans la mesure du possible, de la combiner à la multiplication ou à la régénération. Les conservateurs doivent faire tout leur possible pour enregistrer les données de caractérisation. Il est néanmoins judicieux d'encourager l'utilisation de la réplication pour la caractérisation des traits hautement héréditaires.

Les caractéristiques et les traits des plantes cultivées sont définis par des experts et/ou les conservateurs en consultation avec les gestionnaires de banques de gènes. De nombreuses listes de descripteurs ont été élaborées, notamment par Bioversity International, et des séries minimales de descripteurs essentiels à l'utilisation du matériel génétique ont été établies pour plusieurs d'entre elles. En outre, des listes de descripteurs régionales et nationales, comme celle du NPGS, sont disponibles. L'enregistrement des données doit être confié à des professionnels qualifiés, qui doivent utiliser les formats calibrés et standardisés comme indiqué dans les listes de descripteurs convenues et publiées au niveau international. Les données doivent être validées par le conservateur et les documentalistes avant d'être téléchargées dans la base de données de la banque de gènes et mises à la disposition du public. Par ailleurs, il est reconnu que les collections de référence (spécimens d'herbier, semences, photographies) contribuent grandement à la vérification de la conformité au type.

Compte tenu des avancées des biotechnologies, la science des marqueurs moléculaires et la génomique sont de plus en plus utilisées en caractérisation (De Vicente *et al.*, 2004), en association avec les observations phénotypiques qui facilitent l'estimation du caractère unique d'une source de variation au sein d'une accession ou entre accessions. Les données génotypiques issues de la caractérisation du matériel génétique par le biais de techniques moléculaires présentent un avantage par rapport aux données phénotypiques. En effet, les variations détectées grâce aux données génotypiques sont largement dépourvues d'influences environnementales (Bretting et Widrechner, 1995). Cependant, l'utilisation de la technologie des marqueurs moléculaires reste un défi à relever pour certaines institutions. En effet, elle nécessite des installations de laboratoire et des capacités techniques avancées et peut être onéreuse (Karp *et al.*, 1997), en particulier dans les pays en voie de développement. Elle peut également nécessiter des outils moléculaires spécifiques au génome qui doivent être élaborés *de novo*, tels que les marqueurs de séquences répétées en tandem (SSR, *single sequence repeats*). De nombreux marqueurs et techniques sont disponibles (SSR, étiquettes de séquences exprimées-séquences répétées en tandem [EST-SSR, *expressed sequence tags-simple sequence repeats*], polymorphisme de longueur de fragments amplifiés [AFLP, *amplified fragment length polymorphisms*])

mais seuls les marqueurs bien établis et reproductibles tels que les SSR seront utilisés à des fins de caractérisation. Un large éventail d'amorces de marqueurs servant à la caractérisation a été élaboré pour de nombreuses cultures. Une série minimale de marqueurs essentiels a également été établie. Afin de s'assurer que les résultats des différents lots d'analyses sont comparables, quelques accessions de la banque de gènes doivent être incluses dans chaque lot en tant que référence. L'inclusion d'accessions de référence dans les caractérisations moléculaires contribue grandement à la comparaison des différentes banques de gènes.

Circonstances particulières

La fiabilité des données peut varier d'un collecteur à l'autre si ces derniers ne sont pas suffisamment formés ou expérimentés. Par conséquent, il est nécessaire que des techniciens qualifiés dans le domaine des ressources phytogénétiques soient présents pendant toute la durée du cycle de croissance afin d'enregistrer les données de caractérisation et de recueillir toutes les informations qui s'y rapportent. Il est également souhaitable de disposer d'une expertise en taxonomie, en biologie semencière et en pathologie végétale (en interne ou apportée par des instituts collaborateurs) pendant le processus de caractérisation.

La caractérisation réclame une forte intensité de main-d'œuvre et des fonds suffisants pour permettre la collecte de données de bonne qualité. Procéder à une caractérisation complète pendant les cycles de régénération peut réduire le nombre d'accessions en mesure d'être régénérées pour chaque cycle.

L'incidence d'organismes nuisibles ou de maladies peut limiter la collecte de données de qualité. La détermination de certains traits comme la teneur en huile ou en protéines nécessite des analyses de laboratoire qui ne peuvent pas toujours être réalisées ou sont parfois coûteuses.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Alercia, A., Diulgheroff, S. et Mackay, M. 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors* (MCPD V.2). Rome, FAO et Bioversity International (disponible à l'adresse suivante: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).

Bioversity International. 2007. *Developing crop descriptor lists. Guidelines for developers*. Technical Bulletin No. 13. Rome.

Bioversity International. 2013. *Crop descriptors list*. Rome (disponible à l'adresse suivante: <http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=168>).

Bretting, P.K. et Widrlechner, M.P. 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 13:11-86.

De Vicente, M.C., Metz, T. et Alercia, A. 2004. *Descriptors for genetic markers technologies*. Rome, IPGRI.

Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. et Hodgkin, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. IPGRI Technical Bulletin No. 2. Rome, IPGRI.

Laucou, V., Lacombe, T., Dechesne, F., Siret, R., Bruno, J.P., Dessup, M., Dessup, P., Ortigosa, P., Parra, P., Roux, C., Santoni, S., Varès, D., Perós, J.P., Boursiquot, J.M. et This, P. 2011. High throughput analysis of grape genetic diversity as a tool for germplasm collection management. *Theoretical and Applied Genetics*, 122(6): 1233-1245.

Lehmann, C.O. et Mansfeld, R. 1957. *Zur Technik der Sortimentserhaltung. Kulturpflanze*, 5: 108-138.

UPOV (Union internationale pour la protection des obtentions végétales). Principes directeurs d'examen - Index français (disponible à l'adresse suivante: http://www.upov.int/fr/publications/tg_rom/tg_index.html).

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). [Base de données en ligne] Evaluation/characterization. Data Queries. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, États-Unis (disponible à l'adresse suivante: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/croplist.pl>).

4.6 Normes relatives à l'évaluation

Normes

- 4.6.1 Les données d'évaluation sur les accessions des banques de gènes devraient être obtenues pour des traits inclus sur des listes de descripteurs des plantes cultivées convenues au niveau international. Elles devraient être conformes aux formats de mesure standardisés et calibrés.
- 4.6.2 Les données d'évaluation devraient être obtenues pour autant d'accessions que possible en pratique, au moyen d'analyses en laboratoire, en serre et/ou sur le terrain, selon le cas.
- 4.6.3 Les essais d'évaluation devraient être réalisés dans au moins trois sites divers du point de vue environnemental et les données devraient être collectées sur au moins trois ans.

Informations générales

L'évaluation est l'enregistrement des caractéristiques dont l'expression est souvent influencée par des facteurs environnementaux. Elle implique la collection méthodique des données portant sur les traits agronomiques et qualitatifs au moyen d'essais expérimentaux conçus de manière appropriée. Les données d'évaluation incluent fréquemment les évaluations sur la résistance aux insectes ravageurs, la pathologie végétale et la qualité (par exemple teneur en huile et en protéines) et les traits environnementaux (sécheresse/froid, tolérance et autres). Ces ensembles de données sont très recherchés par les utilisateurs pour incorporer des traits dans les programmes de sélection et améliorer l'utilisation des collections. Ces traits, pour lesquels les accessions de matériel phytogénétique sont évaluées, sont définis à l'avance par les experts en culture en collaboration avec les conservateurs des banques de gènes. Les données d'évaluation fiables qui sont facilement accessibles

aux sélectionneurs et aux chercheurs facilitent grandement l'accès aux accessions de matériel phytogénétique et leur utilisation. Le matériel génétique peut être évalué de manière systématique en utilisant une approche de réseau, aussi bien au niveau international qu'au niveau national.

L'obtention de données d'évaluation par les banques de gènes demande beaucoup de temps et est souvent plus coûteuse qu'obtenir des données de caractérisation. Les conservateurs devraient déployer tous les efforts possibles pour obtenir les enregistrements des données d'évaluation. Une source possible pour obtenir les enregistrements des évaluations sont les utilisateurs qui les ont réalisées et à qui des semences ont été fournies. La banque de gènes devrait solliciter l'utilisateur afin qu'il partage les données d'évaluation et, à cet égard, des modalités pratiques devraient être élaborées entre la banque de gènes et les receveurs/utilisateurs du matériel. Ces informations pourraient traiter de la résistance aux stress biotiques et abiotiques, des caractères de croissance et de développement de l'accession, des caractéristiques de qualité du rendement, etc. Ce type d'informations supplémentaires permet une identification plus ciblée du matériel génétique en vue de satisfaire les besoins potentiels des clients. Ces données devraient ensuite être incluses dans le système de documentation de la banque de gènes.

Aspects techniques

Une large gamme de plantes cultivées a été développée par exemple par le Conseil international des ressources phytogénétiques (IBPGR) (à présent Bioversity International) et l'UPOV. De plus, des listes de descripteurs d'évaluation ont été développées par des organisations régionales et nationales telles que les descripteurs du USDA-ARS NPGS.

La collecte des données devrait être conduite par un personnel formé qui utilise autant que possible des formats de mesure standardisés et calibrés avec suffisamment d'accessions de contrôle standard identifiées et des listes de descripteurs de plantes cultivées publiées. Les résultats des évaluations réalisées en laboratoire, en serre et/ou sur le terrain conformément aux protocoles standardisés et aux procédures expérimentales sont généralement présentés comme valeurs uniques (par exemple les scores de gravité des symptômes de la maladie; décompte) ou valeurs continues (fondées sur la mesure). Les données doivent être validées par les conservateurs et les documentalistes avant qu'elles ne soient téléchargées dans la base de données de la banque de gènes et mises à la disposition du public.

De nombreux traits agronomiques nécessaires aux sélectionneurs sont génétiquement trop complexes pour être testés lors de l'évaluation préliminaire des accessions de matériel génétique. Les données sur les traits agronomiques sont généralement obtenues au cours de l'évaluation du matériel génétique dans le cadre d'un programme de sélection, et de nombreux traits résultent des fortes interactions génotype x environnement ($G \times E$) et donc sont propres au site. L'utilisation des réplifications est fondamentale pour l'évaluation des traits désirés dans différents environnements ainsi que pour définir et



identifier clairement les accessions de contrôle qui doivent être utilisées au cours des années. Ceci facilite les comparaisons des données collectées sur plusieurs années.

Compte tenu des avancées des biotechnologies, la science des marqueurs moléculaires et la génomique sont de plus en plus utilisées en caractérisation (De Vicente *et al.*, 2004) (voir les normes relatives à la caractérisation). Les marqueurs moléculaires les plus couramment utilisés pour la caractérisation et l'évaluation de matériel génétique comprennent les AFLP, les SSR et les polymorphismes à nucléotide unique (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Du fait de leur abondance relative et de la reproductibilité élevée des données, ces marqueurs ont en grande partie remplacé les marqueurs de type plus ancien tels que les polymorphismes de la taille des fragments de restriction (RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*) et l'amplification aléatoire polymorphique de l'ADN (RAPD, *random amplified polymorphic DNA*). Les avancées dans le domaine du séquençage de nouvelle génération et la diminution

des coûts qui en résulte ont suscité une utilisation accrue des analyses basées sur le séquençage, notamment des régions codantes et non codantes ainsi que le génotypage par séquençage (GBS, *genotyping-by-sequencing*). Le mode de détection des différences génétiques varie selon les marqueurs moléculaires. Il en est de même ainsi pour le type de données générées, les niveaux taxonomiques auxquels ils peuvent être appliqués de la manière la plus appropriée et les exigences techniques et financières (Lidder et Sonnino, 2011). Lorsque les techniques de sélection assistée par marqueurs (MAS, *marked assisted selection*) sont réalisables, en l'occurrence la sélection au niveau moléculaire de la présence ou de l'absence de certains caractères au sein de matériels de reproduction, celles-ci peuvent également être utilisées pour l'évaluation de caractéristiques du matériel génétique présentant un intérêt. Cependant, le manque de personnel ayant les compétences appropriées et le manque de ressources nécessaires aux frais de mise en place relativement élevés, continuent d'être un frein à l'adoption répandue des marqueurs moléculaires comme méthode de choix pour l'évaluation du matériel génétique, en particulier dans les pays en voie de développement.

Circonstances particulières

L'évaluation du matériel phytogénétique est très laborieuse et exige des niveaux adéquats de financement durable pour permettre la collecte de données fiables de haute qualité. Dans les cas où la conduite d'une évaluation complète de toutes les accessions, bien que désirable, ne soit pas économiquement réalisable, il est recommandé, comme point de départ, de sélectionner les accessions génétiquement diversifiées fondées, par exemple, sur des sous-ensembles préalablement délimités des collections de matériel génétique.

Les variations de l'incidence des ravageurs et des maladies, la sévérité des stress abiotiques et les fluctuations des facteurs environnementaux et climatiques sur le terrain ont un impact sur l'exactitude des données et devraient être atténuées au moyen d'évaluations raisonnablement répliquées en des endroits multiples, sur plusieurs saisons et plusieurs années. En outre, les essais en laboratoire pour la mesure de traits tels que la teneur en huile et en protéines, la qualité de l'amidon, les facteurs nutritionnels, etc., exigent des équipements spécialisés qui ne sont pas toujours disponibles ou qui peuvent être coûteux, soulignant de nouveau le besoin d'assurer la participation d'équipes multidisciplinaires de plusieurs unités organisationnelles ou institutions, selon le cas.

L'utilisation des données d'évaluation générées par d'autres peut poser des problèmes d'ordre pratique importants. Par exemple, les données peuvent être sous différents formats et, si elles sont publiées, peuvent soulever des questions de droit d'auteur et de propriété intellectuelle. Afin de faciliter l'utilisation de données d'origine extérieure, il est donc important de standardiser les formats de collecte, d'analyse, de rapport et de saisie des données.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Alercia, A., Diulgheroff, S. et Mackay, M. 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors (MCPD V.2)*. Rome, FAO et Bioversity International (disponible à l'adresse suivante: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).

Bioversity International. 2007. *Developing crop descriptor lists. Guidelines for developers*. Technical Bulletin No. 13. Rome, Bioversity International.

Bioversity International. 2013. *Crop descriptor lists* (disponible à l'adresse suivante: <http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=168>).

Bretting, P.K. et Widrechner, M.P. 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 13:11-86.

De Vicente, M.C., Metz, T. et Alercia, A. 2004. *Descriptors for genetic markers technologies*. Rome, IPGRI.

Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. et Hodgkin, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. IPGRI Technical Bulletin No. 2. Rome, IPGRI.

Lehmann, C.O. et Mansfeld, R. 1957. Zur Technik der Sortimentserhaltung. *Kulturpflanze*, 5: 108-138.

Lidder, P. et Sonnino, A. 2011. *Biotechnologies for the management of genetic resources for food and agriculture*. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Background Paper No. 52. Rome, FAO.

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. et Larinde, M. 2006. *Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes*. Manuels pour les banques de gènes No. 8. Rome, Bioversity International.

UPOV. Principes directeurs d'examen - Index français (disponible à l'adresse suivante: http://www.upov.int/fr/publications/tg_rom/tg_index.html).

USDA, ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). [Base de données en ligne] Evaluation/characterization. Data Queries. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, États-Unis (disponible à l'adresse suivante <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/croplist.pl>).

4.7 Normes relatives à la documentation

Normes

- 4.7.1 Les données d'identification de 100 pour cent des accessions doivent être recueillies au moyen des descripteurs de passeport multi-cultures FAO/Bioversity.
- 4.7.2 Toutes les données et informations collectées au sein de la banque de gènes qui concernent chacun des aspects de la conservation et de l'utilisation du matériel doivent être enregistrées dans une base de données conçue à cet effet.

Informations générales

Les informations relatives aux accessions sont essentielles aux banques de gènes pour gérer et préserver leurs collections. Il est également important de partager ces informations et de les mettre à la disposition des utilisateurs potentiels du matériel génétique. Ces éléments doivent accompagner tout matériel distribué. Les données d'identification sont les informations minimales dont on doit disposer pour chaque accession afin d'en garantir la bonne gestion. Leur enregistrement doit respecter les normes internationales, comme les descripteurs de passeport multi-cultures (Alercia, *et al.*, 2012). L'application de normes convenues au niveau international facilitera grandement l'échange de données.

Au cours de la dernière décennie environ, des avancées significatives ont eu lieu dans le domaine des technologies de l'information et de la bioinformatique. La plupart sont accessibles en ligne. En outre, la majorité des banques de gènes disposent d'ordinateurs et d'une connexion à Internet. Cette nouvelle technologie permet d'enregistrer et d'échanger efficacement des données et des informations. En dernier lieu, la conservation et la facilité d'utilisation du matériel génétique conservé sont renforcées par une bonne gestion des données et des informations. Toutes les données et informations générées pendant l'ensemble du processus d'acquisition, d'enregistrement, d'entreposage, de suivi, de

régénération, de caractérisation, d'évaluation et de distribution doivent être inscrites dans une base de données conçue à cet effet et servir à améliorer la conservation et l'utilisation du matériel génétique. Elles vont des détails concernant les caractéristiques génétiques de chaque accession et population aux réseaux de distribution et aux receveurs. Il est important de mettre en place un système hors site de secours de la base de données.

Il est particulièrement important d'étayer les données de caractérisation, d'évaluation et de distribution pour améliorer l'utilisation de la collection concernée et contribuer à l'identification des différentes accessions.

Compte tenu des avancées des biotechnologies, il est nécessaire de compléter les données liées aux traits phénotypiques par des données moléculaires. Il faut s'efforcer d'enregistrer les données moléculaires recueillies grâce à la génomique, à la protéomique et à la bioinformatique.

Aspects techniques

Les systèmes informatisés de stockage des données et des informations permettent un archivage plus exhaustif des éléments associés à la gestion des banques de gènes. L'adoption de normes relatives aux données, qui existent aujourd'hui pour la plupart des aspects intéressant la gestion des données des banques de gènes, contribue à faciliter la gestion des informations et à améliorer l'utilisation et l'échange de données. Par exemple, la liste des descripteurs de passeport multi-cultures FAO/Bioversity (Alercia *et al.*, 2012) doit être utilisée pour étayer les données d'identification car elle contribue à l'échange de données entre différentes banques de gènes et différents pays.

Il existe des systèmes de gestion des informations relatives au matériel génétique, comme GRIN-Global, GENESYS, Mansfield Database (IPK) et SESTO (NordGen)¹. Ils ont été conçus spécialement pour les banques de gènes, afin de répondre à leurs besoins en matière de documentation et de gestion des informations. La plateforme de l'*International Crop Information System* (ICIS) est un autre système de gestion des informations relatives au matériel génétique, dans lequel il est possible de stocker les données provenant d'une ou plusieurs banques de gènes et de les publier sur Internet. Une fonction de recherche permet aux utilisateurs de fixer des critères de sélection uniques ou multiples, ou encore de choisir des coordonnées GPS correspondant à une région et de superposer des cartes climatiques et édaphiques, en vue d'une sélection ciblée du matériel génétique.

Les données d'évaluation sont souvent produites par les utilisateurs auxquels les semences ont été distribuées. La banque de gènes doit leur demander de partager ces données et les inclure ensuite dans son système de documentation. Ces informations peuvent traiter de la résistance aux stress biotiques et abiotiques, des caractères de

1 GRIN: <http://www.ars-grin.gov>.

GENESYS: <http://www.genesys-pgr.org>.

Mansfield Database: http://mansfield.ipk-gatersleben.de/pls/htmldb_pgrc/f?p=185:3:1644539197326401.

SESTO: <http://www.nordgen.org/sesto>.

croissance et de développement de l'accession, des caractéristiques de qualité du rendement, etc. Elles permettent une identification plus ciblée du matériel génétique en vue de satisfaire les besoins potentiels des clients. Cependant, il est reconnu que l'utilisation des informations générées par les utilisateurs n'est pas toujours aussi simple et que des questions de propriété intellectuelle ou des problèmes institutionnels peuvent se poser.

Circonstances particulières

Le manque ou la perte de documentation compromettent l'utilisation optimale des semences et peuvent même conduire à leur perte. Dans le cadre de leur système de gestion des risques, les conservateurs doivent s'assurer de conserver des dossiers appropriés dans des systèmes de sauvegarde de documentation, pour toutes les informations associées à la gestion de la banque de gènes. Dans l'éventualité où des systèmes informatisés ne sont pas disponibles, toutes les informations importantes doivent être correctement consignées dans des registres.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Alercia, A., Diulgheroff, S. et Mackay, M. 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors (MCPD V.2)*. Rome, FAO et Bioversity International (disponible à l'adresse suivante: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).

De Vicente, M.C., Metz, T. et Alercia, A. 2004. *Descriptors for genetic markers technologies*. Rome, IPGRI.

ICIS (International Crop Information System). [Page web] (disponible à l'adresse suivante: <http://irri.org/knowledge/tools/international-crop-information-system>).

4.8 Normes relatives à la distribution

Normes

- 4.8.1 Les semences doivent être distribuées conformément aux lois nationales et aux conventions et traités internationaux pertinents.
- 4.8.2 Les échantillons de semences doivent être accompagnés de tous les documents demandés par le pays receveur.
- 4.8.3 Le délai qui sépare la réception d'une demande de semences de leur expédition doit être réduit autant que possible.
- 4.8.4 Pour la plupart des espèces, un échantillon d'au moins 30 à 50 semences viables doit être fourni pour les accessions qui en comportent suffisamment en stock. Si une accession contient trop peu de semences au moment de la demande et qu'aucune autre ne peut s'y substituer, les échantillons doivent être fournis après régénération ou multiplication, sur la base d'une nouvelle demande. Concernant certaines espèces et utilisations liées à la recherche, des quantités de semences moins importantes doivent suffire à obtenir un échantillon d'une taille acceptable pour la distribution.

Informations générales

La conservation doit être liée à l'utilisation. La distribution de matériel génétique est la fourniture d'un échantillon représentatif des accessions de semences d'une banque de gènes en réponse à des demandes émanant d'utilisateurs du matériel phylogénétique. La demande de ressources génétiques est en augmentation permanente car il faut relever les défis liés au changement climatique, à l'évolution des spectres de virulence des principaux organismes nuisibles et maladies, et aux espèces exotiques envahissantes. Elle a conduit à une reconnaissance plus large de l'importance d'utiliser le matériel génétique conservé dans les banques de gènes, qui détermine en fin de



compte la distribution du matériel génétique. Le délai qui sépare la réception d'une demande formulée par un utilisateur de l'expédition des semences (accompagnées des informations pertinentes) doit être réduit autant que possible.

La diversité des systèmes juridiques est reconnue pour ce qui est des règles de procédures régissant l'accès à la cour et à l'arbitrage ainsi que des obligations découlant des conventions internationales et régionales applicables à ces règles de procédures. Lorsqu'un utilisateur fait la demande d'une accession à une banque de gènes, il lui incombe de faire mention des exigences nationales relatives à l'importation de semences, notamment les réglementations phytosanitaires en vigueur dans son pays, afin d'éviter la propagation d'organismes nuisibles de quarantaine ou réglementés ou d'espèces envahissantes qui pourraient affecter gravement la production nationale.

Les deux instruments internationaux régissant l'accès aux ressources génétiques sont le Traité international et la CDB. Le Traité international facilite l'accès aux RPGAA et au partage des avantages découlant de leur utilisation. Ce traité a établi un système multilatéral pour les RPGAA correspondant à un pool de 64 cultures vivrières et fourragères (communément appelées cultures de l'Appendice 1 du Traité) qui peuvent être distribuées à l'aide de l'ATTM). L'ATTM peut aussi être utilisé pour les cultures ne figurant pas à l'Appendice 1; d'autres modèles sont également disponibles. L'accès et le partage des avantages de la CDB sont conformes au protocole de Nagoya. La CDB et le Traité international soulignent ce continuum entre la conservation et l'utilisation durable, ainsi que l'accès facilité et le partage équitable des avantages découlant de leur utilisation.

Les banques de gènes doivent s'efforcer de mettre à la disposition des utilisateurs autant d'accessions que possible, accompagnées des données associées. Lorsque le stock est épuisé, les accessions peuvent être multipliées afin de satisfaire les demandes des utilisateurs en priorité. Les banques de gènes doivent promouvoir la disponibilité des ressources génétiques aux fins de la recherche, de la sélection, de l'éducation, de l'agriculture et du rapatriement. À l'échelle mondiale, les banques de gènes peuvent

fournir du matériel génétique issu de variétés locales à des pays qui établissent leur propre banque de gènes ou qui sont victimes d'une catastrophe comme un incendie, une inondation ou une guerre civile.

Précisons que le nombre minimal de semences à distribuer dépend de l'espèce et de l'utilisation qui doit en être faite. Les accessions des banques de gènes sont utilisées non seulement pour la présélection et la sélection végétale appliquée, mais aussi pour des activités de recherche. Dans ce dernier cas, les quantités de semences nécessaires sont généralement très faibles.

Aspects techniques

Le matériel génétique doit être distribué de manière à garantir qu'il atteigne sa destination en bon état. Les conditions environnementales peuvent nuire à la qualité des semences au cours du transport. Il faut donc emballer soigneusement les semences dans des enveloppes hermétiques afin de les protéger durant cette étape.

Les échantillons à distribuer doivent être conformes aux exigences des normes de qualité définies dans le présent document et à celles du pays receveur en matière de contrôle sanitaire des semences. La distribution doit également respecter les réglementations et lois nationales. Les éléments relatifs aux réglementations et lois nationales, en particulier les exigences liées au contrôle sanitaire des semences, doivent être communiqués par l'utilisateur ou les autorités phytosanitaires nationales.

La plupart du temps, les documents réclamés par le pays receveur et le demandeur seront nécessaires pour obtenir simplement et rapidement le dédouanement des colis et l'autorisation des départements de protection des végétaux.

Le certificat phytosanitaire, les déclarations complémentaires, le certificat de don, le certificat attestant l'absence de valeur commerciale et l'autorisation d'importation, entre autres, sont quelques-uns des documents réclamés par les pays receveurs. Il est donc important de publier et d'actualiser la liste des documents demandés par les différents pays. Si la distribution ou l'échange de semences engendre des coûts supplémentaires (certificats phytosanitaires, bulletin de l'ISTA, enveloppes spéciales, etc.), ceux-ci doivent être supportés par l'utilisateur, à moins que les deux parties n'en décident autrement. L'un des principaux problèmes que pose la distribution internationale est que les banques de gènes sont tenues de déclarer qu'une maladie particulière n'a pas été repérée dans le champ de production des semences. Or, elles ne peuvent pas satisfaire les exigences de déclaration supplémentaire pour les semences produites il y a 20 ou 30 ans. Les pays qui reçoivent des semences doivent donc se charger des procédures de quarantaine s'agissant des semences pour lesquelles la déclaration supplémentaire ne peut être effectuée.

La liste du matériel et des informations associées (données d'identification, au minimum) doit être fournie au receveur, accompagnée de tout accord juridique intéressant l'accès et l'utilisation des ressources génétiques fournies.

Il est fortement recommandé de réduire autant que possible le délai qui sépare l'expédition de la livraison du colis. Lorsque les semences ne sont pas disponibles, il convient d'en détailler

les raisons, de communiquer une date estimative de disponibilité et de proposer d'autres accessions susceptibles de correspondre aux besoins du demandeur.

Les receveurs des accessions des banques de gènes sont encouragés à constituer leur propre stock de semences aux fins de leurs essais et expériences éventuels. Cela est particulièrement pertinent pour les espèces sauvages dont les stocks de semences sont souvent limités et pour les essais de terrain avec répétition quand il n'est pas envisageable de fournir la quantité de semences souhaitée.

Pour le matériel distribué en-dehors du Système multilatéral du Traité international, la banque de gènes distributrice doit encourager le receveur à transmettre des informations sur l'utilité du matériel génétique au fournisseur, selon les termes de l'ATM.

Circonstances particulières

Les décisions politiques, les situations de crises ou les retards bureaucratiques peuvent allonger le délai qui sépare la réception de la demande de semences de la distribution du matériel. Les contraintes liées à la régénération et/ou à la multiplication des accessions peuvent également avoir une incidence sur le processus de distribution, notamment le retarder.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Engels, J.M.M. et Visser, L., éds. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.

FAO. 2009. Accord type de transfert de matériel du Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (ATM du ITPGRFA), Rome (disponible à l'adresse suivante: <http://www.itpgrfa.net/International/>).

FAO. 2009. Traité international sur les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture (ITPGRFA), Rome (disponible à l'adresse suivante: <http://www.itpgrfa.net/International/>).

FAO/IPGRI. 1994. *Genebank standards*. Rome, FAO et IPGRI (disponible à l'adresse suivante: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/015/aj680e.pdf>).

Organisation des Nations Unies. 1992. Convention sur la diversité biologique (CDB) (disponible à l'adresse suivante: <http://www.cbd.int/convention/text/default.shtml>).

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. et Larinde, M. 2006. *Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes*. Manuels pour les banques de gènes No. 8. Rome, Bioversity International.

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base (disponible à l'adresse suivante: <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org>).

4.9 Normes relatives à la duplication de sécurité

Normes

- 4.9.1 Un doublon de sécurité correspondant à chaque accession originale de la banque de gènes doit être entreposé sur un site éloigné géographiquement, dans des conditions au moins identiques.
- 4.9.2 Chaque doublon doit être accompagné des informations pertinentes qui s’y rapportent.

Informations générales

La duplication de sécurité consiste à produire un sous-échantillon semblable à l’accession sur le plan génétique en vue d’atténuer les risques de disparition partielle ou totale imputables aux catastrophes naturelles ou d’origine humaine. Les doublons de sécurité sont génétiquement identiques à la collection entreposée à long terme et sont appelés « échantillons dérivés les plus originaux » (Engels et Visser, 2003). La duplication de sécurité porte à la fois sur le matériel en lui-même et sur les informations correspondantes (elle inclut notamment une copie de sauvegarde de la base de données). Les doublons de sécurité sont entreposés à long terme sur un autre site, souvent à l’extérieur du pays. Le lieu est choisi de façon à limiter autant que possible les risques potentiels et à fournir les meilleures installations d’entreposage qui soient. Pour réduire au maximum les risques qui peuvent survenir dans un pays, la duplication de sécurité sera idéalement réalisée dans un autre.

La duplication de sécurité est généralement effectuée selon le principe de la « boîte noire ». Ainsi, la banque de gènes dépositaire n’est pas habilitée à utiliser ni à distribuer le matériel génétique. Il incombe au déposant de veiller à ce que celui-ci soit de bonne qualité, de contrôler la viabilité des semences au fil du temps et d’utiliser sa propre collection de base pour régénérer les collections lorsqu’elles commencent à perdre en

viabilité. On ne peut toucher sans l'autorisation du déposant au matériel génétique, qui ne lui est restitué à sa demande que lorsque la collection originale est perdue ou détruite. Le dépôt peut également être réclamé lorsqu'il est remplacé par du matériel nouvellement régénéré. Cependant, il est reconnu que la boîte noire n'est pas l'unique approche. Dans certains cas, il arrive que la banque de gènes receveuse s'occupe également de la collection de sécurité.

Il convient de procéder à une duplication de sécurité pour toutes les semences originales collectées par la banque de gènes ou seulement abritées par elle. Celle-ci doit malgré tout conserver les échantillons originaux afin d'en faciliter l'accès en cas de régénération ou si d'autres décisions de gestion sont prises. Les semences dupliquées à partir d'autres collections peuvent généralement être retrouvées par ce biais et ne nécessitent pas de doublons de sécurité, à moins qu'il existe un doute quant à leur sécurité dans la collection d'origine.

Toute disposition relative à une duplication de sécurité nécessite un accord juridique signé en bonne et due forme entre le déposant et le receveur des doublons, qui établit les responsabilités des parties et les conditions générales de conservation du matériel.

La duplication de sécurité est désormais possible à la Chambre forte semencière mondiale de Svalbard, sur l'île du Spitzberg (Norvège). Les institutions déposant des semences en conservent la propriété et elles seules sont autorisées à accéder aux échantillons entreposés à Svalbard.

Aspects techniques

Pour choisir l'endroit où seront conservés les doublons de sécurité, il faut avant tout prendre en considération la localisation géographique et les conditions environnementales. Les installations doivent se situer dans un lieu soumis à de faibles radiations (radioactivité) et stable (faible probabilité de séismes). Elles doivent se trouver à une altitude qui garantit un drainage convenable en saison des pluies et élimine le risque d'inondation que peut générer l'élévation du niveau de la mer due au changement climatique. La stabilité économique et sociopolitique est tout aussi importante. Koo *et al.* (2004) suggèrent de conserver les doublons dans une zone qui ne risque pas d'être soumise à un embargo politique, une opération militaire ou une action terroriste qui pourraient perturber l'accès international.

