



HAL
open science

Contribution à la conservation et la valorisation de l'agrobiodiversité à l'île de La Réunion.

Michel Roux-Cuvelier

► **To cite this version:**

Michel Roux-Cuvelier. Contribution à la conservation et la valorisation de l'agrobiodiversité à l'île de La Réunion.. Biodiversité et Ecologie. Montpellier SupAgro, 2017. Français. NNT : 2017NSAM0020 . tel-04548994

HAL Id: tel-04548994

<https://theses.hal.science/tel-04548994>

Submitted on 16 Apr 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **Montpellier SupAgro**

Préparée au sein de l'école doctorale : GAIA
Et de l'Unité Mixte de Recherche : PVBMT

Spécialité : **EERGP : Ecologie, Evolution,
Ressources Génétiques, Paléobiologie**

Présentée par **Michel ROUX-CUVELIER**

**CONTRIBUTION A LA CONSERVATION ET LA
VALORISATION DE L'AGROBIODIVERSITE A
L'ILE DE LA REUNION**

Soutenue le 11 juillet 2017 devant le jury composé de :

Mme Marie-Laure NAVAS, Professeure, Montpellier SupAgro	Présidente
Mme Mathilde BRIARD, Professeure, AGROCAMPUS Ouest	Rapportrice
M. Ehsan DULLOO, Programme leader, Bioversity	Rapporteur
M. Jean-Luc REGNARD, Professeur, Montpellier SupAgro	Examineur
M Frédéric MOQUET, Responsable scientifique, Gautier Semences	Examineur

RÉSUMÉ

Depuis plus de 30 ans, mes activités professionnelles sont consacrées à l'étude et la valorisation de la diversité génétique des plantes alimentaires, en particulier des espèces tropicales souvent orphelines. Ces études sur l'agrobiodiversité des zones tropicales ont concerné la conservation, l'état sanitaire et la diversité génétique d'espèces variées (pomme de terre, riz, oignon et ail, fabacées et cucurbitacées, palmiers, ...).

Les ressources phytogénétiques sont des éléments majeurs des progrès de l'agriculture dans les pays du sud. Elles sont aujourd'hui de plus en plus menacées par la spécialisation et l'intensification des systèmes de production ainsi que les changements globaux tels que le réchauffement climatique, l'anthropisation des milieux. De plus, l'accès et l'usage de ces ressources à des fins de recherche et de valorisation se sont complexifiés en raison des aspects juridiques découlant de la Convention sur la Diversité Biologique et de la protection des innovations variétales.

La première partie de mon dossier de VAE retrace mon parcours professionnel en France et à l'étranger. Ce parcours est ponctué de phases d'activités professionnelles variées avec des responsabilités croissantes et de reprises d'études diplômantes qui m'ont conduit au poste de chercheur que j'occupe depuis 2001 au Cirad à La Réunion. Pour illustrer mes activités de recherche, trois projets sont présentés dans la seconde partie de mon document de VAE.

Le premier décrit des travaux de création variétale d'oignons tropicaux de jours courts. Il fait appel à des méthodes d'amélioration variétale classiques : introduction de diversité, création de familles hybrides, recombinaison et fixation des caractères par autofécondation, sélection récurrente individuelle et phénotypique. La sélection portait sur les principaux caractères suivants : rendement, teneur en matière sèche, couleur et forme du bulbe ainsi que la tolérance aux maladies. Plusieurs variétés permettant de diversifier et d'améliorer la production locale ont été créées.

Le second projet concerne la multiplication végétative d'une espèce de palmier exotique (*Bactris gasipaes*), introduite à La Réunion pour la diversification de la production agricole. La méthode de multiplication *in vitro* par embryogenèse somatique dérive des méthodes développées pour d'autres espèces de palmiers. Une étude histologique a mis en évidence une zone d'induction de la callogenèse à partir des cellules épidermiques de limbes foliaires juvéniles. Un protocole de multiplication a été mis au point puis développé par une start-up spécialisée dans la production *in vitro* de plantes agricoles et ornementales.