Les échantillons sont préparés de la même manière pour la duplication de sécurité que pour la collection de base. Les conditions doivent être au moins aussi strictes que pour l'entreposage à long terme dans une banque de gènes et la qualité de la préparation des semences (c'est-à-dire le séchage) est importante. Il est parfois utile de trier le matériel en fonction de la longévité des semences (faible, moyenne ou grande) avant de les destiner à une duplication de sécurité.

La taille des échantillons ne doit pas être limitée à une valeur minimale. Elle doit être suffisante pour procéder à au moins trois régénérations. Les doublons de sécurité ne sont pas uniquement destinés aux générations futures, ils peuvent aussi fournir un

échantillon minimal pour régénérer une accession qui a été perdue. Mieux vaut conserver une certaine quantité, même minimale, de semences sur un deuxième site que de ne pas le faire du tout. Si possible, un doublon de sécurité d'une accession conservée dans une banque de gènes doit comporter au moins 500 graines viables pour les plantes allogames et les accessions hétérogènes présentant une diversité importante, et au moins 300 pour les accessions génétiquement uniformes. Pour les accessions de semences à faible viabilité, davantage de graines sont nécessaires. Les températures d'entreposage doivent être comprises entre -18 °C et -20 °C.

L'emballage destiné aux doublons de sécurité doit être trilaminé et la couche métallique située au milieu doit être d'une épaisseur suffisante. Il doit avoir la forme d'une petite poche fermée sur les quatre côtés et sans soufflet. Il protégera les semences de l'eau durant le transport et l'entreposage à -18 °C pendant au moins 30 ans. Une étiquette doit être placée à l'intérieur et à l'extérieur de chaque paquet de semences pour permettre l'identification du matériel génétique.

Les conditions d'entreposage des doublons de sécurité devant être au moins identiques à celles de la collection de base, la viabilité des semences peut être contrôlée sur des lots de la même accession conservée à long terme dans la banque de gènes et extrapolée, à condition que les normes fondamentales relatives à l'entreposage soient respectées et que l'on utilise les mêmes récipients. Dans certains cas, les échantillons destinés aux essais de germination peuvent être envoyés dans une boîte distincte en même temps que les doublons de sécurité et faire l'objet de tests dans le cadre d'un accord conclu avec le dépositaire.

Les boîtes solides et résistantes à la chaleur (en carton épais ou en polypropylène) sont les mieux indiquées pour le transport et l'entreposage des semences. Elles doivent être correctement fermées. Il convient d'opter pour le moyen de transport le plus rapide (frêt aérien, transporteur ou voie terrestre) afin d'éviter la détérioration de la qualité des semences. Les échantillons doivent être renouvelés par l'expéditeur lorsque leur viabilité dans des conditions d'entreposage identiques à celles de la collection de base commence à décliner. Les doublons de sécurité peuvent alors être détruits ou renvoyés à l'expéditeur et remplacés par un nouveau lot.

Circonstances particulières

Lorsque l'on estime la viabilité du doublon de sécurité en se fondant sur les résultats de tests qui portent sur l'échantillon de la collection de base, certaines précautions s'imposent. Les semences peuvent vieillir à des vitesses différentes s'il existe une disparité entre l'HR ambiante des deux sites et/ou que l'ampleur et la fréquence des fluctuations de température ne sont pas équivalentes, même si la température moyenne d'entreposage est identique.

Des problèmes de responsabilité peuvent découler de l'expédition d'échantillons dans des boîtes noires scellées. L'un porte sur le contenu de la boîte et sur sa manipulation par les douaniers et d'autres autorités chargées de contrôler l'entrée sur le territoire.

Dans certains cas, les boîtes sont ouvertes et des sceaux spéciaux sont appliqués par les autorités pour confirmer qu'il ne s'agit pas de plantes médicinales ni d'autres végétaux interdits. Un autre problème concerne la responsabilité de l'institution receveuse lorsque le matériel est endommagé ou perd sa viabilité plus tôt que prévu à la suite d'un stress pendant le transport, d'une mauvaise fermeture des récipients ou de fluctuations de la température au-delà des normes spécifiées. Dans les conditions décrites ici, le dépositaire des doublons de sécurité ne doit être tenu pour responsable que si la température devient incontrôlable, ce qui doit être immédiatement signalé à l'institution de départ afin qu'elle puisse décider des mesures à prendre. Celle-ci doit porter l'entière responsabilité des avaries de transport et de l'humidité incontrôlée.

Les normes et aspects techniques peuvent être difficiles à mettre en œuvre pour certaines espèces, en raison de la biologie intrinsèque des échantillons - c'est notamment le cas des semences à faible longévité ou des espèces à grosse graine, lorsque l'espace et le coût peuvent être des facteurs limitatifs.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Engels, J.M.M. et Visser, L., eds. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.

Koo, B., Pardey, P.G., Wright, B.D., Bramel, P., Debouck, D., Van Dusen, M.E., Jackson, M.T., Rao, N.K., Skovmand, B., Taba, S. et Valkoun, J. 2004. *Saving seeds: The economics of conserving crop genetic resources ex situ in the future harvest centres of the CGIAR*. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International.

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base. Duplication de sécurité: Documents de référence, liste de références et modèle de convention de dépôt de sécurité standard (disponibles à l'adresse suivante: http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=58&Itemid=207&lang=English).

4.10 Normes relatives à la sécurité et au personnel

Normes

- 4.10.1 Une banque de gènes doit disposer d'une stratégie de gestion des risques qui inclut, entre autres, des mesures permettant de faire face aux coupures d'électricité, aux inondations et aux séismes.
- 4.10.2 Une banque de gènes doit suivre, le cas échéant, les dispositions et protocoles locaux relatifs à l'hygiène et à la sécurité au travail.
- 4.10.3 Une banque de gènes doit employer le personnel requis pour remplir ses obligations ordinaires afin de pouvoir acquérir, conserver et distribuer du matériel génétique conformément aux normes en vigueur.

Informations générales

Pour remplir son objectif d'acquisition, de conservation et de distribution de matériel génétique, une banque de gènes doit non seulement disposer de procédures et d'équipement adaptés à la manipulation de semences, mais aussi employer un personnel qualifié pour effectuer le travail nécessaire et assurer la sécurité.

La gestion active d'une banque de gènes s'appuie sur du personnel qualifié et il est crucial d'assigner des responsabilités aux employés compétents. Une banque de gènes doit donc disposer d'un plan ou d'une stratégie relatifs au personnel, ainsi que du budget correspondant, afin de garantir qu'un nombre minimum d'employés qualifiés sont disponibles pour lui permettre d'acquérir, de conserver et de distribuer du matériel génétique. L'accès à des spécialistes de domaines divers est souhaitable, selon le mandat et les objectifs de chaque banque de gènes. Cependant, les effectifs et la formation du personnel seront fonction des conditions particulières. La santé et l'utilité des semences entreposées dépendent aussi de questions liées à la sécurité, notamment sanitaire, de la banque de gènes. Des dispositions doivent avoir été prises pour pallier les éventuelles coupures d'électricité, un équipement

d'extinction des incendies doit être en place et régulièrement contrôlé, les bâtiments doivent être antisismiques si la banque est située dans une zone sujette aux tremblements de terre, pour ne citer que quelques exemples. Une banque de gènes doit donc mettre en œuvre et promouvoir une gestion systématique des risques physiques et biologiques de l'environnement quotidien auxquels les collections et les informations associées sont exposées.

Aspects techniques

Le personnel doit avoir acquis les qualifications nécessaires dans le cadre d'une formation certifiée et/ou sur le lieu de travail, et les besoins de formation doivent être analysés. Le personnel doit connaître les procédures de sécurité et y être entraîné afin de limiter autant que possible les risques encourus par le matériel génétique.

Les installations doivent être construites de manière à résister aux catastrophes naturelles comme les ouragans, les cyclones, les séismes ou les inondations qui sont susceptibles de se produire dans la région.

Les locaux d'entreposage doivent être protégés des cambrioleurs et d'autres intrus par des installations classiques comme des clôtures, des systèmes d'alarme, des portes de sécurité ou tout autre dispositif. La sécurité des collections de semences sera améliorée en limitant strictement l'accès des installations d'entreposage au personnel autorisé.

Des vêtements de protection doivent être fournis et portés dans la zone d'entreposage. Les précautions qui s'imposent doivent être prises et un équipement de sécurité, y compris des alarmes et des dispositifs permettant d'ouvrir de l'intérieur les portes des salles de séchage et de réfrigération, doit être installé.

La réfrigération est presque toujours dépendante de l'énergie électrique; il est donc nécessaire que l'approvisionnement soit suffisant et fiable. Une défaillance de l'approvisionnement en électricité peut conduire à la perte totale des accessions de la banque de gènes. Il convient d'envisager l'acquisition d'un générateur de secours qui prendra automatiquement le relais en cas de problème au niveau du système principal. Il faut également stocker suffisamment de combustible pour faire fonctionner le générateur en cas de coupure d'électricité.

Des appareils de contrôle de la température doivent être installés dans les chambres de séchage et d'entreposage afin de suivre l'évolution des paramètres réels en fonction du temps. Il convient de réfléchir à l'éventualité d'entreposer les semences sans les réfrigérer si le système est intrinsèquement peu fiable. Si la réfrigération doit servir à conserver le matériel génétique, elle doit respecter les normes en vigueur car une défaillance à ce niveau peut être beaucoup plus nuisible qu'un entreposage sans réfrigération.

Si le système de réfrigération et/ou d'approvisionnement en énergie électrique n'est pas fiable, une installation peut être construite à 10-20 mètres de profondeur, où la température moyenne peut être maintenue aux environs de 10 °C. Cette solution est applicable dans plusieurs régions tropicales ne présentant pas de risque d'inondation. Néanmoins, le séchage doit être réalisé comme il convient et les semences doivent être conservées dans des flacons correctement fermés.

Des alarmes et autres équipements de lutte contre les incendies doivent être installés dans la banque de gènes. La plupart des incendies sont provoqués par des circuits électriques défectueux. Des contrôles périodiques doivent donc être réalisés au niveau de l'installation électrique afin de veiller au respect des normes de sécurité. L'équipement de lutte contre l'incendie doit comprendre, entre autres, des extincteurs et des couvertures antifeux. Dans les zones sujettes aux orages, un paratonnerre doit être mis en place.

Circonstances particulières

Lorsqu'une banque de gènes ne dispose pas de personnel qualifié, manque de temps ou est soumise à d'autres contraintes, elle peut externaliser une partie de ses activités ou solliciter l'aide d'autres banques. La communauté internationale des banques de gènes doit être informée si l'une d'elles risque de ne plus être en mesure d'assurer ses fonctions.

Les entrées non autorisées dans les locaux des banques de gènes peuvent conduire à la perte pure et simple de matériel mais aussi compromettre les collections par l'introduction involontaire d'organismes nuisibles et de pathologies ou l'interférence avec les systèmes de gestion.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Engels, J.M.M. et Visser, L., édés. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base. Gestion des risques (disponible à l'adresse suivante: http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=135&Itemid=236&lang=english).





Chapitre 5

Normes relatives aux collections en champ



5.1 Normes relatives au choix de l'emplacement de la collection en champ

Normes

- 5.1.1 Les conditions agroécologiques du site de la collection en champ (climat, altitude, sol, drainage) doivent être aussi proches que possibles de l'environnement dans lequel les matériels végétaux étaient normalement cultivés ou avaient été collectés.
- 5.1.2 Le site de la collection en champ doit être situé de telle sorte à minimiser les risques de catastrophes ou de dangers naturels ou d'origine humaine, notamment les organismes nuisibles, les maladies, les dégâts causés par les animaux, les inondations, les sécheresses, les incendies, les dégâts causés par la neige et le gel, les volcans, la grêle, les vols et le vandalisme.
- 5.1.3 Pour les espèces utilisées pour la production de semences destinées à la distribution, le site de la collection en champ doit être situé de façon à minimiser les risques de dispersion des gènes et de contamination par les cultures ou les populations sauvages appartenant à la même espèce afin que l'intégrité génétique soit maintenue.
- 5.1.4 Les droits fonciers du site de la collection en champ doivent être garantis et le site doit être assez vaste pour permettre l'expansion future de la collection.
- 5.1.5 Le site de la collection en champ doit être aisément accessible au personnel et aux livraisons de fournitures. Il doit disposer d'un accès facile à l'eau et d'installations appropriées pour la propagation et la quarantaine.

Informations générales

Étant donné le caractère à long terme d'une collection en champ, le choix d'un site approprié est essentiel à la bonne conservation du matériel génétique. De nombreux facteurs doivent être pris en compte pour le choix d'un site destiné à une collection en champ, notamment les conditions agroécologiques appropriées aux plantes conservées

sur ce site, les cataclysmes associés – naturels ou d’origine humaine –, la sécurisation des droits fonciers sur le long terme, l’accessibilité du site au personnel et la disponibilité des ressources en eau.

Aspects techniques

Les plantes sont vigoureuses et saines lorsqu’elles sont plantées dans des conditions agroécologiques appropriées. Les collections en champ sont particulièrement vulnérables aux pertes causées par une mauvaise adaptation du matériel provenant d’environnements très différents de celui du site de la banque de gènes. Afin de diminuer le risque de mauvaise adaptation, l’environnement et le sol du site choisi pour la collection en champ doivent donc être les mieux adaptés aux espèces. Une des solutions à la mauvaise adaptation consiste à adopter une approche décentralisée de la gestion des banques de gènes, c’est-à-dire de colocaliser les collections dans des agroécologies différentes plutôt que dans une banque de gènes centralisée. Les accessions ayant des capacités d’adaptation similaires sont conservées ensemble dans une station située dans un agroenvironnement semblable à celui d’origine ou proche de leur habitat naturel. Les conditions naturelles de l’environnement original peuvent être simulées en fournissant plus d’ombre ou de drainage, par exemple pour les parents sauvages des cultures issues de forêts naturelles, comparativement aux végétaux cultivés qui se sont adaptés à une intensité lumineuse plus élevée.

Dans les collections en champ, il est très important d’éviter les organismes nuisibles et les maladies ainsi que les vecteurs d’insectes. La collection en champ doit être située, autant que possible, dans un endroit exempt des principaux organismes nuisibles et pathologies, ou loin des régions connues pour être infectées par des moisissures et des virus. Ceci afin de diminuer les risques et les frais de gestion relatifs à la protection des végétaux et de garantir une source de matériel propre pour la distribution. Les sols doivent être vérifiés avant la plantation afin de s’assurer qu’ils sont exempts de moisissures, de termites et autres parasites du sol et doivent être assainis par des traitements appropriés. Si cela n’est pas possible, le site choisi doit être situé à une certaine distance des terrains contenant la même culture, afin d’atténuer la menace des insectes nuisibles et des maladies. Les plantes malades doivent être éliminées à l’aide d’un programme d’assainissement solide. Lorsque cela est possible, les collections doivent être maintenues dans des régions chaudes et sèches, moins favorables aux déplacements de vecteurs, aux organismes nuisibles et aux maladies. Par ailleurs, le rassemblement de grandes quantités de végétaux sensibles aux maladies peut augmenter considérablement le risque d’épidémies. Des collections importantes d’un même genre requièrent un examen particulièrement minutieux du point de vue des pathologies.

L’évaluation des risques de cataclysmes naturels (tels que les inondations, les incendies, la neige/la glace, les volcans, les tremblements de terre et les cyclones) est un critère important pour la garantie de l’intégrité physique des collections. La sécurité physique et l’éventualité de menaces d’origine humaine telles que les vols et le vandalisme doivent

également être prises en compte. Toutes ces caractéristiques doivent être considérées lors du positionnement et de la conception d'une collection en champ, afin de réduire la perte de matériel génétique (voir aussi les normes relatives à la sécurité).

Les filets et cages à insectes peuvent être utilisés pour protéger les plantes de plus petite taille contre les dégâts causés par les insectes ou les oiseaux. Les espèces exogames telles que les arbres fruitiers à semences récalcitrantes ou les graminées cultivées pour leurs graines ou maintenues comme plantes, doivent être isolées des pollinisateurs potentiels. Afin d'assurer l'intégrité génétique de ces espèces et d'éviter la dispersion des gènes ou la contamination par les mauvaises herbes, il est important de choisir un site éloigné des cultures ou des populations sauvages appartenant à la même espèce. Pour la propagation, il convient d'établir et de respecter les distances d'isolement recommandées, les cages d'isolement ou les mesures de contrôle de la pollinisation. Concernant les distances d'isolement à respecter pour la régénération des accessions, des informations spécifiques aux cultures sont disponibles dans la Base de connaissances sur les banques de gènes des cultures (voir bibliographie).

Une collection en champ doit être positionnée sur un site sécurisé régi par un accord à long terme ainsi que des droits fonciers et un financement garantis ou formellement reconnus et tenant compte du plan de développement de la région. L'historique de l'utilisation du terrain peut fournir des informations relatives à l'état des organismes nuisibles ou des mauvaises herbes du terrain ainsi que la quantité d'engrais utilisée. L'utilisation importante d'engrais au cours des années précédentes pourrait affecter la croissance des racines et des tubercules. Les engrais à résidus élevés peuvent nuire par exemple au développement des tubercules de la patate douce. Afin d'éviter le stress dû à la sécheresse, les critères de sélection doivent également inclure une pluviosité suffisante ou une source d'approvisionnement en eau pour l'irrigation supplémentaire. Outre l'historique de l'utilisation du terrain, il est recommandé d'inclure les mesures pouvant être prises pour vérifier et rectifier l'état physique et nutritionnel des sols. Celles-ci consistent essentiellement en l'analyse physico-chimique des sols et les mesures correctives qui en résultent. Les régions ayant connu une utilisation importante de potassium doivent être rééquilibrées par des applications de suppléments de calcium et de magnésium, surtout pour les arbres fruitiers tropicaux.

La taille du site choisi doit fournir suffisamment d'espace pour le type d'espèce à conserver ainsi que pour une éventuelle expansion de la collection au fur et à mesure de sa croissance, en particulier chez les espèces vivaces. L'espace requis pour l'arboriculture peut être considérable. Par ailleurs, il convient d'allouer suffisamment d'espace pour les plantes annuelles nécessitant une transplantation et une rotation continues autour des parcelles afin d'éviter toute contamination potentielle par les plantations précédentes, ainsi que pour la rotation des plantes annuelles et vivaces dans le cadre du contrôle des maladies et de la gestion de la fertilité des sols. Des installations de stockage suffisantes et appropriées doivent être disponibles dans l'éventualité où les matériels végétaux nécessitent un entreposage avant la prochaine plantation.

L'accessibilité du matériel génétique facilitera la surveillance et la gestion des végétaux. Le site doit être accessible à la main-d'œuvre et aux machines effectuant le paillage et les

applications d'engrais et de pesticides. Il doit aussi avoir accès, tout au long de l'année, à des installations appropriées servant à l'irrigation, la propagation et la conservation *in vitro* ou la cryoconservation. Un système de sécurité efficace doit être mis en place contre les vols ou les dégâts causés au matériel génétique et aux installations.

Circonstances particulières

Lorsque les accessions ayant des origines écogéographiques différentes sont plantées à un certain endroit, une attention particulière est requise de la part du personnel de conservation pour la surveillance de la phénologie reproductive et de la production de semences ainsi que pour l'identification et le transfert des accessions mal adaptées vers d'éventuels sites alternatifs, serres ou cultures *in vitro*, afin d'éviter la perte de matériel génétique. Certaines accessions peuvent nécessiter des pratiques de gestion particulières. La protection des végétaux contre les prédateurs peut nécessiter le recours à des aires protégées telles que les abris grillagés ou les cages.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Anderson, C.M. 2000. *Citrus germplasm resources and their use in Argentina, Brazil, Chile, Cuba and Uruguay*. Proc. IX ISC. Vol I: 123-125, Orlando, Floride, États-Unis.

Anderson, C.M. 2008. *Recursos genéticos y propagación de variedades comerciales de cítricos*. XII Simposium Internacional de Citricultura. Tamaulipas, Mexique.

Borokini, T.I., Okere, A.U., Giwa, A.O., Daramola, B.O. et Odofin, T.W. 2010. Biodiversity and conservation of plant genetic resources in field genebank of National Centre for Genetic Resources and Biotechnology, Ibadan, Nigéria. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 2(3): 037-050.

Davies, F.S. et Albrigo, L.G. 1994. *Citrus*. Wallingford, Royaume-Uni, CAB International.

Gmitter, F.G. et Hu, X.L. 1990. The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary citrus species (Rutaceae). *Economic Botany*, 44: 267-277.

Said Saad, M. et Rao, V.R., éd. 2001. *Establishment and management of field genebank training manual*. Serdang, Malaisie, IPGRI-APO.

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base (disponible à l'adresse suivante: <http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/>).

5.2 Normes relatives à l'acquisition de matériel génétique

Normes

- 5.2.1 Toutes les accessions de matériel génétique ajoutées à une banque de gènes doivent être acquises légalement et accompagnées de la documentation technique pertinente.
- 5.2.2 Toutes les accessions de matériel génétique doivent être accompagnées d'un minimum de données associées, telles que détaillées dans les descripteurs de passeport multi-cultures de la FAO/Bioversity.
- 5.2.3 Le matériel de propagation doit être prélevé, autant que possible, à partir de végétaux sains ayant atteint un stade de maturité convenant à la propagation.
- 5.2.4 L'intervalle de temps entre la collecte, le transport et le traitement, puis le transfert à la collection en champ, doit être le plus court possible afin d'éviter la perte et la détérioration de matériel.
- 5.2.5 Les échantillons provenant d'autres pays ou d'autres régions du pays doivent être soumis à une quarantaine appropriée et être conformes aux critères associés avant d'être introduits dans la collection en champ.

Informations générales

L'acquisition est le processus de collecte ou de demande de matériels – ainsi que des informations qui s'y rapportent – en vue de les intégrer dans une banque de gènes. Lors de l'acquisition du matériel génétique destiné à être conservé dans collections en champ, une attention particulière doit être portée aux plantes à semences récalcitrantes ou multipliées par voie végétative. Les propagules utilisés pour la création d'une collection en champ peuvent se présenter sous différentes formes telles que des semences, des boutures, des tubercules, des cornes, des rejetons, des cultures de tissus, des greffons ou du matériel cryoconservé. Les matériels végétaux peuvent être obtenus à partir de banques de gènes

existantes, de collections de chercheurs ou de sélectionneurs, de cultivars traditionnels et de formes cultivées par des agriculteurs ainsi que d'explorations/expéditions de recherche de végétaux. Le déplacement et l'acquisition de matériel génétique doivent respecter les réglementations nationales et internationales pertinentes telles que les lois phytosanitaires ou relatives à la quarantaine, les législations nationales régissant l'accès aux ressources génétiques, la CIPV, le Traité international et la CDB.

Aspects techniques

L'adhésion à la Norme 5.2.1 assure la sécurité des déplacements de matériel génétique depuis les sites de collectes situés aussi bien à l'intérieur qu'à l'extérieur du pays, vers le pays hébergeant la banque de gènes. Pour le matériel génétique collecté *in situ*, il convient de se conformer aux réglementations nationales qui requièrent généralement l'obtention de permis de prélèvement auprès des autorités nationales concernées. Si la collection provient de champs d'agriculteurs ou de collectivités locales, une procédure de consentement préalable (*prior informed consent*, PIC) peut être requise, conformément à la législation nationale, régionale ou internationale correspondante. Lorsque le matériel génétique doit être exporté il convient d'utiliser un accord approprié de transfert de matériel. L'exportation des RPGAA peut être accompagnée d'un ATTM ou de permis similaires conformément aux réglementations nationales relatives à l'accès et au partage des avantages. Il convient de s'enquérir des réglementations relatives aux permis d'importation spécifiant les exigences phytosanitaires et autres conditions d'importation auprès de l'autorité nationale compétente dans le pays receveur.

Au moment de l'acquisition, il est important de veiller à ce que les données d'identification de chaque accession soient aussi complètes que possible, en particulier les données de géoréférencement qui permettent de localiser avec précision les sites de collecte originaux et aident à identifier les accessions dont les caractéristiques d'adaptation spécifiques correspondent aux conditions agroclimatiques de ces sites. Les données de passeport sont essentielles à l'identification et au classement de chaque accession et servent de point d'entrée pour la sélection et l'utilisation de l'accession. Des formulaires appropriés doivent être utilisés pour le recueil de données détaillées concernant la collecte. Ces formulaires doivent comporter des informations telles que la classification taxonomique initiale de l'échantillon, les coordonnées du site de collecte, une description de l'habitat des végétaux collectés, le nombre de végétaux échantillonnés ainsi que d'autres données pertinentes essentielles à une bonne conservation, telles que fournies dans les descripteurs de passeport multi-cultures de la FAO/Biodiversity (Alercia *et al.*, 2012). Lorsque le matériel est collecté à partir de champs d'agriculteurs, des informations complémentaires très utiles peuvent être obtenues en questionnant les agriculteurs, notamment sur les pratiques culturales, les méthodes de propagation, l'historique et l'origine, ainsi que sur les diverses utilisations. Lorsque la situation le permet, il convient de prélever un spécimen d'herbier dans la même



population que les échantillons, en précisant la méthode et la raison de l'acquisition. Ce spécimen sera conservé comme collection de référence.

En cas de dons (d'un programme de recherche ou d'une banque de gènes), les données d'identification disponibles doivent être complétées par la classification taxonomique, le nom et le numéro d'identification du donateur ainsi que les noms des matériels génétiques. On doit s'enquérir auprès du donateur de la manière dont le matériel génétique reçu a été entretenu, notamment du pedigree ou de la lignée et, si possible, de la chaîne de responsabilité. Les matériels doivent recevoir un numéro d'identification unique (temporaire ou définitif, selon la pratique en vigueur dans la banque de gènes) permettant de les relier aux données d'identification et à toute autre information collectée, garantissant ainsi l'authenticité de l'échantillon.

Bien qu'il ne soit pas possible de garantir que le matériel végétal collecté *in situ* soit parfaitement sain (exempt de maladies et d'infestation par des insectes nuisibles), il est important que les propagules prélevés à partir de végétaux apparemment sains soient exempts de maladie, d'infestation par des insectes nuisibles ou d'endommagement. Le matériel propre provenant de sources certifiées doit être entreposé sous abri grillagé afin d'éviter que les insectes n'infestent les végétaux propres et n'entraînent la propagation de pathogènes. Lors de la collecte, l'opérateur doit aussi éviter l'épuisement de la population naturelle ciblée. Il peut aussi s'avérer utile de répéter l'échantillonnage d'un site donné afin d'optimiser la capture de la variabilité génétique pouvant être présente à divers moments (Guarino *et al.*, 1995). Au cours de la phase de collecte d'échantillons de plantes vivaces multipliées par voie végétative, notamment les pousses qui conviennent au prélèvement de boutures et de greffes, il est conseillé de stimuler la formation de pousses appropriées en élaguant les troncs et les branches; ces pousses pourront être prélevées lors d'une deuxième visite.

Il est important de souligner que le temps mis pour transférer les semences originales vers la banque de gènes, à partir du moment de la collecte, est critique. Ceci est particulièrement vrai pour les espèces qui produisent des semences récalcitrantes et pour les stocks clonaux qui ne maintiennent pas leur viabilité pour très longtemps, ainsi que pour les propagules végétatifs qui pourrissent facilement. Dans certains cas, le matériel génétique doit être expédié sur de longues distances, par exemple lorsqu'il est acquis à l'étranger. Le temps d'expédition sera dûment pris en compte, y compris les temps de transit et de traitement, afin que les mesures appropriées soient mises en œuvre pour assurer que le matériel soit en bonne condition en arrivant à la banque de gènes receveuse. Les propagules (rejetons, graines ou boutures) doivent également être convenablement préparés afin d'améliorer la viabilité pendant le transport par courrier ou par colis. Par exemple, les semences récalcitrantes et les rejetons doivent être emballés dans du coton stérile ou d'autre matière appropriée, puis dans un sac en plastique perforé assurant une aération suffisante. Les semences doivent être protégées par un emballage rigide rembourré contre un éventuel écrasement par les trieuses de courrier mécaniques. Les deux extrémités taillées des rejetons propres doivent être emballées dans du film de paraffine afin de limiter les pertes en eau. Les collections en provenance des régions tropicales doivent être protégées des températures élevées au cours du transport.

Les collections en champ ne peuvent pas contenir de nombreux échantillons (voir les normes relatives à l'établissement d'une collection). La taille de l'échantillon sera donc généralement limitée par rapport à celle des semences orthodoxes. Néanmoins, tout doit être mis en œuvre pour maximiser la collection quant à la diversité génétique de la population cible. Toutefois, lors de la collecte effectuée pour une collection en champ, le collecteur devra décider du nombre de végétaux pouvant raisonnablement être prélevés au sein d'une population. Ce nombre dépendra largement du système de reproduction, du type et de la partie de la plante collectée.

Circonstances particulières

La collecte ne devra être effectuée que si elle s'inscrit dans le cadre des exigences légales, en particulier si le matériel génétique est ensuite exporté du pays. Dans l'éventualité où les matériels ne sont pas autorisés à quitter le pays pour cause d'exigences phytosanitaires, des efforts doivent être entrepris en vue de la création d'une collection en champ dans le pays d'origine et/ou la constitution de cultures *in vitro* qui conviennent mieux à l'exportation. Des marges doivent être prévues quant à la taille de l'échantillon, pour les espèces rares ou sauvages dont le matériel de propagation ne serait pas disponible en conditions ou en quantités optimales.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

- Alercia, A., Diulgheroff, S. et Mackay, M.** 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors (MCPD V.2)*. Rome, FAO et Bioversity International (disponible à l'adresse suivante: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).
- Bioversity International/ Food and Fertilizer Technology Center/TARI-COA (Taiwan Agricultural Research Institute-Council of Agriculture).** 2011. *A training module for the international course on the management and utilisation of field genebanks and in vitro collections*. Fengshan, Taïwan, TARI.
- Brown, A.H.D. et Hardner, C.M.** 2000. Sampling the gene pools of forest trees for *ex situ* conservation. Dans A. Young, D. Boshier et T. Boyle. *Forest conservation genetics. Principles and practice*, pp. 185-196. CSIRO et CABI.
- Bustamante, P.G. et Ferreira, F.R.** 2011. Accessibility and exchange of plant germplasm by EMBRAPA. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, S1: 95-98.
- Engelmann, F., éd.** 1999. *Management of field and in vitro germplasm collections*. Actes d'une réunion consultative, 15-20 janvier 1996. Cali, Colombie, CIAT, et Rome, IPGRI.
- FAO.** 1995. Collecting woody perennials. Dans L. Guarino, V.R. Rao et R. Reid, édés. *Collecting plant genetic diversity. Technical guidelines*, pp. 485-511. Wallingford, Royaume-Uni, CABI.
- Ferreira, F.R. et Nehra, N.** 2011. *Forestry germplasm exchange and quarantine in Brazil*. Dans Society of American Foresters, National Convention, Honolulu, Hawaii, États-Unis, 2-6 novembre 2011 (disponible à l'adresse suivante: <http://www.eforester.org/natcon11/program/2011conventiononsitebook.pdf>).
- Frison, E.A. et Taher, M.M., édés.** 1991. *FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm*. Rome, FAO et IBPGR.
- Guarino, L., Rao R., V. et Reid, R., édés.** 1995. *Collecting plant genetic diversity. Technical guidelines*, Wallingford, Royaume-Uni, CABI.
- Marshall, D.R. et Brown, A.H.D.** 1975. Optimum sampling strategies in genetic resources conservation. Dans O.H. Frankel et J.G. Hawkes, édés. *Crop genetic resources for today and tomorrow*, pp. 3-80. Cambridge, Royaume-Uni, Cambridge University Press.
- Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. et Engels, J.M.M.** 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, IPGRI.
- Said Saad, M. et Rao, V.R., édés.** 2001. *Establishment and management of field genebank training manual*. Serdang, Malaisie, IPGRI-APO.
- SGRP-CGIAR.** Crop Genebank Knowledge Base. Banques de gènes en champ (disponible à l'adresse suivante: http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).
- Veiga, R., Ares, I., Condon, F. et Ferreira, F.R.** 2010. Intercâmbio seguro de recursos fitogenéticos. Dans *Estrategia en los recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur/IICA*, pp. 75-83. Montevideo, PROCISUR, IICA.
- Walter, B.M. et Cavalcanti, T.B.** 2005. *Fundamentos para a coleta de germoplasma vegetal*. D.F. Brasil, Embrapa Recursos Genéticos.

5.3 Normes relatives à l'établissement de collections en champ

Normes

- 5.3.1 Il convient de maintenir un nombre suffisant de végétaux afin de capturer la diversité génétique présente au sein de l'accession et d'en assurer la sécurité.
- 5.3.2 Chaque banque de gènes doit posséder un plan détaillé indiquant la localisation exacte des accessions au sein des parcelles.
- 5.3.3 Les pratiques culturales appropriées doivent être respectées tout en tenant compte du microenvironnement, de la date de plantation, des porte-greffes, de l'arrosage et du contrôle des organismes nuisibles, des maladies et des mauvaises herbes.

Informations générales

Il est difficile de fournir des normes spécifiques pour l'établissement d'une collection en champ. Celles-ci dépendront en grande partie de la nature des espèces que l'on souhaite conserver. Des normes spécifiques aux espèces devront être élaborées selon les caractéristiques biologiques de l'espèce, la phénologie, le mode de reproduction et la structure de la population. Trois éléments doivent être pris en compte lors de l'établissement d'une collection en champ: a) le nombre de végétaux conservés par accession; b) l'agencement des végétaux au sein de la banque de gènes; c) les pratiques culturales à observer pour garantir des conditions de croissance optimales des accessions des collections.

Aspects techniques

La décision concernant le nombre de végétaux à être plantés par accession dans une banque de gènes repose sur l'équilibre entre la nécessité de préserver la diversité

génétique des accessions, l'attention portée à l'espace, les besoins en matière de caractérisation et les conditions économiques de la collection en champ. Cette décision ne sera pas la même si les plantes sont annuelles ou vivaces et si elles sont propagées par des semences ou par voie végétative. Pour les espèces à semences, l'échantillon doit être suffisamment grand pour capturer la diversité génétique de l'accession collectée. Il est à noter que lors de la collecte de semences non orthodoxes, une stratégie d'échantillonnage appropriée doit être élaborée, donnant la priorité aux plantes destinées à la collection. En effet, une collection en champ peut difficilement héberger de nombreuses « diversités génétiques intrinsèques aux accessions ». Pour les espèces multipliées par voie végétative, un petit nombre de végétaux suffit à représenter la diversité génétique de l'accession et à en garantir la sécurité. Cependant, davantage de végétaux peuvent être nécessaires lorsque la diversité interne à la population est supérieure à la diversité entre populations. La taille de l'échantillon peut aussi dépendre de l'objectif pour lequel la collection a été constituée, par exemple l'évaluation et/ou la distribution. Les nombres d'individus par accession diffèrent alors selon les objectifs de conservation.

Lors de l'établissement d'une collection en champ, il est très important de savoir quelles accessions ont été plantées et à quels endroits. Un agencement convenablement planifié ainsi qu'un plan du terrain bien préparé amélioreront l'efficacité de l'utilisation de l'espace et de la gestion de la collection. L'emplacement des accessions individuelles doit être clairement précisé. À cet égard, la phase d'établissement de la collection en champ doit inclure l'agencement et la conception des parcelles, les versions électronique et imprimée des plans ainsi que les codes-barres et étiquettes des terrains. Il faut veiller à ce que les accessions soient placées dans le microenvironnement le plus approprié au sein de la banque de gènes. Certains végétaux requièrent des conditions environnementales particulières. Il peut être nécessaire de les placer sous serre afin de mieux contrôler leur environnement (notamment afin d'éviter la chaleur ou le froid), ou à l'ombre d'autres végétaux.

Lors du calcul de la taille des parcelles, il faut tenir compte des modes de croissance et de la taille adulte des végétaux ainsi que des structures d'arrosage et de la facilité d'entretien. Pour les espèces vivaces, les plantes doivent être correctement espacées à l'intérieur des parcelles afin de permettre une croissance convenable de chaque plante (telles que les arbres) et d'éviter le mélange avec les cultures qui développent des tubercules ou de long stolons souterrains. Par ailleurs, des barrières physiques devront être installées entre les parcelles afin d'éviter le mélange (dispersion des gènes), par exemple en plantant des espèces différentes avec lesquelles le croisement n'est pas possible. Ceci permet d'éviter la compétition qui affaiblirait les végétaux ou favoriserait la dissémination rapide de maladies ou d'insectes nuisibles. Il peut s'avérer nécessaire de planter les clones envahissants dans des bacs, des pots ou des boîtes afin de réduire le mélange ou la compétition avec les accessions moins vigoureuses. Il est préférable de planter les accessions présentant des morphologies facilement reconnaissables dans des parcelles adjacentes, en cas de problème de dissémination des bulbilles et des graines entre les parcelles. Pour les espèces à pollinisation croisée, il convient de respecter une distance d'isolement suffisante entre les parcelles contenant des accessions différentes ou

d'utiliser des cages d'isolement afin de préserver l'intégrité génétique de toute semence collectée pour la distribution.

Il faut souligner que l'agencement et le plan du terrain ne sont pas figés dans le temps et changent selon les programmes de plantation. Pour les plantes annuelles, la rotation est essentielle et nécessite une planification convenable et un espace additionnel. Il est également important de concevoir l'agencement de façon à ce qu'il n'y ait pas de dérive de pesticides dans l'environnement immédiat.

Pour les collections en champ, il est extrêmement important de disposer d'étiquettes annotées de façon claire et correcte sur deux badges imperméables et indélébiles. Les étiquettes doivent contenir les informations concernant la date, le nom usuel et le numéro de la collection en champ. Il est préférable d'utiliser des étiquettes imprimées par ordinateur afin de minimiser les erreurs de transcription des noms et des numéros. Les plans cadastraux (en versions imprimée et électronique) sont des documents essentiels pour les banques de gènes et servent de sauvegarde pour les étiquettes en champ qui se perdent ou se détruisent facilement. Ces plans doivent être élaborés avant la plantation et régulièrement mis à jour.

Lors de l'établissement de collections en champ, il faut impérativement adopter les pratiques culturales appropriées, spécifiques à chaque espèce, afin de garantir la réussite de l'établissement des plantes. Les matériels végétaux doivent être soigneusement sélectionnés. La sélection exclusive de végétaux forts pour la banque de gènes peut entraîner une diminution de la variation génétique. La qualité phytosanitaire du matériel de plantation de départ est extrêmement importante pour la plantation de nouveaux champs, la transplantation dans des parcelles vides ou encore le rajeunissement de collections entières, à condition qu'aucune sélection génétique ne soit prévue. Seuls le matériel sain et les parties vigoureuses des plantes doivent être utilisés. Des règles d'hygiène simples doivent être observées pour la préparation des matériels de plantation, notamment l'utilisation d'outils propres et désinfectés. Dans la mesure du possible, il faut envisager, avant l'établissement, un indexage des maladies non apparentes telles que les virus et les pathogènes transmis par les greffes (notamment les viroïdes, les phytoplasmes et les organismes non identifiés).

Les végétaux doivent être plantés au moment opportun. Il convient de suivre les recommandations concernant les dates de plantation des différentes espèces en provenance de régions diverses. Ces recommandations tiennent généralement compte des conditions optimales d'établissement des végétaux, notamment de la température, des degrés d'humidité, du type de sol, des porte-greffes, etc. Pour les végétaux multipliés par greffe, il faut veiller à uniformiser les porte-greffes afin de procéder à la greffe de tous les échantillons au moment opportun. Chaque espèce est greffée sur un porte-greffe de la même espèce ou un porte-greffe étroitement apparenté dont la compatibilité a été prouvée. Le même porte-greffe doit être utilisé pour toutes les accessions de la même espèce. Les porte-greffes doivent être choisis en fonction de leur adaptation aux caractéristiques du sol et de l'influence minimale sur le comportement du matériel greffé. Les arbres doivent être plantés sur leurs propres racines et ne doivent pas être greffés, sauf si l'usage de porte-greffe est nécessaire à la prévention des maladies ou si la greffe constitue le mode de culture normal d'une espèce.



Les cultures nécessitant une pollinisation croisée doivent être plantées en groupes, répartis selon la date de floraison. Chez les espèces dioïques, il convient de planter des quantités appropriées de végétaux mâles et femelles. Pour les espèces incompatibles entre elles et multipliées par voie végétative, le conservateur doit connaître le système d'auto-incompatibilité (SI) de l'espèce et la combinaison d'allèles nécessaire pour obtenir une bonne collection en champ et garantir la formation de graines et de fruits. Au cours de l'établissement de collections en champ, il est également important de respecter les procédures de traitement du terrain (mesures agrotechniques).

Certaines espèces ont besoin d'un soutien supplémentaire tel que la plantation d'arbres fournissant de l'ombre, selon un agencement approprié (par exemple pour

le café). Cet agencement devra être choisi en fonction des conditions locales et des exigences de l'espèce. Certaines espèces poussent sous forme de lianes (par exemple la vanille, de nombreux haricots, les cucurbitacées et autres) et nécessitent des arbres, des tiges de bois, des câbles ou d'autres installations. Il peut être nécessaire d'installer des plates-bandes spéciales pour certaines espèces (principalement celles des climats arides), par exemple des « plates-bandes surélevées » ou des couvertures protégeant des précipitations pendant certaines périodes de l'année, ou pour les périodes spéciales requérant de l'ombre, les périodes d'arrosage ou d'inondation, de gel, etc. Certaines espèces d'arbres fruitiers nécessitent un élagage régulier afin d'exprimer leur apparence caractéristique et de rester en bonne santé. L'utilisation de porte-greffes nanisants est une pratique fortement encouragée pour l'arboriculture.

Circonstances particulières

Certains génotypes répondent parfois mal aux méthodes générales de propagation établies pour des types d'espèces particuliers. Des recherches doivent alors être entreprises pour développer de nouvelles méthodologies. Un intermédiaire doit être utilisé pour les plantes multipliées par porte-greffe et se trouvant sur un site de plantation nécessitant l'utilisation d'une espèce étroitement apparentée comme porte-greffe.

Il est important d'envisager une duplication de la collection sur un autre site (voir les normes relatives à la duplication de sécurité). Il arrive que certains génotypes vivant à l'ombre des arbres d'une forêt ou pouvant être sensibles aux maladies, ne s'adaptent pas correctement aux conditions de plein ensoleillement du terrain. Il faut donc leur fournir suffisamment d'ombre. Cette situation est aggravée par les contraintes de ressources, ce qui attribue un double rôle aux collections en champ (conservation et amélioration des cultures) et peut mener à des conflits, notamment dans l'agencement de la banque de gènes, la gestion, la duplication de l'accession. Lorsque le maintien des duplications en champ est difficile, une option possible est d'établir des doublons sous forme de cultures *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. et Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, IPGRI.

Sebbenn, A.M. 2002. Número de árvores matrizes e conceito genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. *Revista do Instituto Florestal de São Paulo*, V.14(2): 115-132.

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base. Banques de gènes en champ (disponible à l'adresse suivante: http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).

5.4 Normes relatives à la gestion des terrains

Normes

- 5.4.1 Les plantes et le sol doivent être régulièrement surveillés en ce qui concerne les organismes nuisibles et les maladies.
- 5.4.2 Les pratiques culturales appropriées, telles que la fertilisation, l'irrigation, l'élagage, le treillage, les porte-greffes et le désherbage doivent être mises en œuvre pour assurer une croissance végétale satisfaisante.
- 5.4.3 L'identité génétique de chaque accession doit être surveillée. Il convient notamment d'assurer un isolement correct des accessions, de prévenir les croisances entre les accessions, d'utiliser un étiquetage et des plans cadastraux corrects et d'évaluer périodiquement l'identité à l'aide de techniques morphologiques et moléculaires.

Informations générales

La gestion des terrains est la conservation quotidienne des collections en champ permettant d'assurer la bonne santé, l'accessibilité et la disponibilité des accessions végétales. Cette gestion comprend diverses activités telles que le contrôle des organismes nuisibles et des maladies, la bonne nutrition des végétaux, l'arrosage, l'élagage et la surveillance des accessions afin d'assurer l'intégrité génétique des collections.

Aspects techniques

Les pertes de matériel génétique imputables à une mauvaise santé peuvent constituer une cause importante d'érosion génétique au sein des collections en champ. L'entretien

d'accessions végétales saines au sein des collections de matériel génétique représente un défi majeur, en particulier lorsque les accessions sont collectées à partir d'une vaste région de distribution comportant divers organismes nuisibles et maladies. Lorsqu'elles ne sont pas gérées convenablement, les accessions se trouvant au sein des collections peuvent aussi être une source/foyer de dissémination d'organismes nuisibles et de maladies. Il est donc important d'exercer un contrôle strict des introductions de végétaux dans la collection en champ. Il faut également tenir compte des niveaux historiques et récents des populations d'insectes et de maladies. Les contrôles minutieux et l'enregistrement des données sont très importants pour toutes les opérations de lutte contre les organismes nuisibles. Le moment choisi pour le contrôle des maladies est également de la plus haute importance car une fois le matériel végétal infecté, les dégâts sont souvent irréversibles. La modélisation des scénarios climatiques et des maladies peut aussi aider au contrôle des organismes nuisibles et des maladies émergents.

Selon les collections cibles, les insectes nuisibles et les maladies peuvent comprendre un éventail important d'organismes. Les organismes nuisibles les plus couramment associés au matériel génétique végétal comprennent les insectes, les acariens, les moisissures, les nématodes, les virus, les viroïdes, les spiroplasmes, les phytoplasmes, les limaces, les escargots et les mauvaises herbes. Les plantes multipliées par voie végétative peuvent être infectées par des virus, ce qui conduit à une diminution de la force, de la vigueur et à une incompatibilité au greffage. Au cours de la quarantaine ou de la maintenance, les insectes nuisibles et les maladies peuvent être détectés par des techniques diverses telles que l'examen visuel, l'isolement sur plaque de gélose/méthode des stries, l'incubation en chambre humide, la greffe, les dosages biologiques, l'examen au microscope électronique et les kits de diagnostic végétal. Ces derniers peuvent comporter des dosages immunoenzymatiques (ELISA) faciles à utiliser et déjà disponibles pour les tubercules (manioc, pomme de terre, betterave), les fruits (banane, fruits à pépins, fruits à noyaux et baies) et les légumes. Les principales maladies bactériennes et fongiques doivent être contrôlées par des méthodes préventives ou prophylactiques. Les kits de diagnostic génétique sont également très efficaces pour la détection de maladies à travers l'analyse par PCR des gènes spécifiques aux pathogènes. Il est recommandé de faire effectuer ces tests par un personnel formé en agronomie, horticulture, micropropagation ou pathologie.

Les accessions sensibles aux insectes nuisibles et aux maladies doivent être correctement identifiées au moment de la livraison. Les collections en champ doivent impérativement disposer d'un système d'identification de tous les organismes nuisibles et maladies associés à l'éventail de cultures contenues dans la collection, en particulier pour les cultures sensibles à des pathogènes de quarantaine à haut risque. Les banques de gènes doivent aussi disposer de procédures pour l'application des méthodes de diagnostic permettant l'évaluation rigoureuse de l'état des organismes nuisibles et des maladies, tel que l'ordonnent les exigences locales, régionales et nationales. Dans l'éventualité où une banque de gènes ne disposerait pas de telles procédures, ces tâches doivent être sous-traitées à des institutions spécialisées dans la mise en quarantaine des plantes entrantes.

Le personnel de la banque de gènes doit appliquer les pratiques de gestion qui permettent de diminuer le risque de propagation de maladies au sein de la collection.

Les outils et instruments, le sol et les chaussures doivent être correctement désinfectés. Dans la mesure du possible, il est recommandé d'adopter l'approche de gestion intégrée des nuisibles (GIN), ayant principalement recours au contrôle biologique, complété par l'utilisation de pesticides et le contrôle mécanique. Il peut s'avérer très important de détecter dans le matériel clonal les virus et autres pathogènes transmis par les greffes; les technologies de détection s'étant par ailleurs beaucoup améliorées ces dix dernières années. En cas d'infection de plantes particulières, celles-ci doivent être désinfectées par thermothérapie et/ou par culture de tissus. Afin d'éviter des traitements coûteux, il est toujours recommandé de se procurer du matériel similaire provenant de sources « propres » ou moins infectées.

Le personnel de gestion de la collection en champ doit adopter une attitude proactive pour répondre aux besoins particuliers de matériels génétiques variés. Après la plantation de la parcelle, le personnel doit assister la croissance des plantes simplement en veillant au maintien des conditions favorables à leur développement. Pendant la saison sèche, l'arrosage régulier des plantes est beaucoup plus important que l'ajout d'engrais. Le système d'irrigation doit être approprié au type de plante et aux conditions écologiques de l'endroit où se situe le terrain. La fertilisation de la collection en champ est compliquée par la culture simultanée de différents types de plantes. Chaque type de plante a des besoins nutritifs spécifiques du fait des différences génétiques, de la taille ou de l'âge. On peut donc avoir recours à des mélanges composés, en utilisant des doses faibles par plante et en s'assurant d'une distribution adéquate. L'application de petites quantités à des intervalles réguliers peut s'avérer plus efficace qu'une quantité totale équivalente, appliquée à des intervalles de plusieurs mois. La plupart des plantes doivent être élaguées afin de conserver une taille acceptable au sein de la plantation. L'élagage des arbres permet de donner forme à la canopée. Parfois un léger éclaircissement suffit à créer l'espace nécessaire à un développement correct sans compétition excessive pour la lumière. Cette opération de modelage et d'éclaircissement doit être confiée à une personne expérimentée. Du fait de son importance, une collection de matériel génétique requiert une main-d'œuvre très qualifiée; l'entretien des champs doit également être effectué par un personnel formé.

La concurrence des mauvaises herbes est un problème beaucoup plus grave chez les plantes jeunes dont le système racinaire est moins profond, que chez les plantes âgées. Le contrôle des mauvaises herbes est essentiel à une croissance végétale rapide et vigoureuse. Les mauvaises herbes peuvent être contrôlées par des moyens mécaniques ou par l'utilisation de produits chimiques (herbicides). Les herbicides peuvent permettre de réduire à un minimum le recours au travail manuel et au labourage mécanique. Le mode de contrôle des mauvaises herbes doit être conforme aux recommandations établies pour chaque espèce.

Pour certaines accessions, d'autres pratiques de protection sont nécessaires, notamment l'utilisation de serres pour la protection contre la grêle et le gel, ou contre les insectes vecteurs de maladies. L'ablation des fruits est également une pratique de gestion importante pour le contrôle des maladies car elle permet d'éviter la compétition avec les cultures de l'année suivante et diminue le stress exercé sur la plante.

Afin de garantir l'intégrité génétique de chaque accession, il faut éviter toute contamination entre accessions, toute dispersion de gènes provenant des plantes voisines et toute croissance entre accessions. Des accessions de collections en champ produisent parfois des fleurs et des graines susceptibles de tomber et de pousser dans la parcelle. Il est possible que ces graines ne soient pas pures du fait de leur hétérozygote ou d'une pollinisation croisée. De telles productions spontanées de graines ne doivent pas être permises ou doivent être éliminées. Une surveillance et des contrôles périodiques doivent être réalisés afin de s'assurer que chaque accession est correctement identifiée et localisée sur le terrain. L'étiquetage est extrêmement important et doit être constamment vérifié sur le site et comparé aux plans des parcelles de la collection en champ. Les étiquettes doivent être claires, concises et aussi imperméables que possible. L'utilisation de codes-barres ou d'étiquettes générées par ordinateur est encouragée car elle permet de réduire les erreurs de transcriptions. L'identité de chaque accession doit être vérifiée périodiquement, autant que possible à l'aide de marqueurs morphologiques et moléculaires (voir les normes relatives à la caractérisation).

Les pratiques d'entretien sont généralement spécifiques aux cultures et peuvent varier selon l'utilisation envisagée pour la collection (conservation, évaluation, distribution). Toutes les accessions de matériel génétique doivent être surveillées. Cependant, la fréquence de surveillance dépend de la nature de la plante; les plantes herbacées nécessitant une fréquence plus élevée que les plantes ligneuses. Tous les matériels génétiques doivent être surveillés quant aux organismes nuisibles nouveaux - animaux, insectes ou maladies - susceptibles d'être introduits dans les collections de matériel génétique. Tous les matériels génétiques doivent également être surveillés contre le vandalisme (voir les normes relatives à la sécurité).

Circonstances particulières

Le manque d'expertise des banques de gènes dans la gestion des organismes nuisibles et des maladies peut représenter un important facteur limitant au maintien de plantes saines au sein de la collection. Le recours à des phytopathologistes qualifiés peut alors être nécessaire. Les banques de gènes doivent disposer de plans d'urgence pour la gestion des épidémies. Elles doivent être en relation avec des services de pathologie végétale spécialisés tels que les autorités nationales de pathologie végétale et les laboratoires universitaires ou commerciaux, tous susceptibles de fournir les services requis.

La rotation des sites de plantation est également une bonne pratique (lorsqu'elle est réalisable, en particulier pour les espèces propagées annuellement et les plantes vivaces très sensibles aux maladies du sol). Elle permet de diminuer la perpétuation de tout organisme nuisible et maladie du sol. Une alternative est la désinfection du sol. Dans certains cas, les plantes peuvent être cultivées en pépinière, où les conditions phytosanitaires sont plus faciles à gérer, et être plantées aux champs après s'être acclimatées.

Certaines accessions peuvent être très précieuses et très vulnérables aux pathogènes. Il est donc important de les maintenir sous serre et de conserver des doublons *in vitro* ou en cryoconservation, comme sauvegarde complémentaire de conservation.

Le désherbage manuel peut être nécessaire lorsque les plantes sont susceptibles d'être abîmées par les applications d'herbicide. Pour la régénération, il est conseillé d'utiliser des sites ne favorisant pas le développement des organismes nuisibles et des maladies.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Mathur, S.B. et Kongsdal, O. 2003. *Common laboratory seed health testing methods for detecting fungi*. Bassersdorf, Suisse.

Navarro, L. 1988. Application of shoot-tip grafting *in vitro* to woody species. *Acta Horticulturae*, 227: 43-55.

Navarro, L., Civerolo, E.L., Juárez J. et Garnsey, S.M. 1991. Improving therapy methods for citrus germplasm exchange. Dans R.H. Brlansky, R.F., Lee et L.W. Timmer, éd. *Proceedings of XI Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, pp. 400-408. Riverside, Floride, États-Unis.

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. et Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, IPGRI.

Roistacher, C.N., Navarro, L. et Murashige, T. 1976. Recovery of citrus selections free of several viruses, exocortis viroid, and Spiroplasma citri by shoot-tip grafting *in vitro*. *Proceedings of VII Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, pp.186-194. Riverside, Floride, États-Unis.

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base. Banques de gènes en champ (disponible à l'adresse suivante: http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).

Sheppard, J.W. et Cockerell, V. 1996. *ISTA PDC handbook of method validation for the detection of seedborne pathogens*. Bassersdorf, Suisse, ISTA.

Sutherland, J.R., Diekmann, M. et Berjak, P. 2002. *Forest tree seed health*. IPGRI Technical Bulletin No. 6. Rome, IPGRI.

5.5 Normes relatives à la régénération et à la propagation

Normes

- 5.5.1 Chaque accession de la collection en champ doit être régénérée lorsque la force des plantes et/ou leur nombre a diminué jusqu'à atteindre des seuils critiques. La régénération permet ainsi de restaurer les seuils d'origine et d'assurer le maintien de la diversité et de l'intégrité génétique.
- 5.5.2 La propagation doit être effectuée à l'aide de matériel végétal conforme au type.
- 5.5.3 Les informations concernant les cycles et les procédures de régénération des végétaux doivent être correctement documentées et incluses dans le système d'information de la banque de gènes, notamment la date, l'authenticité des accessions, les étiquettes et les cartes des emplacements.

Informations générales

Dans le contexte des collections en champ, les termes régénération et propagation se réfèrent au ré-établissement des échantillons de matériel génétiquement semblable à celui la collection originale, lorsque la force et le nombre de végétaux sont faibles (Dulloo *et al.*, 2008). Les normes relatives aux procédures de régénération et de propagation doivent être spécifiques aux espèces. Il convient d'utiliser les protocoles et directives mis en place pour les espèces particulières lorsque ceux-ci sont disponibles. La régénération et la propagation doivent être effectuées dans le but d'assurer qu'il n'y ait pas de perte de plantes au sein de la collection. Cependant, la perte de tout individu entraînera inévitablement une érosion génétique au sein de l'accession car chaque accession ne contient généralement que peu de plantes (voir les normes relatives à l'établissement d'une collection - taille des échantillons). La régénération et la propagation sont onéreuses et doivent donc être planifiées avec soin. Elles peuvent nécessiter un changement de site pour des raisons de sécurité ou pour éviter les maladies, les organismes nuisibles et les pathologies du sol.

Aspects techniques

La régénération et la propagation peuvent être nécessaires pour diverses raisons et dépendent du type de plante, des menaces existantes et des besoins en matière de distribution. Divers facteurs peuvent entraîner la perte de vigueur végétative et même la mort des plantes, notamment les facteurs climatiques, édaphiques et/ou biologiques. Toute plante morte doit impérativement être remplacée, pour un rendement maximum des parcelles de collection en champ. Ceci est particulièrement important du fait du nombre généralement faible d'individus par accession dans les collections en champ (voir les normes relatives à l'établissement de collections en champ).

La méthode de propagation des espèces cibles est une préoccupation importante. Certaines espèces peuvent être propagées par voie sexuée alors que d'autres espèces sont multipliées par voie végétative. En principe, les semences ne doivent pas être utilisées pour la propagation dans une collection en champ, même si les plantes peuvent se reproduire par voie sexuée, à moins que la taille de la population ne soit représentée par un assez grand nombre d'individus. L'objectif de la régénération étant de préserver l'intégrité génétique de l'accession et sachant qu'il n'y a qu'un nombre limité de plantes par accession, la multiplication par voie sexuée peut entraîner une dérive génétique importante au sein de l'accession. Par ailleurs, pour les espèces à pollinisation croisée, les croisements entre accessions peuvent réduire de manière significative la variance génétique entre celles-ci et modifier l'intégrité de chacune des accessions. Dans la mesure du possible, les plantes doivent être multipliées par voie végétative, auquel cas chaque rejeton est identique au parent, préservant ainsi l'intégrité génétique de l'accession.

Le moment le plus approprié pour la régénération est aussi un facteur important qui dépend souvent du climat et de la saison de plantation de la culture. La FAO a publié une série de calendriers pour les cultures d'Amérique Latine et d'Afrique (FAO, 2004, 2012). Ces calendriers peuvent servir de guide utile à la détermination du moment approprié pour la plantation et donc pour la régénération. Les calendriers de cultures de la FAO fournissent des informations pour plus de 130 cultures situées dans 283 zones agroécologiques et 44 pays. Encore une fois, le moment opportun sera spécifique de l'espèce et éventuellement du site. Une bonne indication du meilleur moment pour commencer la propagation est le moment où les propagules commencent à germer ou lorsque les plantes mères commencent à mourir constamment. Une autre préoccupation est celle de la repousse de la collection. En effet il faut déterminer si les repousses seront laissées libres ou non de se développer pour produire la culture suivante, comme dans le cas des aroïdées (Jackson, 2008).

La propagation doit être effectuée à l'aide de matériel végétal sain et conforme au type. Toute plante nouvelle doit être régénérée par du matériel conservé dans des installations spécialisées (serres, *in vitro* ou congélateur), afin d'en préserver la santé. Il convient d'utiliser des protocoles et directives relatifs aux espèces particulières, lorsque ceux-ci sont disponibles. La régénération des accessions d'espèces exogames doit être effectuée en isolement dans des installations spécialisées, protégées des mauvaises herbes, des organismes nuisibles et des maladies.

Il est important que toutes les informations relatives à la régénération de l'accession soit convenablement documentées et incluses dans le système de documentation de la banque de gènes. Elles doivent comporter notamment les informations concernant le numéro de l'accession et le numéro de séquence des plantes au sein de chaque accession, le site de régénération, le type de propagation et les matériels utilisés (boutures, tubercules, cormes, bulbes), la date de plantation, le taux de survie des matériels propagés, le protocole d'interruption de la dormance des semences, les pratiques de gestion utilisées, la méthode de plantation, les conditions du champ, le nombre de plantes établies et les dates de récoltes.

Circonstances particulières

Les facteurs climatiques nuisent davantage aux jeunes plantes qu'aux plus anciennes. Quelques plantes risquent d'être perdues au cours de la première année pour des raisons diverses. Il est donc sage d'en planter quelques-unes en réserve, pour servir de remplacement en cas de besoin. On s'assure ainsi de disposer de plantes du même type et du même âge que les originales pour le remplacement d'individus perdus.

Les collections en champ sont extrêmement vulnérables aux perturbations climatiques et environnementales diverses. Il est donc très important de disposer d'un plan de secours pour une régénération urgente de la collection. Une collection de sauvegarde de sécurité peut être préservée *in vitro* ou cryoconservée à titre de précaution complémentaire. Des situations d'urgence peuvent également se produire avec les espèces sauvages apparentées aux cultures ainsi qu'avec les espèces indigènes. Des protocoles de régénération n'ont pas encore été mis au point pour ces espèces. Celles-ci peuvent souvent nécessiter des traitements différents de ceux des espèces cultivées.



BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Costa, N., Plata, M.I. et Anderson, C. 2004. Plantas cítricas libres de enfermedades. Dans V. Echenique, C. Rubistein et L. Mroginski, éd. *Bioteconología y Mejoramiento vegetal*, pp. 317-318. Argentina, INTA.

Dulloo, M.E., Thormann, I., Jorge, A.M. et Hanson J., éd. 2008. *Crop specific regeneration guidelines*. [CD-ROM], Rome, SGRP-CGIAR.

FAO. 2004. *Calendario de cultivos. América Latina y el Caribe*. Estudio FAO producción y protección vegetal núm. 186. Rome.

FAO. 2012. *Calendrier cultural* (disponible à l'adresse suivante: <http://www.fao.org/agriculture/seed/cropcalendar/welcome.do>).

ICRISAT (Institut international de recherche sur les cultures des zones tropicales semi-arides). Germplasm regeneration (disponible à l'adresse suivante: <http://www.icrisat.org/what-we-do/genebank/genebank-manual/germplasm-regeneration-9.pdf>).

Jackson, G.V.H. 2008. Regeneration guidelines: major aroids. Dans M.E. Dulloo, I. Thormann, A.M. Jorge et J. Hanson éd. *Crop specific regeneration guidelines*. [CD-ROM], Rome, SGRP-CGIAR.

Plata, M.I. et Anderson, C.M. 2008. In vitro *blueberry* (*Vaccinium* spp.) *germplasm management in Argentina*. 9th International *Vaccinium* Symposium, ISHS, Corvallis, Oregon, États-Unis.

Sackville Hamilton, N.R. et Chorlton, K.H. 1997. *Regeneration of accessions in seed collections: a decision guide*. J. Engels, éd. Handbooks for Genebanks No. 5. Rome, IPGRI.

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base. Banques de gènes en champ (disponible à l'adresse suivante: http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).

5.6 Normes relatives à la caractérisation

Normes

- 5.6.1 Toutes les accessions doivent être caractérisées.
- 5.6.2 Un nombre représentatif de plantes doit être utilisé pour la caractérisation de chaque accession.
- 5.6.3 Les accessions doivent être caractérisées sur le plan morphologique à l'aide des listes de descripteurs convenues au niveau international. Les outils moléculaires sont également importants pour la confirmation de l'identité de l'accession et de la conformité au type.
- 5.6.4 La caractérisation est fondée sur des formats de mesure tels que ceux fournis dans les descripteurs utilisés au niveau international.

Informations générales

La caractérisation est la description du matériel phylogénétique. Elle constitue un outil de description et de création de l'empreinte génétique des accessions, de confirmation de leur conformité au type et d'identification de doubles au sein d'une collection. Elle détermine l'expression de caractères hautement héréditaires allant des aspects morphologiques, physiologiques ou agronomiques, y compris certaines caractéristiques agrobotaniques telles que la taille de la plante, la morphologie des feuilles, la couleur des fleurs, les caractéristiques des graines, la phénologie et la capacité des plantes vivaces à hiverner. Ces informations sont essentielles aux conservateurs et leur permettent de reconnaître les échantillons au sein d'une collection.