Le troisième projet est focalisé sur la conservation des ressources génétiques en milieu tropical, en particulier pour les espèces à multiplication végétative. Il est illustré par la mise au point d'un protocole de cryoconservation d'apex pour les vanilliers. Malgré de nombreuses difficultés liées à la spécificité des vanilliers, les résultats montrent la faisabilité de la technique de droplet-vitrification. En parallèle, des essais de cryoconservation de semences ont été conduits avec succès.

Au final, une analyse du contexte réglementaire en lien avec les droits de propriété intellectuelle et l'accès aux ressources génétiques est présentée. Elle s'appuie sur le cas de La Réunion et met en évidence les difficultés (voire les incongruités) rencontrées dans la mise en œuvre, en milieu tropical, de réglementations établies par les pays du Nord, surtout pour des espèces orphelines.

Ce dossier de VAE est complété par la mise en perspective de ma participation à un projet concernant la conservation et la valorisation de variétés locales de manioc en Afrique. Ce projet de réseau régional, particulièrement important pour lutter contre les deux principales maladies à virus du manioc, mobilisera différentes disciplines (génétique, santé des plantes et sciences sociales) dans une approche intégrée.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements à André Charrier, Professeur retraité de Montpellier SupAgro qui, dès le départ, m'a orienté vers la démarche de Doctorat par la VAE. André m'a apporté de très nombreux conseils qui m'ont été d'une grande utilité et a assuré un encadrement sans faille de la rédaction de mon dossier.

Je tiens également à remercier Bernard Reynaud, Directeur de l'UMR PVBMT, pour m'avoir encouragé et soutenu dans ma démarche et permis la rédaction de mon dossier en me dégageant de certaines responsabilités. Merci également à Eric Jeuffrault, Directeur Régional Réunion – Mayotte et à ma Direction de département BIOS pour m'avoir permis de réaliser cette VAE.

Je remercie vivement toute l'équipe de techniciens avec laquelle je travaille au quotidien au sein de l'unité, en particulier David Teyssèdre qui a mené les travaux de culture *in vitro* et de cryoconservation présentés dans ce dossier, mais aussi Nicolas Talibart, qui, depuis près de 15 ans, assure la mise en œuvre du programme de création variétale oignon.

Ces travaux n'auraient pas pu être menés à bien sans l'implication de l'équipe de terrain et de laboratoire. Je remercie vivement Johnny Acapandié, Jérémy Ramin, Pierre-Paul Boilly, Julien Mayen et Auguste Taïlamé.

Je voudrais adresser un grand merci à mes indéfectibles camarades de l'équipe BSV 2 :

Dominique Dessauw, qui partage mon bureau depuis plus de 2 ans et qui me supporte avec la bonne humeur qui le caractérise. Je le remercie vivement pour les relectures et corrections de mon dossier et ses commentaires toujours pertinents sur les aspects juridiques liés aux ressources génétiques.

Michel Grisoni, qui me fait partager sa passion et sa connaissance des vanilliers et avec qui j'ai pu construire le CRB VATEL. Merci Michel pour tes conseils éclairés en virologie et biologie moléculaire.

Jacques Dintinger, notre responsable d'équipe, ses conseils en génétique et sa relecture du chapitre sur l'oignon m'ont été particulièrement utiles.

Cyril Jourda, qui essaie tant bien que mal de m'initier aux joies de la génomique et de la bio-informatique. Tu as eu du courage Cyril !

Carine Charron, nouvellement arrivée et qui, outre ses compétences, apporte un peu de féminité dans notre équipe.

Mes collègues de l'Université de La Réunion en particulier Pascale Besse et Isabelle Fock-Bastide.

Un grand merci également à Frédéric Chiroleu et Agathe Allibert pour leur appui et leurs conseils en statistiques et pour m'avoir initié, formé et reformé à l'utilisation de « R ».

Merci également à tous mes collègues de l'unité et du Pôle de Protection des Plantes, en particulier ceux avec qui j'interagis régulièrement : Jean-Michel Lett, Isabelle Robène, Olivier Pruvost, Hélène Delatte, Jean-Philippe Deguine, Philippe Prior, Laurent Costet, Samuel Nibouche, Fabian Pillet... Une pensée fraternelle à mes camarades doctorants, Sylvia, Maude, Oriane...

Merci aux membres du jury pour l'évaluation de mon dossier et de ma soutenance.