Pour les collections en champ, la caractérisation peut être réalisée à n'importe quel stade du processus de conservation. Cependant, il est essentiel que les accessions conservées soit connues et décrites de façon aussi étendue que possible afin de garantir leur utilisation maximale par les sélectionneurs et les parties concernées. Par conséquent, la caractérisation

doit être effectuée dès que possible pour ajouter de la valeur à la collection. Le temps variera selon les espèces, dépendant de leur cycle de vie. Le recours à une série minimale de descripteurs phénotypiques, physiologiques et morphologiques ainsi qu'à des informations relatives au système de reproduction, sélectionnées à partir des listes de descripteurs utilisées au niveau international (telles que celles publiées par Bioversity International, l'UPOV et USDA-ARS NPGS), permet d'augmenter l'utilité et le référencement croisé des données issues de la caractérisation.

Compte tenu des avancées des biotechnologies, la science des marqueurs moléculaires et la génomique sont de plus en plus utilisées en caractérisation (De Vicente *et al.*, 2004). La caractérisation permettra d'identifier la conformité au type, de détecter la dispersion des gènes et d'établir des profils de référence, d'identifier les erreurs d'étiquetage et les duplications et de détecter la diversité au sein des accessions et entre ces dernières, ainsi que le coefficient de parenté. Il peut être nécessaire de recourir à des méthodes comme la subdivision des échantillons pour assurer la préservation des allèles rares ou améliorer l'accès à des allèles donnés. Il est extrêmement important de conserver une trace des observations réalisées et des mesures effectuées.

Aspects techniques

Contrairement aux collections de semences, la caractérisation phénotypique des collections en champ est plus facile à réaliser étant donné que les plantes sont aux champs et que l'annotation des traits pertinents pour la caractérisation peut être faite au moment approprié et répétée au fil des ans.

Certaines données pertinentes peuvent être obtenues lors de collectes aux champs. La date des expéditions doit donc être soigneusement programmée. Les accessions pourraient alors être caractérisées côte à côte au moment de la collecte au champ. Lors d'expéditions de collecte, les données historiques et culturelles obtenues auprès des fermiers, des botanistes, des horticulteurs ou des autochtones fournissent généralement des informations précieuses. Les connaissances locales concernant l'origine de l'accession et la résistance aux maladies et aux insectes peuvent permettre de diminuer les coûts liés à la caractérisation et de limiter la duplication.

Les descripteurs des cultures sont définis par des spécialistes des cultures et/ou des conservateurs, en consultation avec d'autres spécialistes des cultures et des gestionnaires de banques de gènes, quant à la pertinence d'une augmentation de l'utilisation des collections. De nombreuses listes de descripteurs ont été élaborées notamment par Bioversity International, l'UPOV, l'Organisation internationale de la vigne et du vin (OIV) et USDA-ARS NPGS et des séries minimales de descripteurs essentiels à l'utilisation du matériel génétique ont été établies pour de nombreuses cultures. L'enregistrement des données doit être confié à des professionnels qualifiés, qui doivent utiliser les formats calibrés et standardisés comme indiqué dans les listes de descripteurs. Les données doivent être validées par le conservateur et les officiers chargés de la documentation avant d'être téléchargées dans la base de données de la banque de gènes et mises à

la disposition du public, favorisant ainsi l'utilisation de la collection. Il est également reconnu que les accessions de référence plantées dans le même champ jouent un rôle essentiel dans l'évaluation des traits. Les collections de référence (spécimens d'herbier, images de référence de qualité) contribuent grandement à la vérification de la conformité au type.

Le nombre de plantes caractérisées au sein d'une accession doit constituer un échantillon représentatif qui dépend de sa diversité. Afin d'obtenir des mesures valides d'un point de vue statistique, il faut en général un minimum de 3 plantes pour les accessions hétérogènes alors qu'une à deux suffisent pour les plantes clonées¹. Chez les espèces sujettes aux mutations (telles que Citrus), des caractérisations annuelles des caractères essentiels doivent être effectuées afin de vérifier la conformité au type.

Compte tenu des avancées des biotechnologies, la science des marqueurs moléculaires et la génomique sont de plus en plus utilisées en caractérisation (De Vicente *et al.*, 2004), en association avec les observations phénotypiques, du fait des avantages qu'elles présentent, notamment la garantie de l'identité clonale des plantes, l'identification des erreurs d'étiquetage et des doublons et la détection de la diversité et des origines génétiques au sein d'une accession et entre accessions. Les données génotypiques obtenues à partir de la caractérisation du matériel génétique à l'aide de techniques moléculaires sont avantageuses par rapport aux données phénotypiques. En effet, les variations détectées dans les données génotypiques sont largement affranchies des influences environnementales (Bretting et Widrechner, 1995). Les technologies se développent aussi rapidement que leurs coûts diminuent, ce qui permet une utilisation plus étendue dans les collections en champ. Ces technologies doivent donc être utilisées autant que les ressources le permettent. Cependant, le manque de personnel ayant les compétences appropriées et le manque de ressources nécessaires aux frais de mise en place relativement élevés continuent d'être un frein à l'adoption répandue des marqueurs moléculaires comme méthode de choix pour l'évaluation du matériel génétique, en particulier dans les pays en voie de développement. De nombreux marqueurs et techniques sont disponibles (SSR, étiquettes de séquences exprimées-séquences répétées en tandem [EST-SSR, *expressed sequence tags-simple sequence repeats*], polymorphisme de longueur de fragments amplifiés [AFLP, *amplified fragment length polymorphisms*]) mais seuls les marqueurs bien établis et reproductibles tels que les SSR seront utilisés à des fins de caractérisation. Un large éventail d'amorces de marqueurs servant à la caractérisation a été élaboré pour de nombreuses cultures. Une série minimale de marqueurs essentiels a également été établie. Afin de s'assurer que les résultats des différents lots d'analyses sont comparables, quelques accessions de la banque de gènes doivent être incluses dans chaque lot en tant que référence. L'inclusion d'accessions de référence dans les caractérisations moléculaires joue également un rôle essentiel pour la comparaison des différentes banques de gènes. La sélection à l'échelle génomique (GWS, *genome-*

1 http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=47&Itemid=205&lang=english.

wide selection) est l'une des techniques les plus avancées utilisée pour l'amélioration des espèces d'arbres (Grattapaglia et Resende, 2011; Fonseca *et al.*, 2010). La GWS nécessite l'utilisation de marqueurs moléculaires permettant une large couverture du génome et un génotypage à haute densité. Bien que cette technique soit utilisée pour l'amélioration, l'information générée peut être utilisée pour caractériser et conserver de nouvelles accessions ou des génotypes supérieurs.

Circonstances particulières

La fiabilité des données peut varier selon les collecteurs en fonction de leur formation et de leur expérience. Un personnel technique formé et expérimenté dans le domaine des ressources phytogénétiques doit donc être disponible pendant toute la durée du cycle de croissance afin d'enregistrer et de documenter les données de caractérisation. Au cours du processus de caractérisation, il est également souhaitable de disposer d'une expertise en taxonomie, en biologie semencière, en pathologie végétale et en caractérisation moléculaire (en interne ou apportée par des instituts collaborateurs). Pour les cultures pour lesquelles il n'existe pas de listes de descripteurs utilisées au niveau international, il est nécessaire d'en élaborer en prenant comme référence les listes de descripteurs disponibles pour les cultures ou espèces apparentées.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

- Alercia, A., Diulgheroff, S. et Mackay, M.** 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors* (MCPD V.2). Rome, FAO et Bioversity International (disponible à l'adresse suivante: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).
- Bioversity International.** 2007. *Developing crop descriptor lists. Guidelines for developers*. Technical Bulletin No. 13. Rome.
- Bioversity International.** 2007. List of published crop descriptors (disponible à l'adresse suivante: <http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=168>).
- Bioversity International.** 2013. Descriptor lists and derived standards (disponible à l'adresse suivante: <http://www.bioversityinternational.org/index.php?id=168>).
- Bretting, P.K. et Widrlechner, M.P.** 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 13:11-86.
- De Vicente, M.C., Metz, T. et Alercia, A.** 2004. *Descriptors for genetic markers technologies*. Rome, IPGRI.
- Engels, J.M.M. et Visser, L., éd.** 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.
- Fang, D.Q., Roose, M.L., Krueger, R.R. et Federici, C.T.** 1997. Fingerprinting trifoliolate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95:211-219.
- Fonseca, S.M., Resende, M.D.V., Alfenas, A.C., Guimarães, L.M.S., Assis, T.F. et Grattapaglia, D.** 2010. *Manual prático de melhoramento genético do eucalipto*. UFV, Viçosa, MG.
- Grattapaglia, D. et Resende, M.D.V.** 2011. Genomic selection in forest tree breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 7: 241.
- Lateur, M., Maggioni, L. et Lipman, E.** 2010. *Report of a Working Group on Malus/Pyrus*. Third Meeting, 25-27 October 2006, Tbilissi, Géorgie. Rome, Bioversity International.
- Maggioni, L., Lateur, M., Balsemin, E. et Lipman, E.** 2011. *Report of a Working Group on Prunus*. Eighth Meeting, 7-9 September 2010, Forlì, Italie. Rome, Bioversity International.
- OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin).** 2009. *Liste des descripteurs OIV pour les variétés et espèces de Vitis*, 2e éd., Paris.
- SGRP-CGIAR.** Crop Genebank Knowledge Base (disponible à l'adresse suivante: http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=97&Itemid=203&lang=english).
- UPOV (Union internationale pour la protection des obtentions végétales).** *Liste des descripteurs* (disponible à l'adresse suivante: http://www.upov.int/fr/publications/tg_rom/tg_index.html).
- USDA, ARS, National Genetic Resources Program.** Germplasm Resources Information Network - (GRIN). [Base de données en ligne] Evaluation/characterization. Data Queries. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland, États-Unis (disponible à l'adresse suivante: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/croplist.pl>).

5.7 Normes relatives à l'évaluation

Normes

- 5.7.1 Les données d'évaluation relatives aux accessions de collections en champ doivent être obtenues pour les caractéristiques présentant un intérêt et en accord avec les listes disponibles de descripteurs utilisées au niveau international.
- 5.7.2 Les méthodes/protocoles, formats et mesures destinés à l'évaluation doivent être correctement documentés en faisant mention des références. Les normes relatives au stockage des données doivent servir de guide pour la collecte de données.
- 5.7.3 Les essais d'évaluation doivent être répliqués le cas échéant (dans le temps et dans l'espace) et basés sur un plan statistique fiable.

Informations générales

L'évaluation est l'enregistrement des caractéristiques dont l'expression est souvent influencée par des facteurs environnementaux. Elle implique la collecte méthodique des données portant sur les traits agronomiques et qualitatifs, au moyen d'essais expérimentaux conçus de manière appropriée. Les données d'évaluation incluent souvent la résistance aux insectes nuisibles et aux maladies, les évaluations de la qualité (par exemple la teneur en huile, en protéines ou en sucre), la production (bois, graines, fruits, semences, feuilles et autres) et les caractéristiques abiotiques (tolérance à la sécheresse ou au froid et autres). Ces ensembles de données sont très recherchés par les utilisateurs car ils leur permettent d'incorporer des caractéristiques utiles dans leurs programmes de sélection et les aident à améliorer l'utilisation des collections. Les traits pour lesquels les accessions de matériel phytogénétique sont évaluées, sont définis à l'avance par les experts en culture en collaboration avec les conservateurs des banques de gènes. La disponibilité de données

d'évaluation fiables, facilement accessibles aux sélectionneurs et aux chercheurs, facilite grandement l'utilisation des accessions de matériel phytogénétique. Le matériel génétique peut être évalué de manière systématique en utilisant une approche de réseau, aussi bien au niveau international qu'au niveau national.

L'obtention des données d'évaluation des banques de gènes demande beaucoup de temps et est souvent plus onéreuse que l'obtention des données de caractérisation. La priorité devrait donc être donnée à l'évaluation des accessions présentant des caractéristiques exceptionnelles. Il est recommandé, dans cet effort, de travailler en collaboration avec les sélectionneurs et autres spécialistes (virologues, entomologistes, mycologues). Les conservateurs devraient déployer tous les efforts possibles pour obtenir un minimum d'enregistrements des données d'évaluation. Les données d'évaluation peuvent être obtenues des utilisateurs à qui des matériels génétiques ont été précédemment fournis. La banque de gènes devrait solliciter l'utilisateur afin qu'il partage les données d'évaluation et, à cet égard, des modalités pratiques devraient être élaborées entre la banque de gènes et les receveurs/utilisateurs de matériel. Ces informations pourraient traiter de la résistance aux stress biotiques et abiotiques, des caractéristiques de croissance et de développement du matériel génétique, des caractéristiques de qualité du rendement, etc. L'ajout de ce type d'information à la base de données de la banque de gènes permet une identification plus ciblée du matériel génétique afin de satisfaire les besoins potentiels des clients. De telles données doivent ensuite être incluses dans le système de documentation de la banque de gènes après vérification et validation appropriées.

Aspects techniques

Une large gamme de listes de descripteurs a été développée par exemple par Bioversity International et l'UPOV. Par ailleurs, des listes de descripteurs d'évaluation ont été développées par des organisations régionales et nationales telles que le USDA-ARS NPGS.

La collecte des données doit être menée par un personnel formé utilisant autant que possible les formats de mesure calibrés et standardisés et suffisamment d'accessions de contrôle identifiées et de listes publiées de descripteurs de cultures. Les résultats des évaluations réalisées en serre, en laboratoire ou sur le terrain, conformément aux protocoles standardisés et aux procédures expérimentales, sont généralement présentés sous forme de valeurs uniques (par exemple les évaluations de la sévérité des symptômes de la maladie; les décomptes) ou de valeurs continues (basées sur les mesures). Les données doivent être validées par les conservateurs et les officiers chargés de la documentation avant d'être téléchargées dans la base de données de la banque de gènes et mises à la disposition du public.

De nombreux traits agronomiques nécessaires aux sélectionneurs sont génétiquement trop complexes pour être examinés au cours des évaluations préliminaires des accessions de matériel génétique. Les données sur les traits agronomiques sont généralement obtenues au cours de l'évaluation du matériel génétique dans le cadre

d'un programme de sélection. Bon nombre de ces traits résultent des interactions fortes génotype \times environnement ($G \times E$) et sont donc propres au site. L'utilisation des réplifications est essentielle pour l'évaluation des traits désirés dans différents environnements et pour définir et identifier clairement les accessions de contrôle qui doivent être utilisées au fil du temps. Les accessions de contrôle facilitent les comparaisons des données collectées sur plusieurs années.

Compte tenu des avancées des biotechnologies, la science des marqueurs moléculaires et la génomique sont de plus en plus utilisées en caractérisation (De Vicente *et al.*, 2004) (voir les normes relatives à la caractérisation). Les marqueurs moléculaires les plus couramment utilisés pour la caractérisation de matériel génétique comprennent les AFLP, les SSR et les polymorphismes à nucléotide unique (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Du fait de leur abondance relative et de la reproductibilité élevée des données, ces marqueurs ont en grande partie remplacé les marqueurs de type plus ancien tels que les polymorphismes de la taille des fragments de restriction (RFLP, *restriction fragment length polymorphisms*) et l'amplification aléatoire polymorphique de l'ADN (RAPD, *random amplified polymorphic DNA*). Les avancées dans le domaine du séquençage de nouvelle génération et la diminution des coûts qui en résulte ont suscité une utilisation accrue des analyses basées sur le séquençage, notamment des régions codantes et non codantes, ainsi que le génotypage par séquençage (GBS, *genotyping-by-sequencing*). Le mode de détection des différences génétiques varie selon les marqueurs moléculaires. Il en est de même pour le type de données générées, les niveaux taxonomiques auxquels ils peuvent être appliqués de la manière la plus appropriée et les exigences techniques et financières (Lidder et Sonnino, 2011). Lorsque les techniques de sélection assistée par marqueurs (MAS, *marked assisted selection*) sont réalisables, en l'occurrence la sélection au niveau moléculaire de la présence ou de l'absence de certains caractères au sein de matériels de reproduction, celles-ci peuvent également être utilisées pour l'évaluation de caractéristiques du matériel génétique présentant un intérêt. Cependant, le manque de personnel ayant les compétences appropriées et le manque de ressources nécessaires aux frais de mise en place relativement élevés, continuent d'être un frein à l'adoption répandue des marqueurs moléculaires comme méthode de choix pour l'évaluation du matériel génétique, en particulier dans les pays en voie de développement.

Circonstances particulières

La fiabilité des données peut varier selon les collecteurs si ces derniers ne sont pas bien formés et manquent d'expérience et lorsque les procédures de collecte de données ne sont pas harmonisées. Par conséquent, des techniciens qualifiés dans le domaine des ressources phytogénétiques doivent être disponibles pour collecter et documenter les données d'évaluation. La participation d'équipes multidisciplinaires est particulièrement souhaitable lors du processus d'évaluation, avec une expertise à la fois interne ou apportée par des instituts collaborateurs, notamment en pathologie végétale, en entomologie et en tolérance de stress environnemental (stress abiotique).



L'évaluation du matériel phytogénétique fait appel à une main-d'œuvre abondante et exige des niveaux de financement durable adéquats et continuels pour permettre le rassemblement de données fiables de haute qualité. Lorsque la conduite d'une évaluation complète de toutes les accessions, bien que désirable, n'est pas économiquement réalisable, il est recommandé comme point de départ de sélectionner les accessions génétiquement diverses (basées par exemple sur les sous-ensembles précédemment définis de collections de matériel génétique).

Les variations de l'incidence des nuisibles et des maladies, la sévérité des stress abiotiques et les fluctuations des facteurs environnementaux et climatiques sur le terrain ont un impact sur l'exactitude des données et doivent être atténués par des évaluations raisonnablement répliquées dans plusieurs endroits et sur plusieurs saisons et années. De plus, les essais en laboratoire pour les mesures de certains traits tels que la teneur en huile et en protéines, la qualité de l'amidon, les facteurs nutritionnels, etc., requièrent des équipements spécialisés et un personnel qualifié qui ne sont pas toujours disponibles ou qui peuvent être coûteux. Ceci souligne une fois de plus la nécessité de la participation d'équipes pluridisciplinaires appartenant

à diverses unités organisationnelles ou institutions, selon les cas. L'état sanitaire de l'accession (présence de virus) peut avoir une incidence sur l'évaluation et les descriptions morphologiques.

L'utilisation des données d'évaluation générées par d'autres peut poser des problèmes pratiques importants. Par exemple, les données peuvent être enregistrées sous des formats différents et, si elles sont déjà publiées, peuvent impliquer des questions de droit d'auteur et de propriété intellectuelle. Afin de faciliter l'utilisation de données d'origine extérieure, il est donc important de standardiser les formats de collecte, d'analyse, de rapport et de saisie des données.

Il faut souligner que de nombreux caractères peuvent être correctement évalués au sein même d'une banque de gènes plantée au champ. Cependant, les sources de stress imposant un risque à la collection et pouvant entraîner des pertes lorsqu'elles ne sont pas contrôlées, doivent être évaluées par des essais séparés, conçus spécialement à cet effet. Les insectes nuisibles et les maladies graves ou les problèmes majeurs liés au sol en sont des exemples. La collection en champ n'est souvent pas le lieu approprié pour l'évaluation du rendement ou de la qualité, du fait de la mauvaise conception des parcelles ou de la nécessité de laisser les plantes en terre bien au-delà de la période normale de récolte.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A. et Rao, V.R. 1997. *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Rapport sur une réunion technique de l'IPGRI, 9-11 octobre 1995, Rome, Italie. Rome, IPGRI.

De Vicente, M.C. et Fulton, T. 2004. *Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity*. Rome, IPGRI, et Ithaca, New York, États-Unis, Institute for Genetic Diversity.

Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G. et Hodgkin, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies*. IPGRI Technical Bulletin No. 2. Rome, IPGRI.

Lidder, P. et Sonnino, A. 2011. *Biotechnologies for the management of genetic resources for food and agriculture*. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Background Paper No. 52. Rome, FAO.

5.8 Normes relatives à la documentation

Normes

- 5.8.1 Les données d'identification de toutes les accessions doivent être documentées en utilisant les descripteurs de passeport multi-cultures de la FAO/Bioversity. Les informations relatives aux accessions doivent également inclure l'inventaire, la carte et l'emplacement de la parcelle, la régénération, la caractérisation, l'évaluation, les ordres, les données de distribution et le retour des utilisateurs.
- 5.8.2 Les processus de gestion du champ et les pratiques culturales doivent être enregistrées et documentées.
- 5.8.3 Les données des paragraphes 5.8.1 et 5.8.2 doivent être conservées. Les modifications doivent être mises à jour dans un système de base de données approprié. Il convient d'adopter des normes internationales relatives aux données.

Informations générales

Dans le cadre de la gestion et de la préservation de leurs collections, les banques de gènes doivent impérativement disposer d'informations complètes concernant les accessions, y compris les plans cadastraux détaillés et régulièrement mis à jour ainsi que les informations relatives aux processus de gestion des champs. Il est particulièrement important de documenter les données de caractérisation et d'évaluation afin d'améliorer l'utilisation de la collection concernée et d'aider à identifier les accessions distinctes.

Aspects techniques

Toutes les données et informations générées à travers les processus d'acquisition, d'établissement de collections, de gestion de champs, de régénération, de caractérisation, d'évaluation, de documentation et de distribution, doivent être enregistrées. De telles données et informations se rapportent aux détails relatifs aux caractéristiques des accessions et populations individuelles et vont jusqu'aux réseaux de distribution, aux clients et aux retours des utilisateurs. Les types de données qui doivent être enregistrées dans une collection en champ, outre les données d'identification et les descripteurs de cultures standards, sont par exemple les catalogues de plantes, les images de référence (photos, dessins), les dates de plantation et de récolte et les notes concernant l'historique des vérifications (d'identité) effectuées.

La liste de descripteurs de passeport multi-cultures de la FAO/Bioversity (Alercia *et al.*, 2012) doit être utilisée pour étayer les données d'identification car elle contribue à l'échange de données entre différentes banques de gènes et différents pays. Il convient d'utiliser les normes relatives à la documentation des données de caractérisation telles que les descripteurs de cultures de Bioversity ainsi que les descripteurs de marqueurs génétiques (De Vicente *et al.*, 2004). Compte tenu des avancées des biotechnologies, il est nécessaire de compléter les données liées aux traits phénotypiques par des données moléculaires. Il faut s'efforcer d'enregistrer les données moléculaires recueillies grâce à la génomique, à la protéomique, à la métabolomique et à la bioinformatique.

L'archivage des processus de gestion y compris des interventions quotidiennes est extrêmement important pour la bonne gestion de la collection en champ. La consignation rigoureuse des plans cadastraux (en versions imprimée et électronique) est essentielle à une documentation correcte. Les cartes anciennes doivent être conservées comme référence et datées.

La gestion correcte des accessions de divers types d'espèces requiert divers types de pratiques culturelles. Ces pratiques doivent être soigneusement étayées afin de garantir leur utilisation cohérente au fil du temps ainsi qu'un traitement approprié des accessions.

La majorité des banques de gènes disposent à présent d'ordinateurs et d'une connexion à Internet. Les systèmes informatiques utilisés pour conserver des données et des informations permettent un stockage complet de toutes les informations associées à la gestion des collections en champ. Les systèmes de gestion des informations relatives au matériel génétique, comme GRIN-Global, ont été conçus spécialement pour la gestion universelle de la documentation et des informations des banques de gènes. L'adoption de normes relatives aux données, qui existent aujourd'hui pour la plupart des aspects de la gestion des données des banques de gènes, contribue à faciliter la gestion des informations et à améliorer l'utilisation et l'échange de données. Le partage des informations relatives aux accessions et la mise à la disposition du public pour les utilisateurs potentiels de matériel génétique est important car il permet de faciliter et de soutenir l'utilisation de la collection. En définitive, une bonne gestion

des données et des informations favorise la conservation et la facilité d'utilisation du matériel génétique conservé.

Toutes les données doivent être mises à jour. Elles doivent aussi être dupliquées à intervalles réguliers et conservées dans un lieu éloigné, protégé des pertes dues aux incendies, aux pannes d'ordinateur, etc. (voir les normes relatives à la sécurité et à la sûreté). Il peut être utile de conserver des enregistrements écrits des principales données d'identification ainsi que des versions imprimées des cartes des champs.

Circonstances particulières

L'absence ou la perte de documentation, de cartes du champ ou d'étiquettes, compromet l'utilisation optimale du matériel génétique et peut même conduire à sa perte lorsqu'elle entrave la gestion et la régénération appropriées.

L'absence d'identification adéquate des espèces ne permet pas d'enregistrer toutes les informations nécessaires à la bonne gestion de l'accession ni d'identifier les pratiques culturelles appropriées.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Alercia, A., Diulgheroff, S. et Mackay, M. 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors (MCPD V.2)*. Rome, FAO et Bioversity International (disponible à l'adresse suivante: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).

De Vicente, M.C., Metz, T. et Alercia, A. 2004. *Descriptors for genetic markers technologies*. Rome, IPGRI.

Fabiani, A., Anderson, C. et Tillería, J. 1996. *Desarrollo de una base de datos para la evaluación de germoplasma cítrico. (Abstr.)*. VIII Congreso latinoamericano y VI Nacional de Horticultra. Montevideo, Sociedad Uruguaya de Horticultra

Lipman, E., Jongen, M.W.M, van Hintum, Th.J.L., Gass, T. et Maggioni L., comps. 1997. *Central crop databases: tool for plant genetic resources management*. Rome, IPGRI, et Wageningen, Pays-Bas, CGN.

Painting, K.A, Perry, M.C, Denning, R.A. et Ayad, W.G. 1993. *Guide de Documentation des Ressources Génétiques*. Rome, IBPGR.

Tillería, J. 2001. *Sistema DBGERMO para la Documentación de Bancos Activos de Germoplasma*. Memoria, Reunión Técnica para Latinoamérica y el Caribe del Sistema Mundial de la FAO de Información y Alerta para los Recursos Filogenéticos. pp. 85-115. Turrialba, Costa Rica.

Tillería, J. et Anderson, C.M. 2004. *The DBGERMO II desktop system for an easy documentation of germplasm collections*. Proc. ISC. (Abstr.), Agadir, Maroc.

Tillería, J. et Zamuz, J. 2011. *La Herramienta Curatorial DBGERMOWeb para la Documentación de Colecciones Vegetales. Demostración de la aplicación web en tiempo real con colecciones documentadas*. VIII SIRGEALC, Quito.

Tillería, J., Andrade, R. et Zamuz, J. 2011. *Documentación de la colección de chirimoya (Annona cherimola Mill) del INIAP con la herramienta curatorial DBGERMOWeb*. VIII SIRGEALC, Quito.

Tillería, J., Paniego, N., Zamuz, J. et Luján, M. 2009. *El Sistema DBGERMO Web para la Documentación de Colecciones Vegetales*. VII SIRGEALC, Pucón, Chile.

USDA, ARS/Bioversity International/Fonds fiduciaire mondial pour la diversité des cultures. GRIN-Global. Germplasm Resource Information Network Database - Version 1 (disponible à l'adresse suivante: http://www.grin-global.org/index.php/Main_Page).

5.9 Normes relatives à la distribution

Normes

- 5.9.1 Tout matériel génétique doit être distribué conformément aux lois nationales et aux conventions et traités internationaux pertinents.
- 5.9.2 Les échantillons doivent être accompagnés de tous les documents nécessaires demandés par les pays donateurs et receveurs.
- 5.9.3 Tout matériel génétique distribué doit être accompagné de l'information associée. L'information doit comporter au minimum une liste détaillée comprenant le numéro d'identification de l'accession et/ou les poids des échantillons ainsi que les données de passeport.

Contexte

La distribution de matériel génétique est la fourniture d'un échantillon représentatif d'une accession de banque de gènes, en réponse à des demandes émanant d'utilisateurs de matériel phylogénétique. La demande de ressources génétiques est en augmentation constante pour répondre aux défis liés au changement climatique, à l'évolution des spectres de virulence des principaux insectes nuisibles et maladies, aux espèces exotiques envahissantes et aux autres besoins de l'utilisateur final. Cette demande a conduit à une plus large reconnaissance de l'importance de l'utilisation du matériel génétique conservé dans les banques de gènes, qui détermine au bout du compte la distribution du matériel génétique. Il est important que la distribution de matériel génétique à l'étranger soit conforme aux normes et aux standards internationaux relatifs aux réglementations phytosanitaires, conformément aux provisions des traités et conventions internationaux pertinents sur la diversité biologique et les ressources phylogénétiques.



Aspects techniques

Les deux instruments internationaux régissant l'accès aux ressources génétiques sont le Traité international et la CDB. Le Traité international facilite l'accès aux RPGAA et au partage des avantages découlant de leur utilisation. Ce traité a établi un système multilatéral pour les RPGAA correspondant à un pool de 64 cultures vivrières et fourragères (communément appelées cultures de l'Appendice 1 du Traité) qui peuvent être distribuées à l'aide de l'ATTM. L'ATTM peut aussi être utilisé pour les cultures ne figurant pas à l'Appendice 1; d'autres modèles sont également disponibles. L'accès et le partage des avantages de la CDB sont conformes au protocole de Nagoya. La CDB et le Traité international soulignent ce continuum entre la conservation et l'utilisation durable, ainsi que l'accès facilité et le partage équitable des avantages découlant de leur utilisation.

De plus, toutes les accessions doivent être accompagnées de la documentation requise, notamment les certificats phytosanitaires et les permis d'importation, conformément

aux exigences de la CIPV. La destination finale et les exigences phytosanitaires les plus récentes en matière d'importation en vigueur dans le pays importateur doivent être vérifiées avant chaque expédition (ces réglementations sont fréquemment modifiées dans de nombreux pays). Le transfert de matériel génétique doit aussi être soigneusement planifié, en consultation avec l'organisme national de protection des végétaux ou l'institution officielle autorisée, qui doit fournir la documentation appropriée, notamment un certificat phytosanitaire officiel conforme aux exigences du pays importateur. Le pays recevant le matériel génétique doit fournir à la banque de gènes donatrice les informations concernant la documentation exigée pour l'importation de matériel végétal, y compris les exigences phytosanitaires.

Les matériels végétaux provenant d'une collection en champ doivent être soumis aux procédures de traitement et d'indexage biologique avant d'être distribués aux utilisateurs de matériel génétique. L'indexage des pathogènes difficiles à détecter, tels que les virus, est essentielle à la limitation de leur propagation. Lorsque les capacités d'indexage de virus ne sont pas disponibles, les données d'identification doivent indiquer l'état sanitaire, qui doit aussi figurer sur le matériel distribué, en particulier pour les matériels dont on sait qu'ils proviennent de régions infectées par des virus. Ceci dans l'éventualité où le receveur possède des installations de quarantaine ou s'il satisfait aux critères stipulés dans le permis d'importation du pays ou de la région demandeurs.

Le type de conteneur d'expédition, les matériels d'emballage et le choix de la société de transport dépendront beaucoup de la partie de plante distribuée. Les certificats phytosanitaires et les permis de quarantaine et d'importation décrivent la façon dont le matériel génétique spécifique doit être emballé et expédié. Les organes dormants ou destinés à l'entreposage nécessitent moins de précautions et peuvent passer davantage de temps en transit sans être abimés, que les propagules en croissance. Les accessions doivent être conservées séparément au cours du transport et ne doivent pas être mélangées. Il convient de se référer aux modes opératoires normalisés (*Standard operating procedures*, SOP) disponibles dans de nombreuses banques de gènes et traitant des problèmes techniques tels que l'emballage, le traitement, le mode d'expédition, la taille de l'échantillon, etc.

Afin d'augmenter les chances d'arrivée des végétaux en bonne condition, le moment de l'expédition doit être choisi de sorte à éviter les conditions climatiques extrêmes (chaudes ou froides); le receveur ou les officiers des douanes doivent également être informés de l'arrivée des végétaux. Les propagules fragiles peuvent nécessiter des services de livraison express. Afin de faciliter les envois internationaux, les papiers nécessaires doivent être attachés à l'extérieur du conteneur et des copies placées à l'intérieur, à l'intention du receveur. Les officiels pourront ainsi y accéder aisément sans perturber les végétaux. Le demandeur peut avoir recours à des services de courrier pour le dédouanement du matériel génétique et son entrée dans le pays.

Toutes les accessions doivent être accompagnées de la documentation minimale nécessaire à une utilisation appropriée du matériel par le demandeur. L'information doit comporter au moins une liste détaillée comprenant le numéro d'identification de l'accession et/ou les poids des échantillons ainsi que les données d'identification

essentielles. Il est également utile d'inclure l'historique de la détection de pathogènes. Les dossiers de distribution (dossiers où figurent la date de la demande, les végétaux demandés, le formulaire rempli pour le végétal, le nom et l'adresse du demandeur, la date et le coût de l'expédition) doivent être conservés et inclus dans le système de documentation de la banque de gènes (voir les normes relatives à la documentation). Le matériel végétal distribué peut servir de matériel de propagation en cas de perte catastrophique de matériel original à la banque de gènes d'origine.

Circonstances particulières

La conservation simultanée des accessions *in vitro* permet de les protéger des organismes nuisibles, des pathogènes et des dangers climatiques et augmente leur disponibilité pour la distribution, si le matériel est maintenu exempt de virus. Dans certains cas, notamment pour le manioc (*Manihot esculenta* L.) et le cacao (*Theobroma cacao* L.), les réglementations de quarantaine concernant les organismes nuisibles et les maladies stipulent que les boutures provenant de collections en champ ne peuvent être propagées qu'à l'intérieur d'un même pays et parfois même uniquement à l'intérieur de certaines régions d'un pays. On doit donc avoir recours à d'autres formes de propagation, par exemple les cultures *in vitro* et les semences, pour l'échange de matériel génétique entre pays ou entre régions soumises à la quarantaine. Pour les cultures porteuses de virus transmis par les insectes ou les acariens, il peut être nécessaire de distribuer des matériels provenant de serres, d'abris grillagés ou de cultures *in vitro*.

Les décisions politiques, situations de crises ou retards bureaucratiques peuvent allonger le délai qui sépare la réception d'une demande de semences de la distribution du matériel. Les processus de distribution peuvent également être affectés et retardés par les limitations liées à la régénération et/ou à la multiplication des accessions. Le retard à vérifier les réglementations de quarantaine jusqu'au moment où le colis est prêt pour l'expédition, peut entraîner un gaspillage des ressources. Les cargaisons de matériel génétique infesté d'organismes nuisibles ou ne comportant pas la documentation appropriée seront refusés ou détruits par le pays importateur.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base. Distribution (disponible à l'adresse suivante: http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=59&Itemid=208&lang=english).

5.10 Normes relatives à la sécurité et à la duplication de sécurité

Normes

- 5.10.1 Il convient de mettre en place et de mettre à jour une stratégie de gestion des risques répondant aux risques physiques et biologiques identifiés par les normes.
- 5.10.2 Toute banque de gènes doit se conformer aux exigences et aux protocoles de Santé et Sécurité au Travail.
- 5.10.3 Une banque de gènes doit employer le personnel requis pour remplir ses obligations ordinaires afin de s'assurer de pouvoir acquérir, conserver et distribuer du matériel génétique conformément aux normes.
- 5.10.4 Chaque accession de collection en champ doit être dupliquée sur au moins un site et/ou si possible sauvegardée par une autre méthode/stratégie de conservation telle que la conservation *in vitro* ou la cryoconservation.

Informations générales

Une collection en champ étant un ensemble de plantes vivantes provenant de régions différentes et qui resteront sur un même site pendant de nombreuses années, elle est extrêmement vulnérable à un certain nombre de menaces, y compris les conditions environnementales, les organismes nuisibles et les maladies, les droits fonciers et le développement du terrain. L'entretien d'une collection en champ est également coûteux et nécessite des soins constants comparativement aux autres modes de conservation. La banque de gènes doit donc mettre en œuvre et promouvoir une gestion systématique des risques physiques et biologiques de l'environnement quotidien. La présente norme fournit les conditions nécessaires permettant à une banque de gènes d'assurer la sécurité de la collection contre ces menaces et de garantir qu'il n'y ait aucune perte de diversité génétique.

Aspects techniques

Une collection en champ doit disposer d'une version écrite de la stratégie de gestion des risques correspondant aux actions à entreprendre en cas d'urgence survenant au sein de la banque de gènes concernant le matériel génétique ou les données associées. Cette stratégie, ainsi que le plan d'action qui l'accompagne, doivent être régulièrement revus et mis à jour afin de tirer parti des nouvelles réalités et des nouvelles technologies et d'en assurer la bonne diffusion parmi le personnel de la banque de gènes.

Les collections en champ sont exposées à divers dangers, notamment les conditions climatiques extrêmes telles que la sécheresse, le gel, la grêle, les cyclones, les typhons et les tornades. Ces menaces sont en partie prévisibles et des précautions peuvent être prises pour procurer aux plantes une protection supplémentaire pendant les périodes défavorables. Si les plantes sont maintenues en pots, elles peuvent être transférées dans un lieu abrité. Peu de possibilités s'offrent aux plantes plus petites situées en plein champ, excepté le renforcement des tuteurs ou l'installation d'une couverture de protection, là où cela est possible. Pour les arbres fruitiers, les branches peuvent être élaguées afin de diminuer l'impact des vents violents qui peuvent entraîner le déracinement.

D'autres phénomènes extrêmes tels que les incendies ou les tremblements de terre sont très difficiles à prévoir. Dans de tels cas, des mesures de précautions doivent être prises afin de prévenir les dégâts pouvant être causés aux plantes de la collection en champ. Des lignes coupe-feu doivent être établies et entretenues en permanence dans toute la collection en champ. Des équipements de lutte contre les incendies doivent aussi être installés et vérifiés régulièrement. Ce matériel comprend des extincteurs et des couvertures ignifuges. Les bâtiments de la collection en champ doivent être antisismiques, y compris les serres et les pépinières.

Les collections en champ sont aussi sujettes à d'autres menaces telles que les facteurs biotiques incluant les organismes nuisibles et les maladies, les prédateurs, les espèces exotiques, les rongeurs nuisibles et le matériel indigène appartenant à la même espèce, poussant sauvagement dans la région et pouvant pénétrer le champ en tant que mauvaise herbe. Des mesures de précaution doivent être prises à l'encontre de ces menaces. Les pesticides doivent être utilisés avec précaution car ils ont un impact négatif non seulement sur l'environnement mais aussi sur la santé et la sécurité du personnel qui les applique. Lorsque cela est approprié, l'utilisation de pièges destinés aux prédateurs ou de fosses empêchant l'accès aux parcelles peuvent s'avérer plus écologiques. Dans la lutte contre l'invasion de la collection en champ par les animaux, il convient d'avoir recours à des protocoles sans cruauté approuvés par les organisations concernées.

Le vandalisme ou le vol de matériel de plantation peut aussi représenter un problème majeur pour la sécurité des collections. Les collections en champ doivent être convenablement clôturées et leur accès doit être contrôlé. Des gardiens ou des clôtures supplémentaires peuvent être nécessaires à certains endroits. Du fait du caractère à long terme des collections en champ, en particulier pour les arbres fruitiers et autres espèces d'arbres, il est important de s'assurer des droits fonciers et du plan de développement du site afin de limiter la nécessité de transfert vers un autre site et de permettre l'expansion de la collection.



La santé et la sécurité au travail du personnel doivent également être prises en compte. Il convient de fournir du matériel et des vêtements de protection en bon état qui seront utilisés au champ lors de l'application de pesticides et d'engrais. Les produits agrochimiques doivent être choisis de manière à diminuer les risques. Il convient d'établir une liste de produits chimiques généralement sans danger pour les diverses cultures, ainsi qu'une liste noire des produits dangereux et interdits. Le personnel doit être formé à l'utilisation correcte et sûre du matériel et recevoir une formation régulière en hygiène et sécurité aux champs.

La gestion active d'une banque de gènes s'appuie sur du personnel qualifié et il est essentiel d'assigner des responsabilités aux employés compétents. Une banque de gènes doit donc disposer d'un plan ou d'une stratégie concernant le personnel ainsi que du budget correspondant, alloué de façon régulière, afin de garantir la disponibilité d'un nombre minimum d'employés qualifiés lui permettant d'acquérir, de conserver et de distribuer du matériel génétique. Selon le mandat et les objectifs de chaque banque de gènes, il est souhaitable d'avoir accès à des spécialistes disciplinaires et techniques dans un éventail de domaines. Cependant, les effectifs et la formation du personnel seront fonction des conditions particulières. Le personnel doit avoir acquis les qualifications nécessaires dans le cadre d'une formation certifiée et/ou sur le lieu de travail et les besoins en formation doivent être analysés au fur et à mesure.

L'usage de méthodes de conservation complémentaires pour la duplication de sécurité des accessions maintenues dans les collections en champ constitue une stratégie importante de diminution des risques mentionnés précédemment et peuvent s'avérer plus économiques. Les accessions peuvent être sauvegardées en tant que cultures *in vitro* à croissance ralentie ou conservées dans de l'azote liquide lorsque des protocoles sont disponibles pour les accessions cibles. Pour les espèces produisant des semences récalcitrantes ou à durée de vie courte, une méthode de sauvegarde réalisable et rentable

consiste à entreposer les semences à court terme avec renouvellement avant la perte de viabilité. On peut également utiliser comme sauvegarde de sécurité une collection double située dans une région différente bénéficiant d'un climat et d'une agroécologie propices à la croissance des plantes, mais non sujette aux risques présents dans la banque de gènes principale. Ce doublon pourrait également servir de site supplémentaire de distribution de matériel et être situé dans une région comportant des risques différents quant aux organismes nuisibles et aux maladies, ce qui permet d'assurer la sécurité de la collection et de diminuer les restrictions de quarantaine liées à la distribution à l'intérieur des régions. L'entreposage d'ADN et de pollen complète les banques de gènes en fournissant un moyen rentable de maintenir une diversité plus importante au sein d'une accession que celle conservée à l'état de plantes dans la collection en champ.

Toute disposition relative à une duplication de sécurité nécessite un accord juridique signé en bonne et due forme entre le déposant et le receveur des doublons de sécurité, qui établit les responsabilités des parties et les conditions générales de conservation du matériel. Ceci est particulièrement important pour les collections en champ où les plantes doivent être gérées au quotidien.

Circonstances particulières

Lorsqu'une banque de gènes ne dispose pas de personnel qualifié, manque de temps ou est soumise à d'autres contraintes, elle peut externaliser une partie de ses activités ou solliciter l'aide d'autres banques. Il est important de développer des réseaux et collaborations avec d'autres banques de gènes. La communauté internationale des banques de gènes doit être immédiatement informée de la mise en danger du fonctionnement de la banque de gènes.

Les entrées non autorisées dans les locaux des banques de gènes (par les humains, les animaux sauvages ou les oiseaux) peuvent conduire à la perte pure et simple de matériel mais aussi compromettre les collections par l'introduction involontaire d'insectes nuisibles et de maladies ou par l'interférence avec les systèmes de gestion. La collaboration étroite avec les collectivités locales dans le cadre de la sensibilisation au but et à la valeur de la collection peut procurer un sentiment d'appartenance et favoriser une protection accrue de la région où se situe le champ.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Engels, J.M.M. et Visser, L., édés. 2003. *A guide to effective management of germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 6. Rome, IPGRI.

NordGen. 2008. *Agreement between (depositor) and the Royal Norwegian Ministry of Agriculture and Food concerning the deposit of seeds in the Svalbard Global Seed Vault*. The Svalbard Global Seed Vault. The Nordic Genetic Resource Centre, ALNARP (disponible à l'adresse suivante: http://www.nordgen.org/sgsv/scope/sgsv/files/SGSV_Deposit_Agreement.pdf).

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. et Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, IPGRI.

SGRP-CGIAR. Crop Genebank Knowledge Base. Duplication de sécurité (disponible à l'adresse suivante: http://croptgenebank.sgrp.cgiar.org/index.php?option=com_content&view=article&id=58&Itemid=207&lang=english).





6

Normes applicables aux banques de gènes pour la culture *in vitro* et la cryoconservation





Les normes relatives à la culture *in vitro* et à la cryoconservation sont vastes et génériques, en raison des différences marquées existant entre les semences non orthodoxes et les plantes multipliées par voie végétative. Cette variabilité est fonction de l'état biologique et métabolique des plantes concernées, qui influence leurs réponses différentes aux manipulations diverses et exige souvent une modification des approches de base en des approches spécifiques aux espèces. Afin de mieux comprendre la base scientifique de ces normes, ces diverses caractéristiques requièrent une introduction au phénomène de non-orthodoxie et de comportement des semences non orthodoxes au cours de l'entreposage.

Phénomène de non-orthodoxie

La compréhension des phénomènes de tolérance et de sensibilité des semences orthodoxes et non orthodoxes (intermédiaires et récalcitrantes) est de la plus haute importance pour la cryoconservation. La teneur en eau des semences orthodoxes arrivées à maturité se situe généralement entre 0,05 et 0,16 g g⁻¹ (5-14 pour cent [wmb]), bien que certaines espèces répandent leurs semences à une teneur en eau beaucoup plus élevée et subissent ensuite une déshydratation importante. Contrairement aux semences récalcitrantes, toutes les semences orthodoxes acquièrent une tolérance à la dessiccation génétiquement programmée et déclenchée avant ou au moment du séchage accompagnant la maturation. Les semences récalcitrantes ne sèchent pas au cours des étapes ultérieures du développement et sont répandues lorsque la teneur en eau se situe entre 0.3-0.4 et >4.0 g g⁻¹. Du fait de leur sensibilité à la dessiccation, la vigueur et la viabilité diminuent rapidement avec la perte d'eau et les semences meurent à des teneurs en eau relativement élevées. Ceci est dû à leur activité métabolique, avec une

1 Dans ce document, le terme teneur en eau (wmb, de l'anglais wet mass basis), est préféré à taux d'humidité car les semences récalcitrantes sont hydratées (mouillées) plutôt d'humides (à peine mouillées). Les chiffres donnés sont exprimés par rapport à la matière sèche (g H₂O g⁻¹ matière sèche [g g⁻¹]), que l'on considère être plus explicite qu'une expression en pourcentage de matière humide.

différenciation intracellulaire faible ou inexistante (Berjak et Pammenter, 2004). Les membranes sont donc exposées aux conséquences néfastes du stress hydrique (Walters *et al.*, 2001; Varghese *et al.*, 2011). Les semences intermédiaires présentent également tout un éventail de différences au niveau de la physiologie post-dissémination. Celles qui manifestent un comportement intermédiaire peuvent supporter des pertes en eau allant de ~ 0.11 à $\sim 0.14 \text{ g g}^{-1}$ (Berjak et Pammenter, 2004). Elles ont la capacité de réaliser certains des mécanismes et processus importants régissant la tolérance à la dessiccation. Cependant, elles ne survivent pas longtemps à l'état déshydraté, en particulier à de basses températures chez certaines espèces.

La variabilité de la physiologie des semences récalcitrantes est souvent intraspécifique. La teneur en eau des semences ou des embryons ou axes embryonnaires peut varier de manière significative dans les collections provenant de la même localité année après année, ainsi que dans le matériel provenant d'une même localité au cours d'une saison quelconque. Cela signifie que les paramètres (teneur en eau, réponse au séchage) doivent être évalués pour chaque espèce. De plus, les semences récoltées tard dans la saison sont généralement de qualité très inférieure à celle des semences récoltées plus tôt (Berjak et Pammenter, 2004). L'origine de la population à partir de laquelle les semences ont été collectées représente aussi un facteur important quant aux propriétés et aux réponses des semences récalcitrantes. Ainsi, malgré le fait qu'elles appartiennent à la même espèce, les semences se développant le long d'un gradient latitudinal peuvent présenter des caractéristiques considérablement différentes (Daws *et al.*, 2006; Daws *et al.*, 2004).

Le stade de développement des semences s'est avéré critique pour la cryoconservation de matériel génétique récalcitrant. Au début de leur ontogénie, toutes les semences sont très sensibles à la dessiccation. Chez les semences récalcitrantes, la sensibilité à la dessiccation augmente parallèlement au développement des processus de germination (Berjak et Pammenter, 2004). Les premiers événements de la germination sont déclenchés peu après la dissémination des graines. Il n'y a pas de « pause » entre la fin du développement et le début de la germination, comme celle qui est imposée par le séchage accompagnant la maturation chez les semences orthodoxes.

Selon les espèces, les semences récalcitrantes déclenchent le métabolisme germinatif après la dissémination. Les espèces dont les embryons sont totalement développés au moment de la dissémination commencent généralement leur germination pratiquement immédiatement, avec un accroissement simultané de leur sensibilité à la dessiccation. Chez certaines autres espèces, les semences sont répandues alors que les embryons ne se sont pas encore tout à fait développés. Ce développement doit alors être complété avant le début du métabolisme germinatif. Ces différences de développement dictent la durée pendant laquelle les semences peuvent être entreposées en milieu humide (c'est-à-dire à une teneur en eau égale à celle présente au moment de la dissémination). On sait à présent que les semences récalcitrantes ne doivent pas être déshydratées jusqu'à une teneur en eau empêchant la germination (aussi appelée entreposage sous-imbibé) car cela raccourcit la durée de conservation en entreposage à l'humidité. Une déshydratation faible stimule en réalité le début ou la progression de la germination,

raccourcissant ainsi le temps écoulé avant qu'une source d'eau externe ne soit requise pour soutenir le processus (Drew *et al.*, 2000; Eggers *et al.*, 2007).

De manière générale, les semences récalcitrantes en provenance des régions tempérées tolèrent les basses températures, alors que les mêmes espèces, originaires de régions tropicales et subtropicales, sont plus sensibles au froid. La sensibilité au froid pose problème pour l'entreposage des semences intermédiaires, notamment en provenance des régions tropicales et subtropicales. Lorsque celles-ci sont séchées jusqu'à une teneur en eau qui ne leur est pas nuisible, la durée de conservation est entravée par des températures $< 10^{\circ}\text{C}$ (Hong *et al.*, 1996).

La microflore associée aux semences (moisissures et bactéries), en particulier aux surfaces internes telles que les cotylédons ou les axes embryonnaires, constitue un problème majeur chez les semences récalcitrantes surtout d'origines tropicales et subtropicales (Sutherland *et al.*, 2002). Les conditions d'entreposage en milieu humide – moites et souvent nécessairement à des températures douces – stimulent la prolifération des moisissures dont les hyphes peuvent pénétrer les tissus embryonnaires. Il en résulte un effet délétère important et une diminution significative de la durée de conservation.

En conditions de plein champ, les semences récalcitrantes perdront graduellement leur eau, à moins d'un établissement rapide des jeunes plantes. La vitesse de déshydratation dépend de la nature des espèces et de leur morphologie. En conditions de perte d'eau lente (allant de quelques jours jusqu'à une semaine ou plus), les dommages s'accumulent. Les semences de la plupart des espèces perdent leur viabilité lorsque la teneur en eau des embryons/axes embryonnaires est d'environ 0.8 g g^{-1} (Pammenter *et al.*, 1993). Par conséquent, lors de la manipulation ou de l'entreposage de semences récalcitrantes, un soin particulier doit être porté au maintien des teneurs en eau à des niveaux caractéristiques de ceux de la dissémination.

La réponse des explants à la déshydratation dépend de leur vitesse de séchage et de leur taille. Les semences récalcitrantes sont souvent trop grandes et ne sèchent pas assez vite ou ne se refroidissent pas assez rapidement sous l'action d'un cryogène (ce qui est nécessaire à la réussite de la cryoconservation). Les embryons et les axes embryonnaires extraits des semences sont donc des explants de choix car ils peuvent être déshydratés jusqu'à des teneurs en eau inférieures ou égales à 0.4 g g^{-1} , ce qui minimise la formation de cristaux glace. Les embryons ou axes embryonnaires peuvent être soumis à une déshydratation ultra-rapide dans un flux d'air comprimé sec (procédé appelé *flash-drying*) (Pammenter *et al.*, 2002), ce qui réduit de manière significative l'intervalle de temps au cours duquel peuvent survenir des dommages liés à la dessiccation. Les embryons ou axes embryonnaires ne sont pas devenus tolérants à la dessiccation mais ont tout simplement été déshydratés avant l'accumulation de dommages létaux, laissant ainsi le temps nécessaire pour les soumettre à des températures cryogéniques. Lorsqu'il s'avère impossible de congeler les embryons ou les axes embryonnaires, on peut utiliser d'autres explants tels que des méristèmes apicaux excisés à partir de jeunes plantes qui se sont développés à partir de semences germées *in vitro*.

Outre la cryoconservation, les autres moyens de conservation des espèces produisant des semences récalcitrantes ou autrement orthodoxes incluent la conservation *in vitro*

pouvant impliquer une croissance ralentie des jeunes plantes ou des plantules. Les conditions de croissance ralentie peuvent parfois être imposées *ex vitro*. Dans ce dernier cas, les plantules peuvent provenir de cals embryonnaires (se prêtant eux-mêmes à la cryoconservation) et être conservés, éventuellement dans des conditions de croissance ralentie.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Benson, E.E., Harding, K., Debouck, D., Dumet, D., Escobar, R., Maffa, G., Panis, B., Panta, A., Tay, D., Van den Houwe, I. et Roux, N. 2011. *Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crop in vitro conservation technologies*. Rome, SGRP-CGIAR.

Berjak, P. et Pammenter, N.W. 2004. Recalcitrant Seeds. Dans R.L. Benceh-Arnold, et R.A. Sánchez, éd. *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*, pp. 305-345. New York, États-Unis, Haworth Press.

Daws, M.I., Lydall, E., Chmielarz, P., Leprince, O., Matthews, S., Thanos, C.A. et Pritchard, H.W. 2004. Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastanum* across Europe. *New Phytologist*, 162: 157-166.

Daws, M.I., Cleland, H., Chmielarz, P., Gorian, F., Leprince, O., Mullins, C.E., Thanos, C.A., Vandvik, V. et Pritchard, H.W. 2006. Variable desiccation tolerance in *Acer pseudoplatanus* seeds in relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance? *Functional Plant Biology*, 33: 59-66.

Drew, P.J., Pammenter, N.W. et Berjak, P. 2000. 'Sub-imbibed' storage is not an option for extending longevity of recalcitrant seeds of the tropical species, *Trichilia dregeana* Sond. *Seed Science Research*, 10: 355-363.

Eggers, S., Erdey, D., Pammenter, N.W. et Berjak, P. 2007. Storage and germination responses of recalcitrant seeds subjected to mild dehydration. pp. 85-92. Dans S.Adkins, S. Ashmore, S.C. Navie, éd., *Seeds: biology, development and ecology*. Wallingford, Royaume-Uni, CABI.

Engelmann, F. et Takagi, H., éd. 2000. *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application*. Tsukuba, Japon, Japan International Research Centre for Agricultural Sciences, et Rome, IPGRI.

Hong, T.D., Linington, S. et Ellis, R.H. 1996. *Seed storage behaviour: A compendium*. Handbooks for genebanks No. 4. Rome, IPGRI.

Lync P., Souch, G., Trigwell, S., Keller, J et Harding, K. 2011. Plant cryopreservation: from laboratory to genebank. *As. Pac J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 18 (1): 239-242.

Pammenter, N.W., Vertucci, C. et Berjak, P. 1993. Responses to dehydration in relation to non-freezable water in desiccation-sensitive and -tolerant seeds. Dans D. Côme et F. Corbineau, éd. *Proceedings of the Fourth International Workshop on Seeds: Basic and Applied Aspects of Seed Biology*, pp.867-872. Angers, France. ASFIS, Paris. Vol. 3.

Pammenter, N.W., Berjak, P., Wesley-Smith, J. et Willigen, C.V. 2002. Experimental aspects of drying and recovery. Dans M. Black et H.W. Pritchard, éd. *Desiccation and survival in plants: drying without dying*, pp. 93-110. Wallingford, Royaume-Uni, CABI.

Reed, B.M. 2010. *Plant cryopreservation. A practical guide*. New York, États-Unis, Springer.

Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. et Engels, J.M.M. 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections*. Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, IPGRI.

Sutherland, J.R., Diekmann, M. et Berjak, P., éd. 2002. *Forest tree seed health*. IPGRI Technical Bulletin No. 6. Rome, IPGRI.

Varghese, B., Sershen, Berjak, P., Varghese, D. et Pammenter, N.W. 2011. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: A study of survival and oxidative stress metabolism. *Physiologia Plantarum*, 142: 326-338.

Walters, C., Pammenter, N.W., Berjak, P. et Crane, J. 2001. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation-tolerant and sensitive seeds. *Seed Science Research*, 11: 135-148.

6.1 Normes relatives à l'acquisition et au traitement initial

Normes

- 6.1.1 Toutes les accessions de matériel génétique introduites dans une banque de gènes doivent être acquises légalement et accompagnées de la documentation technique pertinente.
- 6.1.2 Tous les matériels doivent être accompagnés d'un minimum de données associées, telles que détaillées dans les descripteurs de passeport multi-cultures élaborés par la FAO et Bioversity.
- 6.1.3 Il convient de collecter uniquement le matériel se trouvant en bonne condition et dont l'état de maturité est constant. La taille de l'échantillon doit être assez grande pour que la proposition de mise en place d'une banque de gènes soit viable.
- 6.1.4 Le matériel doit être transporté à la banque de gènes dans les plus brefs délais et dans les meilleures conditions possibles.
- 6.1.5 Tout matériel entrant doit être traité par un désinfectant de surface permettant d'éliminer tous les micro-organismes et doit être manipulé de manière à ne pas en altérer l'état physiologique, dans une zone désignée pour la réception.

Informations générales

L'acquisition est le processus de collecte ou de demande de matériel génétique (semences et autres propagules)¹ – ainsi que les informations qui s'y rapportent – en vue de les intégrer dans une banque de gènes. Il est essentiel de se conformer aux exigences légales

¹ Dans le cadre présent, on entend par propagule, les parties végétatives d'une plante telles que les semences, les bourgeons, les cornes, les boutures et autres rejets utilisés pour la multiplication de la plante.

et de respecter les réglementations nationales et internationales appropriées. Au moment de l'acquisition, il est important de veiller à ce que les données d'identification de chaque accession soient aussi complètes que possible et pleinement étayées (Alercia *et al.* 2001).

Il est nécessaire de veiller à ce que le matériel génétique soit de la meilleure qualité possible et d'éviter de conserver des semences immatures ou ayant été exposées trop longtemps aux éléments naturels. La manière dont les semences et autres propagules sont manipulés entre le moment de leur collecte et celui de leur transfert en atmosphère contrôlée est déterminante quant à leur qualité. Lors de la période suivant la collecte et au cours du transport vers la banque de gènes, une température et une humidité extrêmes et défavorables peuvent provoquer une perte rapide de la viabilité et réduire la longévité des semences entreposées. Il en est de même pour la manipulation post-récolte au sein de la banque de gènes. La qualité et la longévité des semences sont affectées par les conditions subies avant l'entreposage dans la banque de gènes. Du fait de leur métabolisme actif et de leurs fortes teneurs en eau à maturité, les semences récalcitrantes doivent impérativement être manipulées avec précaution après la collecte, pour une bonne conservation du matériel à long terme. Les matériels cultivés au champ sont souvent contaminés par des moisissures et/ou des bactéries. Il est donc nécessaire de disposer d'une série de mesures permettant de réduire le risque de détérioration après la récolte.

Le matériel doit être aussi propre que possible. Un repiquage en pot et une brève période de croissance en serre sont donc recommandés pour le matériel collecté en champ. Ces plantes doivent être arrosées à partir du bas. Lorsque le matériel est extrêmement infecté, les explants peuvent être désinfectés ultérieurement à l'aide de pesticides. Les matériels visiblement infectés doivent être exclus dès le départ ou éliminés.

Aspects techniques

L'accès aux ressources phytogénétiques au sein du Système multilatéral du Traité international est accompagné des ATTM. Pour ce qui est du matériel acquis ou collecté en dehors du pays abritant la banque de gènes, les acquéreurs doivent respecter les législations nationales et internationales pertinentes. Il convient de s'enquérir des réglementations phytosanitaires et autres conditions d'importation auprès de l'autorité nationale compétente dans le pays receveur.

Les données de passeport sont nécessaires à l'identification et à la classification des accessions. De nombreuses accessions sont des populations sauvages. Il est donc absolument impératif de collecter des données précises sur le terrain. Les descripteurs de passeport multi-cultures doivent donc comporter un herbier de référence ainsi que les coordonnées selon le système de positionnement global (GPS) et, dans la mesure du possible, des photographies du port, de l'habitat et du substrat. Le matériel collecté au sol doit être enregistré comme tel et conservé séparément de celui qui a été récolté sur le plant parent. Les échantillons doivent comporter un nombre suffisant d'individus ou d'accessions et être de taille assez importante pour permettre la mise en place d'un protocole de cryoconservation approprié et/ou pour être placés en cryostockage à long terme.

Il est nécessaire de veiller à ce que les semences et propagules soient de la meilleure qualité possible et d'éviter de conserver du matériel immature ou trop mûr ayant été exposé trop longtemps aux éléments naturels (dans le cas des semences). La collecte de propagules bien mûrs, propres et de haute qualité garantit une longévité maximale au cours de l'entreposage. Le matériel et les fruits (graines) trouvés au sol et présentant des abrasions ou des signes d'altération doivent être évités. Les semences de fin de saison s'avèrent souvent de qualité inférieure à celle des semences produites plus tôt dans la saison (Berjak et Pammenter, 2004). Il est préférable de ne pas collecter les semences récalcitrantes de fin de saison. Les facteurs saisonniers doivent également être pris en compte pour l'utilisation notamment de bulbes et de tubercules développant de nouvelles pousses uniquement dans certaines saisons, d'espèces ligneuses dont les bourgeons sont dormants en hiver et de jeunes inflorescences et pollens disponibles seulement en période de floraison.

La plupart des fruits à graines récalcitrantes sont contaminés par des moisissures, même lorsque cela n'est pas visible. Il s'agit là d'un problème grave. Il convient donc d'éliminer toute contamination superficielle par le biais d'une désinfection superficielle effectuée avant le transport. Ce problème est aggravé par les températures et les taux d'humidité élevés prévalant après la collecte et pendant le transport à la banque de gènes. Il peut s'ensuivre une perte rapide de la viabilité et une diminution de la longévité au cours de l'entreposage. Cependant, les semences et autres propagules peuvent être sensibles au froid et les températures élevées peuvent alors précipiter la germination ou endommager les graines. La température de transport ne doit donc être ni trop basse ni trop élevée, c'est-à-dire pas en dessous de 16 °C ni au-dessus de 25 °C.

Le problème de la contamination fongique s'observe également au cours des manipulations suivant la récolte au sein de la banque de gènes. Il faut donc soigneusement désinfecter la surface des fruits avant de les ouvrir. De la même façon, pour toute accession importée, la contamination peut provenir des récipients et des emballages. Ceux-ci doivent donc être incinérés, tel que le stipulent généralement les réglementations nationales pour la santé des plantes et des semences. Les fruits doivent être complètement débarrassés des pulpes et fibres enveloppant les graines. Il ne faut cependant pas utiliser d'eau car cela pourrait affecter la teneur en eau des semences en les hydratants davantage. Il est également important de réunir les informations relatives au poids des fruits et des graines avant de déterminer la teneur en eau des semences (voir norme 2).

Les semences doivent être transportées autant que possible à l'intérieur de leur fruit, qui servira à la fois de protection et de frein à la déshydratation. C'est le cas notamment pour les fruits à enveloppe dure. La perte d'eau stimule le métabolisme de germination et raccourcit la durée de conservation. Il est donc important que la teneur en eau soit maintenue lors de la collecte et pendant le transport, notamment en maintenant une humidité relative (HR) élevée dans les récipients de stockage. On préférera les sacs en plastique, non sujets aux bris. Les emballages isolants aideront à maintenir une température stable et sont particulièrement appropriés aux transports sur de longues distances.

Les semences récalcitrantes produites dans des fruits à enveloppe dure sont maintenues en de meilleures conditions et pour de plus longues périodes que si elles

sont extraites des fruits. Les fruits à chair tendre ou les fruits endommagés ou déhiscents doivent être immédiatement décontaminés, les semences extraites et les fruits enlevés et détruits. Lorsque le transport s'effectue sur de longues distances, il est conseillé d'extraire les semences, de les nettoyer manuellement et de procéder à une désinfection superficielle avant le transport. Lors d'expéditions sur le terrain, il serait préférable d'emporter un kit de désinfection comprenant des pastilles de purification d'eau ou d'hypochlorite de sodium (NaOCl), de l'eau (si possible stérile ou bouillie) et des serviettes en papier stériles.