Une pensée particulière à Cathy, mon épouse sans qui je ne me serais pas lancé dans cette aventure. Elle m'a apporté un soutien indéfectible et a veillé sur mon orthographe !!!

Un clin d'œil à mon fils Willem, à qui j'ai promis de soutenir un doctorat avant lui...

« Avoir l'esprit ouvert n'est pas l'avoir béant à toutes les sottises. »

Jean Rostand - Inquiétude d'un biologiste, 1967.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ	3
REMERCIEMENTS	5
SOMMAIRE	7
LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES	11
LISTE DES SIGLES ET ACRONYMES	13
I - PARCOURS PROFESSIONNEL	17
1.1 - INTRODUCTION	17
1.2 - LE CENTRE FRANÇAIS DU RIZ (CFR)	18
1.3 - LA DIRECTION DE L'AGRICULTURE ET DE LA FORET A MAYOTTE	20
1.4 - LE CIRAD A LA REUNION (DEPUIS 2001)	21
1.4.1- Introduction	21
1.4.2 - Position au sein de l'organisme.....	21
1.4.3 - Les missions.....	23
1.4.4 - Cadre de travail et gestion du personnel	23
1.4.5 - Activités d'enseignement, formation et encadrement	24
1.4.6 - Projet 1 : mise en œuvre de la réglementation européenne en matière de production et commercialisation de semences et plants à La Réunion	25
1.4.6.1 - Contexte.....	25
1.4.6.2 - Normes « Semences standard, règles et normes CE » et « Certification ».....	26
1.4.6.3 - Norme CAC Agrumes	26
1.4.7 - Projet 2 : conservation et valorisation des ressources génétiques.....	28
1.4.7.1 - Contexte.....	28
1.4.7.2 - Activités à La Réunion.....	28
1.4.7.3 - Développement à l'international, le projet GERMINATION.....	29
1.4.8 - Activités de recherche conduites à La Réunion	30
1.4.9 - Activités de recherche conduites à Mayotte	31
1.4.10 - Production scientifique	32
II - ACTIVITES DE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT	33
2.1 - ÉLÉMENTS DE CONTEXTE	33
2.2 - AMELIORATION VARIETALE D'UNE POPULATION D'OIGNON DE JOURS COURTS	34
2.2.1 - Introduction.....	34
2.2.2 - Problématique.....	35
2.2.3 - Schéma et objectifs de sélection.....	36
2.2.3.1 - Schéma de sélection	36
2.2.3.2 - Caractères sélectionnés	37
2.2.4 - Matériels et méthodes.....	38
2.2.4.1 - Matériel végétal	38
2.2.4.2 - Itinéraire technique de culture et dispositifs expérimentaux	38
2.2.4.3 - Contrôle des pollinisations.....	39
2.2.4.4 - Mesures effectuées.....	39