En conditions tropicales, d'autres mesures peuvent être prises telles que l'entreposage des plantules à l'ombre (Marzalina et Krishnapillay, 1999) ou la collecte de matériel *in vitro* (Pence *et al.*, 2002; Pence et Engelmann, 2011). Lorsque l'on utilise du matériel collecté *in vitro*, les temps de transport doivent être minimisés.

Les explants cultivés *in vitro* doivent subir une décontamination superficielle, d'abord à l'éthanol à 70 pour cent, puis au NaOCl obtenu par dilution à partir d'une solution mère pure ou contenu dans de l'eau de Javel commerciale dont la concentration en chlore actif est d'environ 3 pour cent. Des gouttelettes de détergent peuvent en améliorer l'effet. D'autres produits peuvent aussi être utilisés à des concentrations appropriées (par exemple l'hypochlorite de calcium). Après la décontamination superficielle, les explants doivent être taillés jusqu'aux dimensions voulues. Noter que le désinfectant pénètre les surfaces coupées, créant des zones mortes qui doivent être éliminées lors du taillage.

Circonstances particulières

Lorsqu'une cargaison est contaminée ou abîmée, tout le matériel ainsi que l'emballage doivent être incinérés, quelles qu'en soient les implications financières.

Les cargaisons retardées dans des installations nationales de quarantaine sont un risque connu. Dans de tels cas, des dispositions doivent être prises pour minimiser les retards, y compris le recours à des services de courrier.

Lorsque la saison de production de fruits est « mauvaise », il est préférable de renvoyer la collecte à une saison ultérieure. Si les circonstances exigent la collecte de fruits tombés, seuls les fruits récemment abscisés doivent être pris en compte.

Les semences de certaines espèces réagissent parfois mal au NaOCl et/ou aux fongicides d'usage courant. Il faut alors avoir recours à des alternatives plus sûres (Sutherland *et al.*, 2002). A noter la possibilité d'utiliser de l'éthanol à 70 pour cent (v/v) dans de l'eau stérile ou bouillie.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Alercia, A., Diulgheroff, S. et Mackay, M. 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors* (MCPD V.2). Rome, FAO et Bioversity International (disponible à l'adresse suivante: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).

Berjak, P. et Pammenter, N.W. 2004. Recalcitrant seeds. Dans R.L. Benech-Arnold et R.A. Sánchez, éd. *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*, pp. 305-345. New York, États-Unis, Haworth Press.

Engelmann, F. 1997. *In vitro* conservation methods. Dans J.A. Callow, B.V. Ford-Lloyd et H.J. Newbury, éd. *Biotechnology and plant genetic resources*, pp. 119-161. Wallingford, Royaume-Uni, CABI.

ENSCONET (Réseau européen de conservation de graines indigènes). 2009. *Manuel de collecte de graines pour les espèces sauvages* (disponible à l'adresse suivante: www.ensconet.eu).

Marzalina, M. et Krishnapillay, B. 1999. Recalcitrant seed biotechnology applications to rainforest conservation. Dans E.E. Benson, éd. *Plant conservation biotechnology*, pp. 265-276. Londres, Taylor & Francis.

Pence, V.C. 1996. *In vitro* collection (IVC) method. Dans M.N. Normah, M.K. Narimah et M.M. Clyde, éd. *In vitro conservation of plant genetic resources*, pp. 181-190. Percetakan Watan Sdn. Bhd, Kuala Lumpur.

Pence, V.C. et Engelmann, F. 2011. Collecting *in vitro* for genetic resources conservation. Dans L. Guarino, V. R. Rao et E. Goldberg. *Collecting plant genetic diversity: technical guidelines*. Mise à jour 2011.. Rome, Bioversity International.

Pence, V. C., Sandoval, J., Villalobos, V. et Engelmann, F., éd. 2002. *In vitro collecting techniques for germplasm conservation*. IPGRI Technical Bulletin No. 7. Rome, IPGRI.

Sutherland, J.R., Diekmann, M. et Berjak, P., éd. 2002. *Forest tree seed health*. IPGRI Technical Bulletin No. 6. Rome, IPGRI.

6.2 Normes relatives au dépistage de comportement non orthodoxe et à l'évaluation de la teneur en eau, de la vigueur et de la viabilité

Normes

- 6.2.1 La catégorie de conservation des graines doit être déterminée immédiatement, en évaluant leur sensibilité à la déshydratation.
- 6.2.2 La teneur en eau doit être déterminée individuellement sur des parties distinctes du propagule et sur un nombre suffisant de plantes.
- 6.2.3 La vigueur et la viabilité doivent être évaluées à partir de tests de germination et sur un nombre suffisant de plantes.
- 6.2.4 Au cours des expérimentations, les échantillons de semences propres doivent être conservés dans des conditions ne favorisant ni la déshydratation ni l'hydratation.

Informations générales

La préservation de la viabilité des semences est une des fonctions essentielles d'une banque de gènes. Elle permet d'assurer que le matériel génétique est disponible pour les utilisateurs et génétiquement représentatif de la population à partir de laquelle il a été acquis. Dans une première étape, il est important de vérifier la catégorie de conservation des graines en évaluant la sensibilité du propagule à la déshydratation. Le réponse au séchage permettra ensuite d'établir le traitement nécessaire pour la cryoconservation. Le taux de séchage dépend d'un certain nombre de facteurs dont l'HR, la taille des graines, la nature de l'enveloppe, le débit d'air et la profondeur de la couche de semences (Pammenter *et al.*, 2002).

Le taux et l'uniformité de la germination d'un échantillon de semences, ou d'explants obtenus à partir de semences, est un indicateur fiable de la vigueur. La germination totale (c'est-à-dire la proportion ou le pourcentage de graines ou d'explants testés ayant finalement germé) révèle, quant à elle, la viabilité globale de l'échantillon. La viabilité d'un échantillon ne doit pas être inférieure à 80 pour cent.

Aspects techniques

La détermination de la teneur en eau et l'évaluation de la vigueur et de la viabilité doivent être effectuées en une seule opération, préalablement au choix du type de séchage. Le nombre de procédures pouvant être étudiées est déterminé par le nombre de semences disponibles. Trois méthodes de criblage des semences peuvent être utilisées pour la classification des graines. Elles comprennent la méthode qui permet de distinguer les semences récalcitrantes des semences intermédiaires (Hong et Ellis, 1996), celle conçue pour les cas où les semences sont limitées (Pritchard *et al.*, 2004) et celle qui permet d'évaluer les teneurs en eau des axes plutôt que des graines entières. Peu importe la méthode choisie, la déshydratation imposée au cours de la procédure de criblage ne doit jamais être menée à des températures élevées car celles-ci sont néfastes. Les températures recommandées pour les espèces tropicales et subtropicales ainsi que pour celles issues des régions tempérées sont respectivement de 25 °C et 15 °C (Pritchard *et al.*, 2004). Il convient d'établir pour chaque accession, une courbe de séchage évaluant la perte de viabilité en fonction de la diminution de la teneur en eau.

La teneur en eau présente dans les différentes parties des semences récalcitrantes est essentielle au succès de leur cryoconservation. La teneur en eau déterminée pour la graine récalcitrante entière ne donne pas d'indication de la teneur en eau de l'axe embryonnaire. Il faut donc déterminer séparément les teneurs en eau des axes embryonnaires, des embryons, des cotylédons charnus ou de l'endosperme (Berjak et Pammenter, 2004) et les mesurer individuellement (et non sur des échantillons groupés). Très souvent, la masse sèche des axes des semences récalcitrantes peut être très faible, de l'ordre de quelques milligrammes, et nécessite l'utilisation d'une microbalance.

Il est important de déterminer la teneur en eau de chaque accession nouvellement arrivée immédiatement après le nettoyage des propagules, afin d'éviter la déshydratation. Malgré la collecte d'autres accessions de la même espèce, on ne peut supposer que les teneurs en eau seront les mêmes. La composition des axes et des tissus de réserve des espèces sauvages récalcitrantes ou autrement non orthodoxes est souvent inconnue. Il est donc recommandé de procéder au séchage à une température de 80 °C jusqu'à atteindre un poids constant. Lorsque les tissus sont séchés à 80 °C, le temps mis pour atteindre un poids constant est généralement de 24h à 48h. Après la période de séchage, les échantillons doivent impérativement atteindre la température ambiante sans absorber d'eau avant d'être pesées à nouveau.

Il est recommandé d'évaluer la teneur en eau d'au moins 10 graines (déterminée sur la base d'une graine individuelle, d'un embryon ou d'un axe embryonnaire). Les analyses biochimiques nécessitent des semences additionnelles.

Les semences et les embryons/axes qui en sont excisés doivent être au stade le plus vigoureux de leur développement au moment de leur récolte. Les semences intactes germent mieux sur gélose aqueuse à 0,8-1 pour cent dans des récipients en plastiques fermés ou des boîtes de Pétri fournissant les mêmes conditions pour toutes les évaluations de ce type. La surface des semences doit être désinfectée avant que celles-ci ne soient mises à germer ou avant l'excision des embryons ou des axes

embryonnaires. La dormance n'est pas une caractéristique courante des semences récalcitrantes. Celles-ci devraient normalement commencer la germination peu après avoir été préparées. Cependant, le temps mis pour germer varie selon les espèces en fonction de l'avancement du développement embryonnaire. Pour chaque espèce, il est essentiel que tous les tests de germination et de viabilité soient effectués dans les mêmes conditions contrôlées. La production de jeunes plantes/plantules morphologiquement anormaux (Pammenter *et al.*, 2011) doit être notée et quantifiée. En effet, les anomalies peuvent résulter d'un stress imposé (par exemple la déshydratation des semences, des embryons ou des axes embryonnaires récalcitrants). Les essais de viabilité nécessitent un minimum de 20 graines.

Lors de la manipulation de semences récalcitrantes, un soin particulier doit être porté au maintien des teneurs en eau à des niveaux caractéristiques de ceux de la dissémination. Toutefois, les semences récalcitrantes intactes sont presque toujours trop grandes pour être refroidies à des températures cryogéniques. Par conséquent, les explants, les embryons ou les axes embryonnaires doivent être excisés des semences puis déshydratés. De plus, il est essentiel que l'ensemble de l'échantillon de semences propres soit conservé dans des conditions excluant toute variation de la teneur en eau. Si elles sont exposées aux conditions atmosphériques pour une durée quelconque, la teneur en eau des semences change et celles qui sont disséminées à des teneur en eau élevées se déshydratent.

Circonstances particulières

Pour les graines entières, si la banque de gènes ne dispose pas d'une salle de déshydratation à température et humidité contrôlées, elle peut avoir recours à la déshydratation sur paillasse sous cloche de verre ou à la déshydratation à l'ombre en couches simples. Les spécimens se trouvant dans toute boîte de Pétri mal fermée avant la sortie de l'étuve, doivent être remplacés dans l'étuve. En effet, les tissus secs absorbent rapidement la vapeur d'eau, surtout dans un environnement humide.

Les embryons ou axes embryonnaires excisés ne germeront pas aussi vite que les semences intactes. Il arrive souvent que les pousses ne se développent pas sur les axes embryonnaires excisés. Dans de tels cas, le critère d'évaluation de la vigueur et de la viabilité est la production de racines.

Lorsqu'il s'avère impossible de manipuler les embryons ou les axes embryonnaires pour une cryoconservation réussie, il faut avoir recours à d'autres explants. Ces derniers peuvent être de plusieurs types, les plus appropriés étant les méristèmes apicaux excisés à partir de jeunes plantes obtenus de la germination de graines *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Berjak, P. et Pammenter, N.W. 2004. Recalcitrant seeds. Dans R.L. Benech-Arnold et R.A. Sánchez, éd. *Handbook of seed physiology: applications to agriculture*, pp. 305-345. New York, États-Unis, Haworth Press.

Hong, T.D. et Ellis, R.H. 1996. *A protocol to determine seed storage behaviour*. IPGRI Technical Bulletin No. 1. Rome, IBPGR.

Pammenter, N.W., Berjak, P., Wesley-Smith, J. et Willigen, C.V. 2002. Experimental aspects of drying and recovery. Dans M. Black et H.W. Pritchard, éd. *Desiccation and survival in plants: drying without dying*, pp. 93-110. Wallingford, Royaume-Uni, CABI.

Pammenter, N.W., Berjak, P., Goveia, M., Serphen, Kioko, J.I., Whitaker, C. et Beckett, R.P. 2011. Topography determines the impact of reactive oxygen species on shoot apical meristems of recalcitrant embryos of tropical species during processing for cryopreservation. *Acta Horticulturae*, 908: 83-92.

Pritchard, H.W., Wood, C.B., Hodges, S. et Vautier, H.J. 2004. 100-seed test for desiccation tolerance and germination: a case study on eight tropical palm species. *Seed Science and Technology*, 32: 393-403.

6.3 Normes relatives à l'entreposage à l'humidité de semences récalcitrantes

Normes

- 6.3.1 L'entreposage à l'humidité est effectué en conditions d'humidité relative saturée. Les semences doivent être conservées dans des récipients étanches, à la température la plus basse pouvant être tolérée sans causer de dommages.
- 6.3.2 Toutes les semences doivent être désinfectées avant l'entreposage à l'humidité. Tout matériel infecté doit être éliminé.
- 6.3.3 Les semences entreposées doivent être régulièrement inspectées et échantillonnées afin de s'assurer qu'aucune contamination fongique ou bactérienne n'ait eu lieu et que la teneur en eau, la vigueur et la viabilité n'aient pas diminué.

Informations générales

Les semences récalcitrantes doivent parfois être entreposées à court ou moyen terme (des semaines voire des mois) pour la fourniture de matériel de plantation pour les programmes de réintroduction et de restauration ou tout simplement à des fins de conservation lorsque des expérimentations sont en cours. Afin de maximiser la durée de conservation des semences récalcitrantes, le principe fondamental consiste à maintenir la teneur en eau au même niveau que celui des semences fraîchement récoltées. Les semences ne doivent donc perdre d'eau ni avant ni après avoir été stockées. Le déclenchement de la germination peut être provoqué par de très faibles degrés de déshydratation. Une déshydratation plus importante peut entraîner des modifications délétères affectant la vigueur et la viabilité et réduisant la durée potentielle de stockage. L'entreposage à l'humidité est la conservation de semences récalcitrantes dans des conditions préservant leur teneur en eau et s'effectue en maintenant les semences en environnement clos et sous HR saturée.

Aspects techniques

Afin d'éviter toute perte d'eau des semences, l'entreposage à l'humidité doit être mené sous HR saturée, en maintenant une atmosphère saturée à l'intérieur des récipients de stockage. Idéalement, on préférera les sacs de polyéthylène scellés contenant un sac en papier (double ensachage) ou les seaux en plastiques de taille adaptée au nombre de semences (Pasquini *et al.*, 2011). Une précaution essentielle consiste à stériliser les récipients de stockage tels que les seaux à couvercles étanches ainsi que les grilles internes, avant d'y introduire les semences. Quel que soit le récipient choisi, il doit contenir un dispositif destiné à absorber toute condensation. Ce dernier doit être remplacé lorsqu'il est humide.

Les températures d'entreposage doivent être les plus faibles tolérables par les semences de chaque espèce, sans effet délétère sur la vigueur ou la viabilité. Ceci permettra de ralentir à la fois l'évolution vers la germination et la prolifération fongique. La température de l'entrepôt doit être maintenue constante afin de minimiser la condensation sur les surfaces internes des récipients de stockage. Pour les semences récalcitrantes provenant des régions tempérées, les températures d'entreposage sont de 6 ± 2 °C, alors que pour la majorité des semences d'origine tropicale et subtropicale, la gamme normale est de 16 ± 2 °C. Des exceptions peuvent exister en particulier pour les semences de certaines espèces équatoriales (Sacandé *et al.*, 2004; Pritchard *et al.*, 2004).

En conditions d'entreposage à l'humidité, les moisissures risquent de proliférer (ou plus rarement les bactéries). La vigilance et les mesures appropriées sont donc nécessaires pour endiguer toute infection se propageant dans les semences. Si les semences infectées n'étaient pas éliminées, elles contamineraient tout le contenu du récipient de stockage, ce qui rendrait les semences stockées inutiles et éliminerait leur potentiel à fournir des explants pour la cryoconservation. Par conséquent, il convient d'effectuer une inspection régulière dès le départ et de prendre les mesures nécessaires telles que l'application de fongicides, afin d'éliminer le plus tôt possible les contaminants superficiels et internes des semences (Calistru *et al.*, 2000).

Les surfaces des semences doivent être désinfectées, séchées et débarrassées de tout désinfectant résiduel, puis saupoudrées d'un fongicide à large spectre. L'absorption par les graines de fongicides systémiques appropriés est la manière la plus efficace d'éliminer les moisissures internes se trouvant pour la plupart juste en dessous des enveloppes. Ces fongicides peuvent cependant avoir un effet néfaste sur les graines. Une autre alternative consiste en la thérapie, appliquée notamment aux glands infectés (Sutherland *et al.*, 2002). Mais celle-ci ne peut être utilisée que lorsque les semences sont capables de supporter des hausses de température transitoires, ce qui n'est pas toujours le cas. Pour désinfecter directement les surfaces internes, il faut s'assurer que les semences survivent bien à l'entreposage à l'humidité après l'ablation des enveloppes, et que la présence de fongicides systémiques dans les tissus des graines ne les abîme pas.

Selon la durée de l'entreposage à l'humidité, les récipients doivent périodiquement être aérés brièvement pour éviter le développement de conditions anoxiques. Si tel est le cas, les récipients doivent être inspectés et toute semence contaminée doit être éliminée. L'idéal est d'entreposer les semences en couche simple. En cas de stockage en couches

multiples, les semences doivent être remuées lors de l'aération. Après avoir enlevé toute graine présentant des signes de contamination, il faut vider le récipient, désinfecter toutes les graines apparemment non contaminées et replacer le lot de semences dans un récipient stérile.

Les semences entreposées doivent être régulièrement échantillonnées afin de s'assurer que la teneur en eau, la vigueur et la viabilité n'ont pas diminué. La fin de la période de stockage utile est atteinte lorsque l'on observe une perte de la viabilité sans prolifération fongique (ou bactérienne), alors que la teneur en eau est demeurée essentiellement la même qu'au moment de l'entreposage à l'humidité. Il en est de la même lorsque la plupart des semences présentent des signes visibles de germination. La baisse de la viabilité des semences n'ayant pas subi de perte d'eau importante ou la production de protrusions radiculaires par la plupart des semences donnent une mesure de la durée possible d'entreposage à l'humidité, dans les conditions de températures spécifiques utilisées.

Circonstances particulières

La perte d'eau des semences indique que l'HR n'a pas été maintenue, probablement parce que les récipients de stockage n'étaient pas correctement scellés. Les résultats obtenus pour l'échantillon seront alors incertains et celui-ci devra être éliminé. La perte de viabilité des semences au cours de l'entreposage peut aussi être causée par une conservation à des températures inappropriées. Ce paramètre doit être résolu par le biais d'essais testant les réponses des semences à une gamme de températures. Les semences peuvent avoir perdu leur viabilité parce qu'elles étaient initialement de mauvaise qualité ou trop immatures au moment de la récolte.

Dans les cas de forte incidence, au sein d'une accession, de semences présentant une contamination interne, les contaminants doivent être isolés et identifiés dans le but de développer des moyens efficaces permettant de les éliminer des collections futures. L'identification du genre des moisissures peut aider à la sélection de fongicides. Des combinaisons (« cocktails ») de fongicides ciblant spécifiquement ces moisissures peuvent s'avérer plus efficaces. Certains virus présents dans les semences sont parfois résistants à tout traitement. Lorsque ceux-ci sont responsables de maladies graves, les plantes doivent être éliminées dès l'apparition de symptômes viraux.

Lorsque la contamination s'avère incurable, les semences ne peuvent pas être stockées de la même façon. Il convient alors de rechercher d'autres formes de conservation des ressources génétiques. Dans de tels cas, les semences doivent être mises à germer. Les jeunes plantes se développant à partir de toute graine non infectée doivent être maintenus en conditions de croissance ralentie et/ou utilisés pour fournir des explants de remplacement pour la conservation *ex situ*, c'est-à-dire transférés et plantés dans des collections en champ ou d'autres jardins le cas échéant.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

- Calistru, C., McLean, M., Pammenter, N.W. et Berjak, P.** 2000. The effects of mycofloral infection on the viability and ultrastructure of wet-stored recalcitrant seeds of *Avicennia marina* (Forssk.) Vierh. *Seed Science Research*, 10: 341-353.
- Pasquini, S., Braidot, S., Petrusa, E. et Vianello, A.** 2011. Effect of different storage conditions in recalcitrant seeds of holm oak (*Quercus ilex* L.) during germination. *Seed Science and Technology*, 39: 165-177.
- Pritchard, H.W., Wood, C.B., Hodges, S., et Vautier, H.J.** 2004. 100-seed test for desiccation tolerance and germination: a case study on eight tropical palm species. *Seed Science and Technology*, 32: 393-403.
- Sacandé, M., Jøker D., Dulloo, M.E. et Thomsen, K.A., éd.** 2004. *Comparative storage biology of tropical tree seeds*. Rome, IPGRI.
- Sutherland, J.R., Diekmann, M. et Berjak, P., éd.** 2002. *Forest tree seed health*. IPGRI Technical Bulletin No. 6. Rome, IPGRI.

6.4 Normes relatives à l'entreposage de cultures *in vitro* et en croissance ralentie

Normes

- 6.4.1 Les conditions optimales d'entreposage des cultures *in vitro* doivent être déterminées selon les espèces.
- 6.4.2 Le matériel conservé *in vitro* doit être maintenu à l'état de plantules entières, de pousses ou d'organes de stockage (pour les espèces qui en forment naturellement).
- 6.4.3 Un système de surveillance régulière doit être mis en place pour le contrôle de la qualité de la culture *in vitro* entreposée en croissance ralentie, ainsi que des éventuelles contaminations.

Informations générales

La conservation *in vitro* est utilisée pour la préservation à moyen terme (des mois voire des années) de parties de plantes ou de plantules, en conditions non nocives limitantes pour la croissance. Elle ne convient généralement pas à la conservation à long terme (Engelmann, 2011). La conservation *in vitro* est utilisée de préférence pour le matériel génétique cloné de cultures diverses car elle favorise les transferts sûrs de matériel génétique sous contrôle phytosanitaire réglementé. Les documents techniques fournissent des informations détaillées concernant les possibilités offertes par l'entreposage *in vitro*, notamment les principaux paramètres à prendre en compte ainsi que les rapports et la complémentarité avec d'autres technologies de conservation telles que les collections en champ (Reed *et al.*, 2004; Engelmann, 1999a).

Les cultures *in vitro* sont une source de matériel sain pour la distribution et la multiplication ainsi qu'une source d'explants pour la cryoconservation. Il est essentiel de procéder au retrait et à l'élimination en toute sécurité des matériels infectés, garantissant ainsi que le pathogène ou l'organisme nuisible ne sont pas libérés dans l'environnement.

Une surveillance régulière et permanente est nécessaire afin d'éviter l'accumulation de la contamination pouvant survenir lors des transferts et se propager à travers l'air entre les récipients, ou être activement transportée par des vecteurs tels que les acariens ou les thrips. La dégradation par hyperhydratation représente un autre danger. Elle commence généralement dans seulement quelques récipients, ce qui laisse une chance de sauver le reste du matériel si le phénomène a été observé assez tôt.

Aspects techniques

Les conditions optimales de croissance ralentie doivent être identifiées avant l'entreposage. Celles-ci peuvent être obtenues en manipulant des variables individuellement ou en association, notamment l'éclairage, la température et l'exposition moyenne (Engelmann, 1991). Cependant l'expérimentation est généralement nécessaire pour parvenir à des résultats optimaux.

Le type et la physiologie des explants conditionnent le succès ou l'échec de la croissance ralentie *in vitro*. La culture *in vitro* est également utilisée comme phase préparatoire à la cryoconservation ainsi qu'aux phases de récupération ultérieures. La première étape doit donc consister en la mise en place de milieux et de conditions appropriés à la croissance des explants. Pour ce faire, il faut disposer de procédures de désinfection superficielle adéquates ainsi que de milieux de germination appropriés (milieu standard [Murashige et Skoog, 1962] pouvant nécessiter des ajustements). Le milieu de base peut être déterminé à partir de la littérature traitant d'espèces similaires. Des protocoles standards ont été publiés et peuvent être utilisés comme guide (y compris George, 1993; Hartmann *et al.*, 2002; Chandel *et al.*, 1995). Mais très souvent, des essais détaillés sont essentiels (utilisant des milieux de culture et des conditions de croissance d'explants) et des protocoles élaborés sur mesure sont nécessaires même si les espèces sont étroitement apparentées.

L'hyperhydricité (« vitrification ») peut être évitée en s'assurant que les matériels sont conservés à l'état de plantules entières ou de pousses. Pour les explants d'espèces dont la croissance est naturellement lente, il n'est pas nécessaire de modifier les milieux ni les conditions de culture.

Lorsqu'on travaille pour la première fois avec des explants d'une espèce donnée, il est indispensable d'expérimenter avec la gamme de permutations et de combinaisons des moyens de parvenir à une croissance ralentie satisfaisante. Par exemple, des réponses très variables aux manipulations visant une croissance ralentie ont été enregistrées pour différentes espèces d'un même genre. Le maintien à long terme de la stabilité génétique d'un matériel stocké dans des conditions de croissance ralentie est primordial (Engelmann, 2011). Les conditions optimales d'entreposage pour les espèces résistantes au froid peuvent varier de 0 °C à 5 °C, ou légèrement plus. Pour le matériel en provenance des tropiques, les températures tolérées les plus basses vont de 15 °C à 20 °C, selon les espèces (Normah *et al.*, 2011; ProMusa; Engelmann, 1999a; Engelmann, 1991).

Diverses modifications sont généralement apportées aux milieux de cultures, notamment une diminution des quantités de minéraux, de sucrose et/ou la manipulation du type et de la concentration des régulateurs de croissance. L'ajout de substances osmotiquement actives (telles que le mannitol) peut également être efficace (Engelmann, 2011; Engelmann, 1999a). Le charbon actif présent dans le milieu peut adsorber les polyphénols exsudés (Engelmann, 1991).

Le type, le volume, les dispositifs de fermeture ainsi que l'atmosphère interne des récipients de culture sont des paramètres importants qui ne peuvent être établis que par expérimentation sur du matériel nouveau (Engelmann, 2011; Engelmann, 1991).

Bien que l'entreposage en croissance ralentie soit utilisé traditionnellement pour des matériels cultivés *in vitro*, les plantules peuvent également être conservées *ex vitro* dans des conditions de culture limitant la croissance. La croissance ralentie des jeunes plantes à l'ombre et en conditions d'éclairage limité, sous canopées naturelles est une alternative peu coûteuse (Chin, 1996). Par ailleurs, l'induction *in vitro* d'organes de stockage peut être utilisée pour augmenter efficacement la durée de conservation des cultures qui en forment naturellement (par exemple, le gingembre [Engels *et al.*, 2011], le taro, l'igname, la pomme de terre etc.).

Circonstances particulières

La culture *in vitro* d'explants d'espèces ligneuses pourrait poser des problèmes particuliers, surtout en ce qui concerne l'exsudation de polyphénols (Engelmann, 1999b). Les problèmes associés incluent le mauvais enracinement entraînant l'hyperhydricité des explants. L'hyperhydratation et la nécrose des feuilles au cours de la croissance ralentie peuvent conduire à la détérioration de la qualité et parfois à la mort des propagules.

Pour certains matériels, l'accumulation de bactéries cachées peut progressivement devenir un obstacle majeur à l'entreposage prolongé en croissance ralentie. Ce problème peut être contrecarré par le retrait provisoire des vitamines ou l'ajout d'antibiotiques au milieu de culture. Mais ces mesures ont rarement un effet permanent. Il peut donc être nécessaire de se débarrasser de ces cultures (Abreu-Tarazi *et al.*, 2010; Leifert et Cassels, 2001; Senula et Keller, 2011; Van den Houwe et Swennen, 2000; Van den Houwe *et al.*, 1998).

Des différences importantes peuvent exister entre les espèces ou variétés d'un même pool génétique, quant à la réponse à la conservation *in vitro*. Certaines réagiront bien alors que d'autres ne pourront pas être conservées par cette méthode, la rendant inapplicable (par exemple pour le café [Dussert *et al.*, 1997]). Certaines espèces (dont l'igname) peuvent former des organes de stockage *in vitro*, mais leur germination est difficile à obtenir. C'est aussi le cas des bulbilles obtenues *in vitro* pour certaines accessions d'une même espèce (par exemple l'ail [Keller, 2005]).

L'instabilité génétique de certaines espèces (telles que la canne à sucre) peut être aggravée par les techniques de culture *in vitro*, alors que la stabilité sur des périodes d'entreposage prolongées a été démontrée pour d'autres espèces (comme le manioc)

(IPGRI/CIAT, 1994). Ces dernières peuvent alors présenter des variations somaclonales à des fréquences plus élevées. Dans la plupart des cas, la variation somaclonale est minimisée par l'utilisation ultérieure de techniques permettant d'éviter l'induction de pousses adventives ou toute formation de cal basal suite à une coupure. Les cals éventuellement formés doivent être coupés lors du transfert vers l'étape de culture suivante. Afin d'éviter toute confusion concernant les raisons de toute manifestation de déviation génétique, il convient de veiller scrupuleusement à l'uniformité des explants d'origine et d'exclure tout chimérisme du matériel donneur (ou de les conserver avec soin en cas de besoin pour les plantes panachées). Le criblage régulier par marqueurs moléculaires étant trop onéreux, des échantillonnages peuvent être effectués régulièrement lorsque des variations somaclonales sont prévues.

La dormance des organes peut poser problème lorsque les pousses ne se forment plus (notamment chez les espèces qui développent des organes de stockage *in vitro*). La dormance peut être interrompue en pratiquant des coupures supplémentaires ou en appliquant des cytokinines. Au cas contraire, la seule solution (quoique incertaine) consiste à attendre jusqu'au bourgeonnement spontané.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Abreu-Tarazi, M.F., Navarrete, A.A., Andreote, F.D., Almeida, C.V., Tsai, S.M. et Almeida, M. 2010. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated "axenic" pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World J. Microbiol Biotechnol.*, 26: 555-560.

Benson, E.E., Harding, K. et Johnston, J.W. 2007. Cryopreservation of shoot-tips and meristems. Dans J.G. Day et G. Stacey, édés. *Methods in molecular biology*, Vol. 368. Cryopreservation and freeze drying protocols. 2e ed., pp. 163-184. Totowa, New Jersey, États-Unis, Humana Press.

Chandel, K.P.S., Chaudhury, R., Radhamani, J. et Malik, S.K. 1995. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seeds of tea, cocoa and jackfruit. *Annals of Botany*, 76: 443-450.

Chin, H.F. 1996. Strategies for conservation of recalcitrant species. Dans M.N. Normah, M.K. Narimah et M.M. Clyde, édés. *In vitro conservation of plant genetic resources*, pp. 203-215. Kuala Lumpur.

Dussert, S., Chabrilange, N., Anthony, F., Engelmann, F., Recalt, C. et Hamon, S. 1997. Variability in storage response within a coffee (*Coffea* spp.) core collection under slow growth conditions. *Plant Cell Reports*, 16: 344-348.

Engelmann, F. 1991. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica*, 57: 227-243.

Engelmann, F., ed. 1999a. *Management of field and in vitro germplasm collections*. Actes d'une réunion consultative, 15-20 janvier 1996. Cali, Colombie, CIAT, et Rome, IPGRI.

Engelmann, F. 1999b. Alternative methods for the storage of recalcitrant seeds - an update. Dans M. Marzalina, K.C. Khoo, N. Jayanthi, F.Y.M. Tsan et B. Krishnapillay, édés. *Recalcitrant seeds*, pp. 159-170. Kuala Lumpur, FRIM.

- Engelmann, F.** 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. In *Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 47: 5-16.
- Engels, J.M.M., Dempewolf, H. et Henson-Apolloni, V.** 2011. Ethical considerations in agro-biodiversity research, collecting, and use. *J. Agric. Environ. Ethics*, 24: 107-126.
- George, E.F.** 1993. *Plant propagation by tissue culture. Part 1: The technology.* 2e ed. Whitchurch, Royaume-Uni, Exegenics.
- Hartmann, H.T., Kesler, D.E., Davies, F.T. et Geneve, R.L.** 2002. *Plant propagation - principles and practices.* 7e ed. Upper Saddle River, New Jersey, États-Unis, Prentice Hall.
- IPGRI/CIAT (IPGRI/International Center for Tropical Agriculture).** 1994. *Establishment and operation of a pilot in vitro active genebank.* Report of a CIAT-IBPGR collaborative project using cassava (*Manihot esculenta* Crants) as a model. Cali, Colombie, IPGRI et CIAT.
- Keller, E.R.J.** 2005. Improvement of cryopreservation results in garlic using low temperature preculture and high-quality *in vitro* plantlets. *Cryo-Letters*, 26: 357-366.
- Leifert, C. et Cassells, A.C.** 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. In *Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 37: 133-138.
- Murashige, T. et Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Normah, M.N., Kean, C.W., Vun, Y.L. et Mohamed-Hussein, Z.A.** 2011. *In vitro* conservation of Malaysian biodiversity - achievements, challenges and future directions. In *Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 47: 26-36.
- ProMusa.** [Page web] (disponible à l'adresse suivante: http://www.promusa.org/tiki-custom_home.php).
- Reed, B.M., Engelmann, F., Dulloo, M.E. et Engels, J.M.M.** 2004. *Technical guidelines for the management of field and in vitro germplasm collections.* Handbooks for Genebanks No. 7. Rome, IPGRI.
- Senula, A. et Keller, E.R.J.** 2011. Cryopreservation of mint - routine application in a genebank, experience and problems. *Acta Hort.*, 908: 467-475.
- Van den Houwe, I. et Swennen, R.** 2000. Characterization and control of bacterial contaminants in *in vitro* cultures of banana (*Musa* spp.). *Acta Hort.*, 530: 69-79.
- Van den Houwe, I., Guns, J. et Swennen, R.** 1998. Bacterial contamination in *Musa* shoot tip cultures. *Acta Hort.*, 490: 485-492.

6.5 Normes relatives à la cryoconservation

Normes

- 6.5.1 Les explants sélectionnés pour la cryoconservation doivent être de la plus haute qualité et permettre le développement suivant l'excision, ainsi que la cryoconservation.
- 6.5.2 Chaque étape du protocole de cryoconservation doit être testé individuellement et optimisé, en termes de vigueur et de viabilité, pour le maintien d'explants.
- 6.5.3 Il convient de mettre en place des moyens de neutraliser les effets nocifs des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), lors de l'excision et de toute manipulation ultérieure.
- 6.5.4 Après leur récupération, les explants doivent être désinfectés selon des procédures stériles standards.

Informations générales

La cryoconservation permet le stockage pour une période indéfinie de cellules et de tissus dans de l'azote liquide (-196 °C), dans lequel toutes les activités métaboliques sont suspendues. Tout protocole de cryoconservation comporte quatre étapes essentielles: i) la sélection, ii) la préculture¹, iii) les techniques de cryoconservation, iv) la récupération de l'entreposage et v) l'établissement des plantes et des plantules.

Les protocoles de cryoconservation doivent être mis en place pour prévenir les dommages et peuvent inclure une éventuelle cryoprotection, le séchage partiel, le refroidissement, le stockage à des températures cryogéniques, le réchauffement et la réhydratation. Il existe deux principaux types de procédés de cryoconservation: le

1 Traitement pour l'acclimatation des explants lents à la déshydratation /au froid /au gel.

refroidissement lent conventionnel basé sur une déshydratation induite par la congélation et la congélation ultra rapide (vitrification), qui fait intervenir une déshydratation préalable au refroidissement (Engelmann, 2011a).

Aspects techniques

Sélection des explants

La vitesse de déshydratation et l'uniformité du séchage des cellules et des tissus dépend de la taille des semences. Les semences récalcitrantes étant trop grandes pour être séchées rapidement et uniformément, elles ne peuvent rester intactes lors de la cryoconservation. De plus, les cellules dont la teneur en eau est $\geq 1,0 \text{ g g}^{-1}$ ne peuvent survivre à l'exposition aux conditions cryogéniques. L'excision et la culture d'explants doivent être développées spécifiquement à des fins de cryoconservation. Les explants doivent être aussi petits que possible mais suffisamment grands pour permettre leur développement suite à l'excision et à la cryoconservation. L'uniformité cellulaire/tissulaire supérieure au sein de l'explant augmente une chance de cryoprotection de toutes les (ou la majorité des) cellules des explants et sa capacité de régénération sans la prolifération de cals. Les explants destinés à la cryoconservation peuvent être obtenus à partir des axes embryonnaires, des méristèmes apicaux et des tissus méristématiques et embryonnaires. Pour les semences récalcitrantes, les embryons ou axes embryonnaires excisés constituent des explants de choix. Si ces derniers s'avèrent trop grands, ne supportent pas le degré de déshydratation requis, sont sensibles à tous les modes de désinfection courants et/ou sont réfractaires aux conditions de culture, les méristèmes apicaux constituent alors de meilleurs explants.

Pour les espèces multipliées par voie végétative, les explants de choix sont les bourgeons, les apex et les tissus méristématiques et embryonnaires. Tous les types d'explants ne se prêtent pas aux mêmes procédés de cryoconservation, malgré la proximité taxonomique relativement étroite des espèces parentes (Sershen *et al.*, 2007). Les réponses aux procédés de cryoprotection doivent donc être vérifiées pour chaque espèce et chaque génotype. Le matériel immature est généralement plus sensible aux dommages provoqués par l'excision. De la même façon, les semences qui se sont développées ou ont germé jusqu'au stade de protrusions radiculaires visibles (ou d'autres parties de l'embryon) ne doivent pas être sélectionnées (Goveia *et al.*, 2004).

Les anthères entières ou les grains de pollen isolés peuvent aussi être utilisés pour la cryoconservation. Ils représentent la diversité génétique héritée au même titre que les semences. Cependant, étant porteur des gamètes mâles, ils ne possèdent généralement qu'un nombre haploïde de chromosomes (voir Ganeshan, 2008; Rajashekar, 1994; Weatherhead *et al.*, 1978). Le pollen conservé doit être inclus dans des capsules de gélatine, des poches en papier ou des bandelettes de papier; le pollen de certaines espèces doit être déshydraté avant l'entreposage.

Le matériel est récupéré en faisant tomber les anthères et les pollens, des capsules, des poches ou des bandelettes, à température ambiante. L'évaluation de la germination

du pollen s'effectue préférentiellement dans un milieu de germination. La viabilité peut être testée par coloration du pollen et les résultats sont corrélés à la germination, bien que le taux de germination soit presque toujours inférieur. Lorsque le comportement d'une espèce est encore inconnu, il faut effectuer des tests de pollinisation confirmant le succès de la fécondation pour chaque ensemble de semences (Ganeshan *et al.*, 2008; Rajashekar *et al.*, 1994; Weatherhead *et al.*, 1978).

Des outils probabilistes sont disponibles et facilitent le calcul du nombre de propagules à entreposer et à récupérer, selon les objectifs fixés, la survie après cryoconservation ainsi que d'autres paramètres (Dussert *et al.*, 2003).

Techniques de cryoconservation

Il est important d'établir une courbe de séchage des embryons ou axes embryonnaires excisés, afin d'identifier le temps de séchage nécessaire pour ramener le matériel à une teneur en eau appropriée. Une nouvelle courbe de temps de séchage doit être établie après toute préculture ou traitement cryoprotecteur.

La vitesse de refroidissement jusqu'aux températures de l'azote liquide est importante et doit être prise en compte en rapport avec la teneur en eau de l'explant. Le protocole de cryoconservation doit être sélectionné de manière à garantir que la teneur en eau se situe dans la gamme prévenant la formation de cristaux de glace intracellulaire lors du refroidissement et du réchauffage, mais également d'éviter l'endommagement de la structure subcellulaire lors de la dessiccation. À la limite supérieure de la gamme de teneurs en eau auxquelles les axes embryonnaires sont déshydratés, le taux de refroidissement le plus rapide est le meilleur. En effet le refroidissement très rapide des spécimens de petite taille a tendance à être plus uniforme et minimise le temps passé dans l'intervalle de température permettant la cristallisation de la glace. Les embryons et axes embryonnaires ne représentent en général qu'une portion insignifiante du volume et de la masse de la graine. Ils conviennent donc à la déshydratation ultra-rapide et permettent de ce fait d'éviter les problèmes d'endommagement liés au métabolisme. D'autre part, la vitesse de refroidissement est moins critique pour les axes récalcitrants subissant la déshydratation ultra-rapide (par déshydratation évaporatoire) aux limites inférieures de leurs seuils de tolérance.

Les techniques basées sur la déshydratation avec vitesse de refroidissement contrôlée s'appliquent à la cryoconservation de cultures d'embryons et de méristèmes apicaux provenant d'espèces des régions tempérées (Engelmann, 2011a). Pour le matériel végétatif, de nombreux protocoles et exemples de cryoconservation utilisant un ou plusieurs des procédés sont documentés pour toute une gamme d'explants d'espèces différentes (Benson *et al.*, 2007). Par ailleurs, de nombreuses publications, notamment du journal *CryoLetters*, traitent de la cryoconservation des apex, d'autres tissus méristématiques, de tissus embryonnaires et de bourgeons dormants. Lorsqu'un protocole a été élaboré avec succès pour une espèce donnée, il convient de procéder à des tests périodiques d'échantillons extraits de la cryoconservation, initialement après une courte période de stockage.

La plupart des protocoles de vitrification utilisent des substances cryoprotectrices (en général un mélange de substances pénétrantes et non pénétrantes). La déshydratation par évaporation est généralement utilisée pour les embryons zygotiques et les axes embryonnaires.

L'encapsulation-déshydratation ainsi que le procédé appelé vitrification (utilisant diverses solutions de vitrification [PVS]), initialement développés pour les apex et les embryons somatiques, ont aussi été utilisés dans des processus de cryoconservation d'embryons et d'axes embryonnaires obtenus à partir de semences. Un récent aperçu (Engelmann, 2011b) indique que tous les protocoles de vitrification élaborés pour les embryons somatiques utilisent du PVS2. La vitrification à l'aide de PVS2 a aussi été utilisée pour la cryoconservation des méristèmes apicaux d'un large éventail d'espèces en provenance de régions à la fois tropicales et tempérées, dont de nombreuses espèces tropicales à semences récalcitrantes et multipliées par voie végétative. Le PVS3 est aussi une solution de vitrification d'usage courant (Nishizawa *et al.*, 1993) ne contenant pas de DMSO. Elle est donc utilisée chez les espèces endommagées par le DMSO. Toute une gamme de solutions alternatives de chargement et de vitrification ont été élaborées récemment et peuvent être efficaces pour la cryoconservation de matériels sensibles aux PVS2 et PVS3 (Kim *et al.*, 2009a; Kim *et al.*, 2009b).

En général, une portion d'eau congelable est retenue aux limites inférieures de déshydratation tolérées par les embryons et axes embryonnaires récalcitrants. Dans cette fraction d'eau, il peut y avoir formation de cristaux de glace entre -40 °C et -80 °C, à la fois au cours du refroidissement lent et du réchauffement. Le réchauffement à ~ 37 à 40 °C empêche cette formation, en notant que le transfert du matériel des températures cryogéniques doit être très rapide.

Les principales techniques de cryoconservation et de leurs cruciales paramètres requis sont donnés ci-dessous:

- le refroidissement à vitesse contrôlée: le choix d'agent cryoprotecteur (rarement mélange de cryoprotecteurs); sélection de vitesse de refroidissement (pour éviter la cristallisation l'intérieur des cellules);
- l'encapsulation-déshydratation: la détermination du temps de déshydratation osmotique et son taux de traitement, la détermination du temps de dessiccation de l'air;
- la vitrification: la détermination du type de solution de vitrification et sa durée du traitement (évaluation de sa toxicité); PVS2 doit être utilisée sur la glace;
- la congélation des gouttelettes: la détermination de type de solution de vitrification et la durée du traitement (évaluation de sa toxicité).

Récupération à partir du cryostockage

Le réchauffement de matériel génétique vitrifié s'effectue généralement en deux étapes. La première est lente afin de permettre la détente du verre, généralement à température ambiante. Elle est suivie d'un réchauffement plus rapide à 45 °C permettant d'éviter la glaçogénèse (Benson *et al.*, 2011).

Pour un réchauffement rapide, les spécimens traités par encapsulation-déshydratation² peuvent être transférés directement sur du milieu de récupération/germination. Autrement, les cryotubes contenant les billes d'alginate peuvent être placés au bain-marie à 40 °C pendant 2-3 minutes. Les billes peuvent également être réhydratées par transfert en milieu liquide pendant environ 10 minutes. L'avantage de l'ablation de la capsule a également été démontré (Engelmann *et al.*, 2008). L'encapsulation-déshydratation s'est avérée cohérente et réussie pour les méristèmes apicaux de nombreuses espèces (González et Engelmann, 2006), les embryons de conifères (Engelmann, 2011b), diverses espèces et variétés d'agrumes, ainsi que des espèces de fruits des régions tempérées (Damiano *et al.*, 2003; Damiano *et al.*, 2007).

La restauration de l'activité métabolique de la cellule lors du réchauffement nécessite l'élimination des cryoprotecteurs toxiques et la restauration progressive de l'équilibre hydrique normal au fur et à mesure que la cellule retrouve une température normale de fonctionnement. Il peut être nécessaire de modifier légèrement la composition originale du milieu de récupération après que les explants aient été déshydratés ou exposés à un cryogène. L'utilisation de solutions de vitrification (PVS) nécessite une étape de dilution ou de déchargement (élimination des PVS toxiques) (Sakai *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2004).

La survie peut être compromise à toutes les étapes de la cryoconservation, en particulier lors du réchauffement et de la réhydratation, qui peuvent être accompagnés d'une explosion de dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS)³ (Whitaker *et al.*, 2010; Berjak *et al.*, 2011). Idéalement, les milieux de réchauffement et de réhydratation doivent contrebalancer les effets délétères des ROS. Cependant, il est impératif de mettre en place des moyens de réduire les explosions de ROS accompagnant l'excision (Whitaker *et al.*, 2010; Berjak *et al.*, 2011; Engelmann, 2011a; Goveia *et al.*, 2004). Les traitements à l'eau cathodique (solution de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium diluée et électrolysée) ont démontré des propriétés anti-oxydantes puissantes, neutralisant les effets des explosions de ROS à tous les stades d'un protocole de cryoconservation d'axes embryonnaires récalcitrants de *Strychnos gerrardii*. Le développement de pousses serait également favorisé (Berjak *et al.*, 2011). Les effets bénéfiques de ce traitement sont plus marqués lorsque le développement des embryons/axes progresse au cours d'une période d'entreposage à l'humidité, indiquant l'importance de l'état de développement des semences. Il semble que le traitement des axes à l'anti-oxydant non toxique qu'est l'eau cathodique offre à la fois une explication des échecs précédents des axes à produire des pousses ainsi qu'un traitement

2 L'encapsulation-déshydratation correspond à l'encapsulation des explants dans des billes d'alginate et leur culture (pré-culture) en milieu liquide enrichi en sucrose, sur des périodes allant jusqu'à 7 jours. Les explants sont ensuite soumis à la déshydratation sous hotte à flux laminaire ou sous flux d'air comprimé sec (déshydratation ultra-rapide), ou exposés au silicagel activé, afin que la teneur en eau atteigne ~0.25 g g⁻¹ (20 pour cent wmb). Ils subissent enfin un refroidissement rapide.

3 Les ROS sont des molécules hautement réactives, souvent des radicaux libres, qui endommagent les protéines, les lipides et les acides nucléiques.

améliorant permettant de neutraliser les explosions de ROS liés au stress. Par ailleurs, les instruments utilisés pour exciser les embryons/axes peuvent exacerber la production de ROS. À cet égard, l'utilisation d'une aiguille hypodermique est susceptible de causer moins de traumatisme qu'une lame chirurgicale (Benson *et al.*, 2007). L'utilisation d'un capteur de radicaux hydroxyles, le diméthyle sulfoxyde (DMSO) comme étape de pré-culture (avant l'ablation complète des restes cotylédonaire) et comme traitement après leur ablation facilite le développement de pousses. D'autres substances anti-oxydantes sont également utilisées pour neutraliser la formation de ROS, notamment l'acide ascorbique et les tocophérols (Chua et Normah, 2011; Johnston *et al.*, 2007; Uchendu *et al.*, 2010). La survie de matériel végétal peut aussi être évaluée en fonction de l'activité enzymatique des cellules de plantes vivantes (Mikula, 2006).

Établissement des jeunes plantes et plantules

Après le réchauffement des embryons et axes embryonnaires, l'étape suivante consiste à générer et à établir un jeune plant ou une plantule afin de compléter le cycle de régénération. L'établissement des jeunes plantes et plantules s'effectue en deux étapes: i) l'établissement *in vitro* et ii) l'établissement *ex vitro* suivi du durcissement et de l'acclimatation. Le matériel extrait du cryostockage doit être transféré en milieu de récupération, initialement à l'obscurité. L'introduction dans la culture *in vitro* doit être effectuée sous hotte à flux laminaire à l'aide d'instruments stériles, après avoir préalablement désinfecté la surface des explants. Si l'on ne dispose pas de hotte à flux laminaire (paillasse propre), le travail peut être réalisé dans des pièces propres fermées dont l'air a été rigoureusement désinfecté. Les embryons et axes embryonnaires doivent être réhydratés pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Lorsque ceux-ci sont directement exposés à un milieu de réchauffement, la réhydratation doit être effectuée dans une solution de la même composition. Un indicateur de la réussite de la cryoconservation des axes est observé lorsque les jeunes plantes obtenus produisent chacun une racine et une pousse. Pour le matériel multiplié par voie végétative, le cryostockage est considéré comme réussi lorsque des pousses sont obtenues et peuvent être plantées ou utilisées pour la micropropagation.

Après une période de culture à l'obscurité (par mesure de précaution) (Touchell et Walters, 2000), les explants sont généralement exposés aux conditions d'un local de culture conventionnel en termes d'intensité lumineuse et de température ambiante. Ces paramètres doivent avoir été établis dès le départ en fonction de l'espèce et de sa provenance. L'intensité lumineuse et la température doivent parfois être ajustées pour la germination *in vitro* et le développement de jeunes plantes/plantules. Il peut être nécessaire de repiquer les explants en plusieurs phases de culture. Il est crucial que les jeunes plantes et plantules produits *in vitro* soient initialement maintenus sous HR élevée. Celle-ci sera ensuite progressivement diminuée.

L'établissement *ex vitro* et le durcissement consistent essentiellement en un transfert des jeunes plantes/plantules provenant de milieu de culture à croissance ralentie ou de cryoconservation de matériel végétatif, des conditions hétérotrophes prévalant *in vitro* vers un milieu stérile à base de terre dans lequel se développeront des conditions

autotrophes. Le milieu de récupération doit contenir des macro- et des micronutriments, des minéraux essentiels et une source de carbone. L'ajout de régulateurs de croissance est parfois nécessaire. Les milieux doivent être stérilisés à l'autoclave. Tout composé thermolabile doit être préalablement stérilisé par filtration et ajouté ultérieurement au milieu stérile. Les milieux de germination des embryons ou axes embryonnaires de diverses espèces sont basés sur le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962). Le milieu nutritif MS peut être utilisé pur ou dilué de moitié ou du quart, selon les réponses observées chez les explants lors des premiers essais sur les semences d'espèces particulières. Selon le but recherché, les explants extraits de la cryoconservation se développent directement en jeune plant ou plantule destinés à l'acclimatation, ou sont soumis à une étape de multiplication précédant l'acclimatation et permettant de produire un nombre souhaitable de copies de l'accession récupérée.

Circonstances particulières

Il est à noter que l'élaboration de protocoles peut nécessiter plus d'une collection et peut s'étendre sur deux années ou plus, en raison de la saisonnalité de la disponibilité des semences.

Il faut également souligner que le matériel peut être conservé soit en immersion dans l'azote liquide, soit dans la phase gazeuse se trouvant au-dessus de l'azote liquide. La conservation dans la phase gazeuse est beaucoup plus coûteuse et moins sûre que le stockage dans la phase liquide. La présence de microbes en suspension dans l'azote liquide n'entraîne pas forcément la contamination des échantillons. En effet, ceux-ci sont également soumis aux procédures de lavage en conditions stériles effectuées lors du réchauffement. Dans l'azote liquide, bien que les spores adhèrent à la surface des explants, les microbes ne peuvent y pénétrer car de tels processus sont interrompus à des températures aussi basses.

Certains axes excisés peuvent ne pas germer à cause de leur état de maturité. Par conséquent, les propagules collectés doivent être placés en entreposage à l'humidité et périodiquement échantillonnés quant à la germination et à la performance des axes excisés. Si les semences ou propagules ainsi que les embryons ou axes ne germent pas, cela signifie que le matériel est mort ou dormant. Un test au tétrazolium permet de déterminer si elles sont encore viables. En cas de viabilité, la dormance est supposée. Des recherches doivent alors être entreprises en vue d'interrompre cet état de dormance.

Pour la plupart des espèces à semences récalcitrantes, la régénération ne peut être pratiquée de la même façon que pour les espèces à semences orthodoxes. Dans l'éventualité d'une baisse inacceptable de la qualité des embryons ou axes embryonnaires cryostockés, la seule solution consisterait en un ré-échantillonnage des semences à partir des populations parentes ainsi qu'un réajustement des procédures. Lorsque les embryons ou axes embryonnaires restent réfractaires à la cryoconservation, il faudrait mettre l'accent sur le développement d'autres explants plus appropriés, obtenus idéalement à partir de jeunes plantes ou plantules établis *in vitro*.



Le matériel provenant de culture ou d'entreposage prolongés *in vitro* est susceptible de contenir ou d'avoir accumulé des bactéries cachées (endophytes). Celles-ci sont révélées au cours de la récupération et compromettent alors l'ensemble de la cryoconservation. Un tel matériel ne convient donc plus à l'extraction de méristèmes apicaux destinés à la cryoconservation. Dans certains cas, les explants (segments nodaux) de matériel provenant de cultures maintenues à long terme *in vitro*, sont excessivement hydratés. Il faut alors cultiver du matériel source *de novo*.

Les cultures infectées doivent immédiatement être retirées du local de culture et détruites. L'éventualité la plus dévastatrice pour un local de culture est l'infestation par les acariens. Après avoir enlevé toute culture présentant des traces d'acariens, l'installation doit être rapidement désinfestée. Chaque récipient de culture doit ensuite être inspecté et toute culture restante portant des indices de la présence d'acariens doit être enlevée et détruite. Ces acariens percent le film de paraffine et propagent les spores de moisissures de toute culture infectée vers les autres cultures.

L'épuisement d'azote liquide dans une cuve de cryostockage ou un congélateur à azote liquide entraînerait la perte irréparable d'échantillons. Toute panne non détectée, électrique ou autre, du système de contrôle de la température d'un local de culture pourrait causer une surchauffe conduisant à des pertes importantes de matériel.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

- Benson, E.E. et Bremner, D.** 2004. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. Dans B.J. Fuller, N. Lane et E.E. Benson, éd. *Life in the frozen state*, pp. 205-241. Boca Raton, Floride, États-Unis, CRC Press.
- Benson, E.E., Harding, K. et Johnston, J.W.** 2007. Cryopreservation of shoot-tips and meristems. Dans J.G. Day et G. Stacey, éd. *Methods in molecular biology* vol. 368. Cryopreservation and freeze drying protocols. 2e éd., pp. 163-184. Totowa, New Jersey, États-Unis, Humana Press.
- Benson, E.E., Harding, K., Debouck, D., Dumet, D., Escobar, R., Mafra, G., Panis, B., Panta, A., Tay, D., Van den Houwe, I. et Roux, N.** 2011. *Refinement and standardization of storage procedures for clonal crops - Global Public Goods Phase 2: Part I. Project landscape and general status of clonal crop in vitro conservation technologies*. Rome, SGRP-CGIAR.
- Berjak, P., Sershen, Varghese, B. et Pammenter, N.W.** 2011. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. *Seed Science Research*, 21: 187-203.
- Chua, S.P. et Normah, M.N.** 2011. Effect of preculture, PVS2, and vitamin C on survival of recalcitrant *Nephelium ramboutan* Ake shoot tips after cryopreservation by vitrification. *Cryo Letters*, 32: 596-515.
- Damiano, C., Arias Padró, M. D. et Frattarelli, A.** 2007. Cryopreservation of some Mediterranean small fruit plants. *Acta Horticulturae*, 760: 187-194
- Damiano, C., Frattarelli, A., Shatnawi, M.A., Wu, Y., Forni, C. et Engelmann, F.** 2003. Cryopreservation of temperate fruit species: quality of plant materials and methodologies for gene bank creation. *Acta Horticulturae*, 623: 193-200.
- Dussert, S., Engelmann, F. et Noirot, M.** 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters*, 24: 149-160.
- Engelmann, F.** 2011a. Germplasm collection, storage and preservation. Dans A. Altman et P.M. Hazegawa, éd. *Plant biotechnology and agriculture - prospects for the 21st century*, pp. 255-268. Oxford, Royaume-Uni, Academic Press.
- Engelmann, F.** 2011b. Cryopreservation of embryos: an overview. Dans T.A. Thorpe et E.C. Yeung, éd. *Plant embryo culture methods and protocols. Methods in molecular biology*, Vol. 710, Springer Science+Business Media, LLC.
- Engelmann, F., González-Arno, M.T., Wu, Y., et Escobar, R.** 2008. The development of encapsulation dehydration. Dans B.M. Reed, éd. *Plant cryopreservation. A practical guide*, pp. 59-75. New York, États-Unis, Springer.
- Ganeshan, S., Rajasekharan, P.E., Shashikumar, S. et Decruze, W.** 2008. Cryopreservation of pollen. Dans B.M. Reed, éd. *Plant cryopreservation. A practical guide*. pp. 443-464. New York, États-Unis, Springer.
- González Arno, M.T. et Engelmann, F.** 2006. Cryopreservation of plant germplasm using the encapsulation-dehydration technique: review and case study on sugarcane. *CryoLetters*, 27: 155-168.
- Goveia, M., Kioko, J.I. et Berjak, P.** 2004. Developmental status is a critical factor in the selection of excised recalcitrant axes as explants for cryopreservation: A study of *Trichilia dregeana* Sond. *Seed Science Research*, 14: 241-248.

- Johnston, J., W. Harding, K. et Benson, E.E. 2007. Antioxidant status and genotypic tolerance of *Ribes in vitro* cultures to cryopreservation. *Plant Sci.*, 172: 524-534.
- Kim, H.H., Cho, E.G., Baek, H.J., Kim, C.Y., Keller, E.R.J. et Engelmann, F. 2004. Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: Effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions. *Cryo Letters*, 25: 59-70.
- Kim, H.H., Lee, Y.G., Shin, D.J., Kim, T., Cho, E.G. et Engelmann, F. 2009a. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *Cryo Letters*, 30: 320-334.
- Kim, H.H., Lee, Y.G., Ko, H.C., Park, S.U., Gwag, J.G., Cho, E.G. et Engelmann, F. 2009b. Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. *Cryo Letters*, 30: 291-299.
- Mikuła, A., Niedzielski, M. et Rybczyński, J.J. 2006. The use of TTC reduction assay for assessment of *Gentiana* spp. cell suspension viability after cryopreservation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28: 315-324.
- Murashige, T. et Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nishizawa, S., Sakai, A., Amano, Y. et Matsuzawa, T. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Sci.*, 91: 67-73.
- Rajasekharan, P.E., Rao, T.M., Janakiram, T. et Ganeshan, S. 1994. Freeze preservation of gladiolus pollen. *Euphytica*, 80: 105-109.
- Reed, B.M., éd. 2008. *Plant cryopreservation. A practical guide*. New York, États-Unis, Springer.
- Sakai, A., Hirai, D. et Niino, T. 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. Dans B.M. Reed, éd. *Plant cryopreservation. A practical guide*, pp. 33-57. New York, États-Unis, Springer.
- Sershen, Berjak, P., Pammenter, N.W. et Wesley-Smith, J. 2011. Rate of dehydration, state of subcellular organisation and nature of cryoprotection are critical factors contributing to the variable success of cryopreservation: studies on recalcitrant zygotic embryos of *Haemanthus montanus*. *Protoplasma*, 249(1): 171-86.
- Sershen, Pammenter, N.W., Berjak, P. et Wesley-Smith, J. 2007. Cryopreservation of embryonic axes of selected amaryllid species. *Cryo Letters*, 28: 387-399.
- Shatnawi, M.A., Engelmann, F., Frattarelli, A. et Damiano, C. 1999. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of almond (*Prunus dulcis* Mill.). *CryoLetters*, 20: 13-20.
- Touchell, D. et Walters, C. 2000. Recovery of embryos of *Zizania palustris* following exposure to liquid nitrogen. *Cryo Letters*, 21: 26-270.
- Uchendu, E.E., Leonard, S.W., Traber, M.G. et Reed, B.M. 2010. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. *Plant Cell Rep.*, 29: 25-35.
- Weatherhead, M.A., Grout, B.W.W. et Henshaw, G.G. 1978. Advantages of storage of potato pollen in liquid nitrogen. *Potato Res.*, 21: 331-334.
- Whitaker, C., Beckett, R.P., Minibayeva, F. et Kranner, I. 2010. Production of reactive oxygen species in excised, desiccated and cryopreserved explants of *Trichilia dregeana* Sond. *South African Journal of Botany*, 76: 112-118.

6.6 Normes relatives à la documentation

Normes

- 6.6.1 Les données d'identification de toutes les accessions doivent être documentées au moyen des descripteurs de passeport multi-cultures de la FAO/Bioversity. En outre, les informations relatives aux accessions doivent aussi inclure l'inventaire, les commandes, la distribution et les données relatives aux retours des utilisateurs.
- 6.6.2 Les données de gestion et l'information générées dans la banque de gènes doivent être enregistrées dans une base de données appropriée. Les enregistrements doivent inclure les données de caractérisation et d'évaluation (données C/E).
- 6.6.3 Il convient de conserver les données des paragraphes 6.6.1 et 6.6.2, de mettre à jour les modifications dans un système de base de données approprié et d'adopter des normes internationales relatives aux données.

Informations générales

Des informations complètes concernant les accessions sont essentielles à la gestion de la banque de gènes. Les données d'identification sont un minimum. Des données supplémentaires sont aussi très utiles, notamment les données géographiques (coordonnées GPS) et environnementales (cartes superposées des climats et des sols) relatives au site de collecte, ainsi que l'historique et les données de caractérisation et d'évaluation du matériel.

Aspects techniques

Les avancées dans le domaine des technologies de l'information facilitent aujourd'hui l'enregistrement, la gestion et le partage des informations relatives aux accessions.

Toutes les banques de gènes devraient utiliser des systèmes compatibles de stockage et de récupération des données. Les descripteurs de passeport multi-cultures de la FAO/Bioversity (Alercia *et al.*, 2012) facilitent l'échange de données et doivent être utilisés par toutes les banques de gènes.

Les données de caractérisation et d'évaluation sont produites par les utilisateurs. Ces données sont utiles à la gestion des collections des banques de gènes (Filer, 2012) et en facilitent l'utilisation ultérieure. Il est recommandé aux banques de gènes de solliciter des retours d'information concernant ces données.