2.2.4.5 - Traitement statistique des données	40
2.2.5 - Résultats	40
2.2.5.1 - Phase préliminaire, sélection des parents	40
2.2.5.2 - Phase 1 : création de populations de sélection par hybridation.....	42
2.2.5.3 - Phase de sélection sur familles S1 et S2	43
2.2.5.4 - Phase d'inter-croisement et sélection des familles demi-frères	47
2.2.5.5 - Valorisation des variétés	49
2.2.6 - Discussion.....	51
2.2.6.1 - Sources de diversité utilisées	51
2.2.6.2 - Efficacité du schéma de sélection.....	51
2.2.6.3 - Discussion des résultats du contrôle variétal Geves.....	52
2.2.6.4 - Intérêt des variétés obtenues	53
2.2.6.5 - Perspectives.....	53
2.3 - MISE AU POINT D'UNE METHODE D'EMBRYOGENESE SOMATIQUE POUR LA MULTIPLICATION DU PALMIER <i>BACTRIS GASIPAES</i> KUNTH.	53
2.3.1 - Introduction.....	53
2.3.2 - Introduction du péjibaye à la Réunion	54
2.3.3 - Problématiques pour la production de plants de péjibaye à La Réunion	55
2.3.4 - Choix de la méthode de multiplication : l'embryogénèse somatique	56
2.3.5 - Matériels et méthodes	57
2.3.5.1 - Mise en culture de jeunes feuilles de <i>Bactris gasipaes</i>	57
2.3.5.2 - Mise en culture d'inflorescences immatures	57
2.3.5.3 - Plan expérimental et traitement des données	57
2.3.5.4 - Analyse histologique des explants.....	58
2.3.6 - Résultats.....	58
2.3.6.1 - Origine de la callogenèse primaire.....	58
2.3.6.2 - Description macroscopique de la callogenèse et de l'embryogénèse somatique	60
2.3.6.3 - Effet de la segmentation et du milieu de culture sur la callogenèse.....	61
2.3.7 - Discussion.....	62
2.3.7.1 - Conditions générales d'expérimentation.....	62
2.3.7.2 - Origine de la callogenèse.....	63
2.3.7.3 - Facteurs influençant la callogenèse	63
2.3.8 - Poursuite des travaux.....	64
2.3.9 - Discussion générale.....	66
2.4 - CONSERVATION DES RESSOURCES GENETIQUES VEGETALES (RGV) : LA SECURISATION DES COLLECTIONS EX SITU	67
2.4.1 - Introduction.....	67
2.4.2 - La cryoconservation pour préserver les ressources génétiques	68
2.4.3 - Application de la cryoconservation aux accessions de vanilliers.	69
2.4.3.1 - Introduction	69
2.4.3.2 - Présentation synthétique des travaux et résultats.....	70
2.4.3.3 - Discussion	71
2.4.4 - Cryoconservation de semences	72
2.4.4.1 - Introduction	72
2.4.4.2 - Cryoconservation de semences d'accessions du CRB VATEL	72
2.4.4.3 - Discussion	73

2.5 - CADRE REGLEMENTAIRE POUR L'UTILISATION DES RESSOURCES PHYTOGENETIQUES, LE CAS DE LA REUNION	73
2.5.1 - Introduction.....	73
2.5.2 - Constitution et maintien de collections de ressources génétiques vs réglementation.....	74
2.5.2.1 - <i>Éléments de contexte</i>	74
2.5.2.2 - <i>Aspects juridiques relatifs aux collections de ressources phytogénétiques de La Réunion</i>	77
2.5.2.3 - <i>Discussion</i>	78
2.5.3 - Protection des obtentions végétales et normes de production et commercialisation des semences et plants.....	79
2.5.3.1 - <i>Éléments de contexte</i>	79
2.5.3.2 - <i>Mise en application des réglementations à La Réunion</i>	81
2.5.3.3 - <i>Discussion</i>	84
III - PROJET PROFESSIONNEL	87
3.1 - CONTEXTE	87
3.2 - PROBLEMATIQUE	88
3.3 - UN PROJET POUR LA CONSERVATION DES VARIETES LOCALES DE MANIOC EN AFRIQUE DU SUD, DE L'EST ET CENTRALE.....	90
3.3.1 - Présentation du projet	90
3.3.2 - Apport des nouvelles technologies pour le génotypage, la détection de pathogènes et la conservation des RG	91
3.3.3 - Mise en place de règles de transfert et de partage des ressources génétiques et des connaissances traditionnelles associées.	93
IV - CONCLUSION GENERALE	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	97
LISTE DES PRODUCTIONS	109
ANNEXES.....	113