Les données de gestion doivent être aussi complètes que possible afin de permettre un traitement efficace de la collection. La plupart des données de gestion sont utilisées uniquement en interne par le conservateur et n'ont que peu de valeur pour les autres utilisateurs et/ou banques de gènes receveuses. Les données de gestion devraient donc être restreintes à l'usage exclusif des détenteurs de collections. L'historique, la forme de vie et la disponibilité de l'accession pourront être extraits pour un usage publique. Outre les données essentielles relatives à l'accession (données d'identification et de caractérisation), ces données doivent comporter les informations suivantes:

- Historique (date de l'acquisition, numéros préliminaires, date de changement des numéros, identification taxonomique, nom du spécialiste ayant identifié le matériel, culture de tout matériel donneur en champ ou en serre, mode d'extraction du matériel destiné à la conservation *in vitro* ou à la cryoconservation à partir de ce matériel donneur).
- Type d'entreposage (*in vitro*, par cryoconservation ou en entreposage à l'humidité pour les semences récalcitrantes).
- Localisation du matériel entreposé (chambres de cultures, cryo-conteneurs avec placement sur portoir ou en boîte).
- Division de l'accession en plusieurs ensembles (matériel subdivisé en sous-clones, plusieurs ensembles destinés à la cryoconservation et nombre de tubes stockés).
- La duplication de sécurité (date de la duplication, institution ou pays où la duplication a eu lieu, personne responsable, référence aux documents relatifs aux accords régissant la duplication).
- Référence au protocole utilisé pour la culture *in vitro* et/ou la cryoconservation.
- Étiquetage des récipients de culture (codes couleurs et codes-barres). Des étiquettes résistantes à l'azote liquide sont disponibles et peuvent être collées sur les cryotubes déjà congelés.

Les avancées futures de la biotechnologie permettront de compléter les données phénotypiques par des données moléculaires. L'attribution de codes-barres aux accessions est utile à la gestion de l'information et du matériel et diminue les possibilités d'erreurs.

La majorité des banques de gènes disposent à présent d'ordinateurs et d'une connexion à Internet. Les systèmes informatiques utilisés pour la conservation des données et des informations permettent un stockage complet de toutes les informations associées à la gestion des collections en champ. Les systèmes de gestion des informations relatives au matériel génétique, tels que GRIN-Global (2011), ont été conçus spécialement pour la gestion universelle de la documentation et des informations des banques de gènes.

L'adoption de normes relatives aux données, existant aujourd'hui pour la plupart des aspects de la gestion des données des banques de gènes, contribue à faciliter la gestion des informations et à améliorer l'utilisation et l'échange de données. Le partage des informations relatives aux accessions et la mise à la disposition du public pour les utilisateurs potentiels de matériel génétique sont importants, afin de faciliter et de soutenir l'utilisation de la collection. En définitive, une bonne gestion des données et des informations favorise la conservation et la facilité d'utilisation du matériel génétique conservé.

Circonstances particulières

Une documentation perdue ou incomplète diminue la valeur d'une accession jusqu'à la rendre inutilisable. Le matériel inapproprié (par exemple les étiquettes non résistantes à l'azote liquide) peut entraîner des pertes de données. Dans les collections de taille importante, les compétences des travailleurs deviennent un facteur très important. Les risques d'entrée de données inappropriées doivent être clairement indiqués. Dans les collections complexes, l'accès effectif aux données de gestion doit être limité aux personnes responsables.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Alercia, A., Diulgheroff, S. et Mackay, M. 2012. *FAO/Bioversity Multi-Crop Passport Descriptors (MCPD V.2)*. Rome, FAO et Bioversity International (disponible à l'adresse suivante: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/1526.pdf).

Filer, D.L. 2012. *BRAHMS Version 7.0*. Department of Plant Sciences, University of Oxford, Royaume-Uni (available on <http://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/>).

USDA, ARS/Bioversity International/Fonds fiduciaire mondial pour la diversité des cultures. *GRIN-Global. Germplasm Resource Information Network Database - Version 1* (disponible à l'adresse suivante: http://www.grin-global.org/index.php/Main_Page).

6.7 Normes relatives à la distribution et aux échanges

Normes

- 6.7.1 Tout matériel génétique doit être distribué conformément aux lois nationales et aux conventions internationales pertinentes.
- 6.7.2 Tous les échantillons doivent être accompagnés d'un ensemble complet de documents pertinents exigés par les pays donneur et receveur.
- 6.7.3 Le fournisseur et le receveur doivent établir les conditions de transfert de matériel et doivent assurer un ré-établissement adéquat des plantes provenant de matériel *in vitro* ou cryoconservé.

Informations générales

La distribution de matériel génétique est la fourniture d'un échantillon représentatif d'une accession de banque de gènes en réponse à des demandes émanant d'utilisateurs de matériel phytogénétique. La demande de ressources génétiques est en augmentation constante pour répondre aux défis liés au changement climatique, à l'évolution des spectres de virulence des principaux insectes nuisibles et maladies, aux espèces exotiques envahissantes et aux autres besoins de l'utilisateur final. Cette demande a conduit à une plus large reconnaissance de l'importance de l'utilisation du matériel génétique conservé dans les banques de gènes, qui détermine au bout du compte la distribution du matériel génétique. Il est important que la distribution de matériel génétique à l'étranger soit conforme aux normes et aux standards internationaux relatifs aux réglementations phytosanitaires conformément aux provisions des traités et conventions internationaux pertinents sur la diversité biologique et les ressources phytogénétiques.

Aspects techniques

Les deux instruments internationaux régissant l'accès aux ressources génétiques sont le Traité international et la CDB. Le Traité international facilite l'accès aux RPGAA et au partage des avantages découlant de leur utilisation. Ce traité a établi un système multilatéral pour les RPGAA correspondant à un pool de 64 cultures vivrières et fourragères (communément appelées cultures de l'Appendice 1 du Traité) qui peuvent être distribuées à l'aide de l'ATTM). L'ATTM peut aussi être utilisé pour les cultures ne figurant pas à l'Appendice 1; d'autres modèles sont également disponibles. L'accès et le partage des avantages de la CDB sont conformes au protocole de Nagoya. La CDB et le Traité international soulignent ce continuum entre la conservation et l'utilisation durable, ainsi que l'accès facilité et le partage équitable des avantages découlant de leur utilisation.

Toutes les accessions doivent être accompagnées de la documentation requise, notamment les certificats phytosanitaires et les permis d'importation ainsi que les données d'identification. La destination finale doit être vérifiée avant chaque expédition, ainsi que les exigences phytosanitaires en matière d'importation. En effet, les réglementations sont fréquemment modifiées dans de nombreux pays. Le transfert de matériel génétique doit être soigneusement planifié en consultation avec l'institut national autorisé, afin de se procurer la documentation appropriée telle qu'un certificat phytosanitaire conforme aux exigences du pays importateur. Le pays recevant le matériel génétique doit fournir à la banque de gènes donatrice les informations concernant la documentation exigée pour l'importation de matériel végétal, y compris les exigences phytosanitaires.

La plupart des espèces à semences récalcitrantes sont des plantes vivaces ayant une durée de vie longue et ne se reproduisant que lorsqu'elles sont âgées de plusieurs années. Par conséquent, la régénération n'est pas la méthode la plus rapide permettant d'atteindre les tailles d'échantillons correspondant à la demande. Si l'échantillon est sous forme d'explant *in vitro*, il est possible d'effectuer une multiplication préalable à la production de plantules indépendants. La demande doit en être faite à l'avance.

Le matériel génétique doit arriver à destination en bonne condition. Il faut donc éviter les conditions environnementales défavorables au cours du transport et du dédouanement. Il est recommandé d'avoir recours à un service d'accompagnement fiable, ayant de l'expérience dans le dédouanement. Le temps écoulé entre la réception d'une demande de matériel génétique et l'expédition des matériels doit être minimisé afin d'augmenter l'efficacité du rôle de la banque de gènes. Lorsqu'un échantillon en état de cryoconservation est transféré vers une banque de gènes où il restera en cryoconservation, il doit être expédié dans un emballage isotherme contenant de l'azote liquide réfrigéré entièrement absorbé dans un matériau poreux (dry shipper).

Si l'échantillon est destiné à être cultivé immédiatement à la réception, il peut être réchauffé et encapsulé dans des billes d'alginate avant d'être expédié. Des semences synthétiques de ce type avaient été initialement élaborées pour les embryons somatiques mais peuvent aussi maintenir en bonne condition les embryons/axes excisés cryoconservés ayant été réchauffés et réhydratés, et ce pendant au moins 10 jours à une température de 16 °C sans que la germination ne soit déclenchée (protrusion radiculaire).

Les jeunes plantes ou plantules issus de semences synthétiques peuvent germer et s'établir à la fois *in vitro* et dans un milieu de culture stérile pour jeune plant. Cette technique est applicable à d'autres explants de petite taille issus de la cryoconservation, mais elle n'est utilisée que dans de rares cas.

Les plantules issues de l'entreposage *in vitro* en croissance ralentie ou de la cryoconservation, doivent être expédiées dans des conteneurs appropriés. Les receveurs de matériel conservé *in vitro* ou cryoconservé doivent pouvoir transférer le matériel dans des pots ou aux champs, ou de prendre les dispositions nécessaires pour cela. Pour l'expédition de plantules *in vitro*, il est recommandé d'utiliser des sacs en plastique comportant des zones d'aération spéciales. Lorsque les récipients sont en verre, les conteneurs doivent être suffisamment rembourrés et porter la mention « fragile ». La bonne orientation des récipients doit également être indiquée sur le conteneur.

Circonstances particulières

La mauvaise manutention, y compris les emballages inappropriés et les retards d'expédition, peuvent conduire à des pertes de viabilité et de matériel. Il est donc très important que les conditions de transfert de matériel aient été préalablement établies entre le fournisseur et le receveur et que les conditions indispensables à l'établissement correct des plantes soient assurées.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Nowell, D. et Larinde, M. 2006. Germplasm distribution. Dans *Manuel de manipulation des semences dans les banques de gènes*. Manuels pour les banques de gènes No. 8. Rome, Bioversity International.

6.8 Normes relatives à la sécurité et à la duplication de sécurité

Normes

- 6.8.1 Une stratégie de gestion des risques doit être mise en place et mise à jour pour répondre aux risques physiques et biologiques identifiés par les normes, y compris les problèmes tels que les incendies, les inondations et les pannes d'électricité.
- 6.8.2 Toute banque de gènes doit se conformer aux exigences et aux protocoles locaux de Santé et Sécurité au Travail. Le département de cryoconservation d'une banque de gènes doit respecter toutes les précautions associées à l'utilisation d'azote liquide.
- 6.8.3 Une banque de gènes emploie le personnel requis pour remplir ses obligations ordinaires afin de s'assurer de pouvoir acquérir, conserver et distribuer du matériel génétique.
- 6.8.4 Pour chaque accession, un échantillon double de sécurité doit être entreposé dans un lieu géographiquement éloigné de la banque de gènes et dans les meilleures conditions possibles.
- 6.8.5 Le doublon de sécurité doit être accompagné de la documentation correspondante.

Informations générales

Il est de la plus haute importance que les infrastructures physiques de toute banque de gènes ainsi que la sécurité de son personnel soient protégées afin de garantir que le matériel génétique conservé soit à l'abri de toute menace externe. La bonne gestion d'une collection de matériel génétique nécessite également un personnel qualifié et formé. La gestion n'implique pas seulement la conservation de la collection et de ses données mais également l'évaluation des risques provenant de l'activité humaine ou de causes naturelles. L'utilisation d'azote liquide comporte des risques particuliers.



La sécurité physique des collections exige également leur duplication sur un site éloigné géographiquement et dans des conditions identiques. En cas de catastrophe physique naturelle (incendie, inondation) ce doublon peut être utilisé pour reconstruire les collections. La duplication de sécurité implique aussi une duplication de l'information, outre celle de l'échantillon lui-même, soit une sauvegarde de la base de données.

Aspects techniques

Une collection en champ doit donc mettre en œuvre et promouvoir une gestion systématique des risques physiques et biologiques de l'environnement quotidien. Elle doit disposer d'une version écrite de la stratégie de gestion des risques concernant les actions à entreprendre en cas d'urgence survenant au sein de la banque de gènes concernant le matériel génétique ou les données associées. Cette stratégie, ainsi que le plan d'action qui l'accompagne, doivent être régulièrement revus et mis à jour afin de tirer parti des nouvelles réalités et des nouvelles technologies et d'en assurer la bonne diffusion parmi le personnel de la banque de gènes.

L'hygiène et la sécurité au travail du personnel doivent également être prises en compte. La zone de cryostockage doit être bien aérée et munie d'extracteurs d'air et de moniteurs d'oxygène. La fuite d'azote liquide dans les cryorécipients est potentiellement dangereuse. Afin de réduire le risque de blessure, les opérateurs doivent porter des vêtements, des gants et des masques de protection.

Il convient de toujours disposer de réserves d'azote liquide. Le maintien des niveaux d'azote liquide est vital. Les conteneurs de cryostockage doivent être placés dans un endroit approprié, aéré et où la température ne dépasse pas 50 °C. Le maintien des niveaux d'azote liquide dans les conteneurs est absolument crucial. Si tout l'azote liquide s'évapore, le contenu doit être entièrement éliminé.

La préservation de la viabilité des échantillons exige que la température des tissus soit maintenue en dessous de la température de transition du verre¹. Lors de la récupération d'une fiole à partir d'une tige ou d'une boîte de cryostockage, il convient de veiller à ce que la température des fioles restantes n'augmente pas jusqu'à atteindre la température de transition du verre. Les fioles ne doivent pas être étiquetées à l'aide d'étiquettes autocollantes conventionnelles car celles-ci se décolleront aux températures de l'azote liquide. L'utilisation d'une imprimante pour étiquettes contrôlée par ordinateur permet d'imprimer des étiquettes spécialement conçues pour les fioles de cryoconservation, ainsi que d'enregistrer l'information et un code barre unique. Il convient de suivre les recommandations du fabricant concernant le choix des fioles à utiliser selon les cas.

La gestion active d'une banque de gènes s'appuie sur du personnel qualifié et il est crucial d'assigner des responsabilités aux employés compétents. Une banque de gènes doit donc disposer d'un plan ou d'une stratégie relatifs au personnel, ainsi que du budget correspondant, alloué régulièrement, afin de garantir qu'un nombre minimum d'employés qualifiés sont disponibles pour lui permettre d'acquérir, de conserver et de distribuer du matériel génétique. Il est souhaitable d'avoir accès à des spécialistes disciplinaires et techniques dans un éventail de domaines. Le personnel doit avoir acquis les qualifications nécessaires dans le cadre d'une formation certifiée et/ou sur le lieu de travail, et les besoins en formation doivent être analysés au fur et à mesure qu'ils apparaissent.

Pour la sécurité physique des collections, il faut envisager une duplication de sécurité dans un lieu géographiquement éloigné et dans les mêmes conditions. En cas de catastrophe physique naturelle (incendie, inondation) ce double peut être utilisé pour reconstruire les collections. Le doublon doit être situé dans une région politiquement et géographiquement stable et à une altitude qui ne sera pas concernée par l'élévation du niveau des mers. Les conditions de stockage du doublon de sécurité doivent être aussi bonnes que celles de la collection initiale.

La duplication de sécurité nécessite un accord juridique signé en bonne et due forme entre le déposant et la banque de gènes receveuse. Cette dernière ne possède aucun droit d'utilisation ou de distribution du matériel génétique. L'accès aux collections doit être contrôlé afin d'éviter les utilisations non autorisées.

Les échantillons sont préparés de la même manière pour le doublon de sécurité que pour la collection de base. Il est de la responsabilité du dépositaire de s'assurer que la sauvegarde de sécurité soit de bonne qualité. Afin de prévenir la détérioration lors l'acheminement vers la banque receveuse, les échantillons cryoconservés doivent être expédiés dans un conteneur de type « dry shipper ». Le transport doit être le plus rapide possible.

1 Dans le PVS2, une des solutions cryoprotectrices les plus couramment utilisées, la température de transition du verre est d'environ -115 °C.

Circonstances particulières

Lorsqu'une banque de gènes ne dispose pas de personnel qualifié, manque de temps ou est soumise à d'autres contraintes, elle peut externaliser une partie de ses activités ou solliciter l'aide d'autres banques.

Les entrées non autorisées dans les locaux des banques de gènes peuvent conduire à la perte pure et simple de matériel mais aussi compromettre les collections par l'introduction d'organismes nuisibles et de pathologies.

Les conteneurs d'azote liquide sont souvent contaminés par des moisissures ou des bactéries. Les échantillons stockés dans la phase liquide peuvent être contaminés.

Des problèmes de responsabilités peuvent survenir si le matériel se détériore pendant le transport. Par conséquent, toutes les éventualités doivent être conformes à l'accord d'expédition.

BIBLIOGRAPHIE SÉLECTIVE

Benson, E.E. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 27: 141-219.

Volk, G.M. et Walters, C. 2006. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behaviour in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, 52: 48-61.



Annexe 1: Liste des acronymes

AFLP	polymorphisme de longueur de fragments amplifiés (<i>amplified fragment length polymorphisms</i>)
ATM	Accord de transfert de matériel
ATTM	Accord type de transfert de matériel
BRAHMS	Système de recherche botanique et de gestion des herbiers
CDB	Convention sur la diversité biologique
CIPV	Convention internationale pour la protection des végétaux
CRGAA	Commission des ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture
DMSO	diméthyle sulfoxyde
ELISA	Dosage immuno-enzymatique sur support solide
ENSCONET	Réseau européen de conservation de graines indigènes
EST-SSR	séquences génomiques exprimées - répétitions de séquences simples (<i>expressed sequence tags-simple sequence repeats</i>)
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
GBS	génotypage par séquençage (<i>genotyping-by-sequencing</i>)
GPS	système de positionnement global
GRIN	Réseau d'information sur les ressources en matériel génétique
GWS	sélection à l'échelle génomique (<i>genome-wide selection</i>)

HR	humidité relative
ICIS	International Crop Information System
IPGRI	Institut international pour les ressources phylogénétiques (maintenant appelé Bioversity International)
ISTA	Association internationale d'essais de semences
LN	azote liquide
MAS	techniques de sélection assistée par marqueurs (<i>marked assisted selection</i>)
MS	milieu Murashige et Skoog
NaOCl	hypochlorite de sodium
N_e	Taille effective de la population
NPGS	Système national de gestion du matériel génétique végétal (<i>National Plant Germplasm System, USDA</i>)
OIV	Organisation internationale de la vigne et du vin
PVS	solutions de vitrification de tissus végétaux
RAPD	amplification aléatoire polymorphique de l'ADN (<i>random amplified polymorphic DNA</i>)
RFID	Identification par radiofréquence
RFLP	polymorphisme de taille des fragments de restriction (<i>restriction fragment length polymorphisms</i>)
ROS	dérivés réactifs de l'oxygène
RPGAA	ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture
SID	Base de données d'information sur les semences (<i>Seed Information Database, Kew, Royal Botanic Gardens</i>)
SNP	polymorphisme à nucléotide unique
SOP	modes opératoires normalisés (<i>standard operating procedures</i>)
SSR	séquences répétées en tandem (<i>simple sequence repeats</i>)
UPOV	Union internationale pour la protection des obtentions végétales
USDA	Département de l'agriculture des États-Unis d'Amérique

Annexe 2: Glossaire

Accession: Un échantillon de semences distinct, identifiable de façon unique représentant un cultivar, une lignée ou une population, qui est maintenu en stockage pour la conservation et l'utilisation.

Banque de gènes: Un centre pour la conservation des ressources génétiques sous des conditions appropriées pour prolonger leurs vies.

Base de données: Un ensemble organisé de données interdépendantes assemblées dans un but précis et tenu dans un ou plusieurs supports de stockage.

Caractérisation: L'enregistrement des caractères hautement héréditaires qui peuvent être facilement visibles et qui sont exprimés dans tous les environnements.

Certificat phytosanitaire: Un certificat fourni par le personnel des services phytosanitaires du gouvernement certifiant que les semences sont pratiquement exemptes de parasites et de maladies.

Champ: Parcelle de terrain avec des frontières définies au sein d'un lieu de production où un produit est cultivé.

Code à barres: Un système informatisé de codage qui utilise un motif imprimé ou barres sur des étiquettes pour identifier les accessions de matériel génétique. Les codes à barres sont lus par un balayage optique du motif imprimé et en utilisant un programme informatique pour décoder le motif.

Collecte active: Un groupe d'accessions de matériel génétique qui sont utilisées pour la régénération, la multiplication, la distribution, la caractérisation et l'évaluation. Les collections actives sont maintenues en stockage à court et à moyen terme et sont généralement dupliquées dans une collection de base maintenue en stockage à moyen à long terme.

Collection: Un groupe d'accessions de matériel génétique conservées dans un but précis dans des conditions définies.

Conservation *ex situ*: La conservation de la diversité biologique en dehors de son habitat naturel. Dans le cas des ressources phytogénétiques, celle-ci peut être dans les banques de gènes de semences, collections *in vitro* ou en tant que collections vivantes en champ.

Conservation à long terme: L'entreposage de matériel génétique pour une longue période, par exemple dans des collections de base et des collections doubles. La durée de stockage avant que les semences doivent être régénérées varie, mais elle est au moins de plusieurs décennies, voire un siècle ou plus. La conservation à long terme a lieu à des températures en dessous de zéro.

Conservation à moyen terme: L'entreposage Le stockage de matériel génétique à moyen terme comme dans des collections actives et des collections de travail, il est généralement admis que peu de perte de viabilité se produira pendant une dizaine d'années. La conservation à moyen terme a lieu à des températures comprises entre 0 °C et 10 °C.

Cryoconservation de pollen: Les grains de pollen sont des cibles possibles dans certaines familles de plantes. Comme pour les semences il y a des espèces avec du pollen « orthodoxe » et celles avec un comportement « récalcitrant ». La déshydratation du pollen peut être nécessaire avant la cryoconservation, mais les pollens de certaines espèces sont facilement entreposables sans traitement préalable. Pour la régénération à partir d'échantillons de pollen stockés, un partenaire de croisement doit être présent pour obtenir le matériel végétal finalement demandé par l'intermédiaire de la production des semences et la germination.

Cryoconservation ou cryo-stockage: L'entreposage des organes de plantes dans de l'azote liquide (-196 °C) ou au-dessus, dans sa phase vapeur (maximum -140 °C). Dans le contexte des banques de gènes, il est utilisé pour les bourgeons, l'extrémité des pousses, d'autres tissus méristématiques et embryogéniques, des explants de semences récalcitrantes et (dans certains cas particuliers) des semences orthodoxes entières, le pollen et les embryons somatiques. Dans la plupart des cas les phases *in vitro* avant et/ou après la phase d'entreposage adéquate sont impliquées.

Culture *in vitro*: La culture des organes de plantes ou des plantes entières sur un milieu nutritif artificiel dans des récipients en verre ou en plastique. L'utilisation de la culture *in vitro* pour les cultures multipliées par voie végétative comprend plusieurs options, y compris la micropropagation, l'élimination des virus par la culture de méristèmes et l'entreposage en croissance ralentie. La culture *in vitro* est également utilisée comme une phase préparatoire à la cryoconservation ainsi que pour les phases de récupération après cryoconservation (voir également l'entreposage en croissance ralentie).

Descripteur: Un trait identifiable et mesurable, une caractéristique ou un attribut observé dans une accession qui est utilisé pour faciliter la classification, le stockage, la récupération et l'utilisation des données.

Distribution: Le processus de fourniture des échantillons d'accessions de matériel génétique aux sélectionneurs et aux autres utilisateurs.

Diversité génétique: La variété des traits génétiques qui entraînent des caractéristiques différentes.

Documentation: La collection organisée d'enregistrements qui décrivent la structure, l'objectif, le fonctionnement, la maintenance et les exigences relatives aux données.

Donateur: Une institution ou une personne ayant donné du matériel génétique.

Données de passeport: Informations de base sur l'origine de l'accession, telles que les détails enregistrés sur le site de collecte, le pedigree ou toute autre information pertinente qui contribue à l'identification d'une accession.

Dormance: L'état dans lequel certaines semences vivantes ne germent pas, même sous des conditions normalement convenables.

Doublon de sécurité: Un doublon d'une collection de base entreposée dans des conditions similaires à celle de la conservation à long terme, mais à un endroit différent pour se prémunir contre la perte accidentelle du matériel de la collection de base.

Durée de stockage: Le nombre d'années qu'une semence peut être stockée avant que la mort de la semence ne se produise.

Dérive génétique: Les changements dans la composition génétique d'une population lorsque le nombre d'individus est réduit en dessous de la fréquence de certains allèles au sein de celle-ci.

Échantillon: Une partie de la population utilisée pour estimer les caractéristiques de l'ensemble.

Échantillon le plus original (EPO): Un échantillon de semences qui ont subi le moindre nombre de régénérations depuis que le matériel a été acquis par la banque de gènes, tel que recommandé pour le stockage comme collection de base. Il peut s'agir d'un sous-échantillon du lot initial de semences ou d'un échantillon de semences du premier cycle de régénération si le lot initial a besoin de régénération avant l'entreposage.

Échantillon aléatoire: Un échantillon prélevé au hasard dans un groupe plus large.

Entreposage *in vitro* à croissance ralentie: Le maintien des organes de plantes ou des plantes entières dans des conditions qui ralentissent la vitesse de développement de la plante afin de réduire la main-d'œuvre nécessaire et la fréquence des transferts qui pourraient être accompagnés de risques d'infections et de conditions de stress qui finiraient par mettre en danger la stabilité génétique. La principale méthode pour ralentir le développement est la réduction de la température, avec la température appropriée étant dépendante du taxon. À la fin d'une phase de sous-culture, le transfert dans un nouveau milieu est nécessaire, avec ou sans une étape de multiplication et parfois les périodes de culture chaude de rétablissement.

Évaluation: L'enregistrement de ces caractéristiques dont l'expression est souvent influencée par les facteurs environnementaux.

Gel de silice: Un produit chimique inerte qui absorbe de l'eau aux alentours et qui libère cette eau par évaporation quand il est chauffé.

Germination: Le procédé biologique qui conduit à l'élaboration d'une plantule à partir d'une semence. L'émergence de la radicule est le premier signe visible de la germination, mais elle peut être suivie par un arrêt de croissance ou par un développement anormal. Selon les règles de l'AIES, seules les plantules montrant une morphologie normale sont considérées comme ayant germé.

Germoplasme: Le matériel génétique qui constitue la base physique de l'hérédité et qui est transmis d'une génération à l'autre par les cellules germinatives.

Humidité relative (HR): Une mesure de la quantité d'eau présente dans l'air par rapport à la plus grande quantité possible que l'air peut contenir à une température donnée, exprimée en pourcentage. Elle diffère de l'*humidité absolue*, qui est la quantité de vapeur d'eau présente dans une unité de volume d'air, généralement exprimée en kilogrammes par mètre cube.

Intervalle de surveillance: La durée de stockage entre les tests de suivi.

Isotherme: Un graphique montrant la relation entre le taux d'humidité dans les semences et le pourcentage de l'humidité relative.

Isotherme de sorption: *Voir isotherme.*

Liste de descripteurs: Une collection de tous les descripteurs individuels d'une culture ou d'une espèce.

Multiplification: L'échantillon représentatif d'une accession cultivée afin de multiplier la quantité de matériel conservé en vue de la distribution.

Normes de régénération: Le pourcentage de viabilité des semences au dessous duquel l'accession doit être régénérée pour produire des semences fraîches.

Numéro d'accession: Un identifiant unique qui est attribué par le conservateur lorsque l'accession est entrée dans une collection. Ce nombre ne doit jamais être attribué à une autre accession.

Pathogène: Un micro-organisme vivant comme un virus, une bactérie ou un champignon qui cause une maladie dans un autre organisme.

Pedigree: L'enregistrement de l'ascendance d'une lignée génétique ou de la variété.

Phytosanitaire: Relatif aux plantes en quarantaine.

Phénotype: L'apparence extérieure d'une plante qui résulte de l'interaction de sa composition génétique (génotype) avec l'environnement.

Pollinisation: Le processus par lequel le pollen est transféré d'une anthère à un stigmate réceptif par des agents pollinisateurs comme le vent, les insectes, les oiseaux, les chauves-souris, ou l'ouverture de la fleur elle-même.

Population: Un groupe de plantes ou d'animaux individuels qui partagent une zone ou une région géographique et ayant des traits communs.

Propagule: Toute structure ayant la capacité de donner naissance à une nouvelle plante, que ce soit par la reproduction sexuée ou asexuée (végétative). Cela comprend les semences, les spores et toute autre partie du corps végétatif capable d'une croissance indépendante s'il est détaché de la plante mère.

Quarantaine: Le confinement officiel du matériel génétique introduit soumis aux réglementations phytosanitaires afin de s'assurer qu'il ne transporte pas de maladies ou de parasites nuisibles pour le pays importateur.

Régénération: La culture d'une accession de semences pour obtenir un nouvel échantillon avec une viabilité élevée et de nombreuses semences.

Semences orthodoxes: Les semences qui peuvent être séchées jusqu'à un taux d'humidité très bas et stockées à des basses températures sans dommage pour augmenter la longévité des semences.

Semences récalcitrantes: Les semences qui ne sont pas tolérantes à la dessiccation; elles ne se dessèchent pas pendant les derniers stades de développement et tombent à des teneurs en eau de l'ordre de 0,3 à 4,0 g g⁻¹. La perte d'eau entraîne rapidement une diminution en vigueur et viabilité, et la mort de semences à des taux d'humidité relativement élevés.

Surveillance: Le contrôle périodique des viabilités et des quantités des accessions.

Taux d'humidité (sur la base du poids humide): Le poids d'eau libre divisé par le poids de l'eau plus la matière sèche, exprimé en pourcentage.

Teneur en humidité à l'équilibre: Le taux d'humidité auquel une semence est en équilibre avec l'humidité relative de l'air ambiant.

Test de germination: Une procédure pour déterminer le pourcentage de semences qui sont capables de germer sous un ensemble donné de conditions.

Test de viabilité: Un test sur un échantillon de semences provenant d'une accession qui est conçu pour estimer la viabilité de l'accession entière.

Test du tétrazolium: Un test de viabilité au cours duquel les semences humides sont trempées dans une solution de chlorure de tétrazolium.

Trait: Une qualité reconnaissable ou un attribut résultant de l'interaction d'un gène ou d'un groupe de gènes avec l'environnement.

Variété: Une division reconnue d'une espèce, classée dans le rang au-dessous de la sous-espèce, elle se distingue par des caractéristiques telles que la couleur des fleurs, la couleur des feuilles et la taille de la plante mûre. Le terme est considéré comme synonyme de cultivar.

Variété locale: Un cultivar qui a évolué à travers la sélection dirigée des agriculteurs pendant de nombreuses années et qui est spécifiquement adapté aux conditions locales; les variétés locales sont généralement génétiquement hétérogènes.

Viabilité des semences: La capacité des semences à germer dans des conditions favorables.

Crédits photo

Couverture:

La composition graphique a été adaptée de la FAO Mediabase et d'autres sources prises de l'Internet.

Pages internes:

- v © FAO/M. Uz Zaman
- vii © nkzs - adapté de www.sxc.hu/photo/1239768
- ix © lazysheep1 - www.sxc.hu/photo/566617
- 1 © Linn Borgen Nilsen
- 2 © FAO/M. Uz Zaman
- 7 © FAO/G. Napolitano
- 8 © FAO/G. Napolitano
- 13 © chesnutt - www.sxc.hu/photo/1187030
- 15 © johnnyberg - www.sxc.hu/photo/1379733
- 17 © FAO/G. Napolitano
- 21 © CIAT/Neil Palmer
- 26 © CIAT/Neil Palmer
- 28 © gokoroko - www.sxc.hu/photo/298008
- 35 © iliana - www.sxc.hu/photo/107131
- 47 © FAO/P. Thekiso
- 54 © FAO/P. Thekiso
- 65 © Linn Borgen Nilsen
- 72 © FAO/O. Asselin
- 79 © FAO/G. Thomas
- 83 © alainap - www.sxc.hu/photo/922348
- 99 © FAO/G. Napolitano
- 106 © FAO/D. Dennis
- 111 © Ayla87 - www.sxc.hu/photo/757027
- 115 © FAO/G. Napolitano
- 116 © Linn Borgen Nilsen
- 146 © FAO/G. Bizzarri
- 156 © Global Crop Diversity Trust (GCDT)/Cary Fowler
- 159 Adapté de: www.az-cactus-for-sale.com/seeds-for-sale/Bottle-Tree-Seeds-For-Sale.htm
- 168 © brokenarts - www.sxc.hu/photo/211551



Des banques de gènes bien gérées ont le double avantage de préserver la diversité génétique et de rendre celle-ci accessible aux sélectionneurs. Les *Normes applicables aux banques de gènes pour les ressources phytogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture* établissent les procédures de conservation des ressources phytogénétiques. Ces normes, à caractère volontaire, constituent une référence pour les pratiques optimales scientifiques et techniques actuelles, et viennent appuyer les principaux instruments internationaux de politique en matière de conservation et d'utilisation des ressources phytogénétiques.