LISTES DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1 : synthèse des expériences professionnelles	18
Tableau 2 : organisation actuelle de l'UMR PVBMT	22
Tableau 3 : encadrements de VAT et VSC	24
Tableau 4 : principales actions réalisées dans le cadre du projet GERMINATION.....	30
Tableau 5 : activités de recherche conduites à La Réunion	31
Tableau 6 : liste des 40 variétés d'oignon retenues pour essai comparatif	40
Tableau 7 : comparaison du poids moyen d'un bulbe et de l'indice de réfractométrie pour un échantillon de 14 variétés	41
Tableau 8 : création de 68 populations de sélection : caractéristiques des croisements réalisés.....	42
Tableau 9 : intensité de sélection appliquée sur les hybrides	43
Tableau 10 : synthèse des résultats du premier cycle d'autofécondation	43
Tableau 11 : synthèse des résultats d'évaluation des familles S1 au champ S1 (2 sites).....	44
Tableau 12 : synthèse des résultats du second cycle d'autofécondation	46
Tableau 13 : intensité de sélection appliquée sur les familles S2.....	46
Tableau 14 : intensité de sélection appliquée durant 3 générations sur les familles sélectionnées.....	47
Tableau 15 : évolution durant 3 générations du poids moyen d'un bulbe pour les familles sélectionnées	48
Tableau 16 : classement des variétés d'oignon sélectionnées par les professionnels et principales caractéristiques.....	49
Tableau 17 : influence de la segmentation du cœur sur la callogenèse.....	61
Tableau 18 : influence de la segmentation du cœur sur la callogenèse. Test de khi ²	62
Tableau 19 : influence de la composition hormonale du milieu de culture sur la callogenèse.....	62
Tableau 20 : effet du 2iP sur la callogenèse.....	62
Tableau 21 : comparaison de deux instruments internationaux, CDB et TIRPAA pour l'accès aux ressources génétiques et le partage découlant de leur utilisation	75
Figure 1 : schéma de certification CAC Agrumes à La Réunion	27
Figure 2 : carte des zones de production de l'oignon à La Réunion	36
Figure 3 : schéma de sélection de nouvelles variétés d'oignon	37
Figure 4 : corrélation entre l'indice de réfractométrie et la teneur en MS mesurée sur 35 individus de la variété IPA 6	40
Figure 5 : répartition selon le diamètre des bulbes des variétés sélectionnées comme parents et comparaison pour le rendement en tonnes/ha	42
Figure 6 : poids et diamètre moyen d'un bulbe pour les 16 meilleures familles S0.....	43
Figure 7 : comparaison par rapport aux parents du poids moyen d'un bulbe des meilleures familles S1 sur 2 sites d'évaluation (parcelle agriculteur St Louis et station Bassin Plat)	45
Figure 8 : comparaison par rapport aux parents du taux de MS moyen des 11 meilleures familles S1 (site de St Louis)	45
Figure 9 : comparaison par rapport aux parents du rendement de 5 lignées sélectionnées (poids moyen récolté en g par mètre linéaire, moyenne de 4 parcelles).....	48
Figure 10 : comparaison par rapport aux parents de la teneur en MS de 7 lignées F6 sélectionnées.....	49
Figure 11 : photos des variétés sélectionnées	50

Figure 12 : schéma du palmier <i>Bactris gasipaes</i> (FAO, 1994)	54
Figure 13 : photos macroscopique de la gaine foliaire de péjibaye	58
Figure 14 : coupes histologiques de la gaine foliaire de péjibaye	59
Figure 15 : coupe histologique de limbe foliaire de péjibaye après 3 jours de culture.....	59
Figure 16 : observation de cals primaires sur l'épiderme de limbe foliaire de péjibaye après 3, 8 et 14 j de culture.....	60
Figure 17 : photos de gaine et limbe (A) après mise en culture (mec), cals (B) 40 j après mec et proembryons (C) 60 J après mec.....	61
Figure 18 : illustration des différentes étapes du protocole d'embryogenèse somatique	65
du péjibaye	
Figure 19 : effet de la durée des traitements B1 et B5 sur le % de survie des explants.....	70
Figure 20 : effet de la durée des traitements A1 et A7 sur le % de survie des explants	71
Figure 21 : explant survivant après cryoconservation et développement de plantule	71
Figure 22 : schéma d'accès aux ressources génétiques et de partage des avantages	76
Figure 23 : représentation les différentes actions à mettre en œuvre pour la collecte, la documentation, l'évaluation et la préservation des variétés locales de manioc en Afrique du Sud, de l'Est et Centrale	91

LISTE DES SIGLES ET ACRONYMES

ADPIC : Aspects des Droits de Propriété Intellectuelle qui touchent au Commerce
AERES : Agence d'évaluation de la recherche et de l'enseignement supérieur
AFLP : Amplified Fragment-Length Polymorphism
AFPA : Association nationale pour la Formation Professionnelle des Adultes
AMIS : Advanced Methods for Innovation in Science
ANSES : Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
APA : Accès et Partage des Avantages
ARIPO : African Regional Intellectual Property Organization
ARMEFLHOR : Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et HORTicole
ASSINSEL : Association Internationale des Sélectionneurs pour la Protection des Obtentions Végétales
ATM : Accord de Transfert de Matériel
ATTM : Accord Type de Transfert de Matériel
AVRDC : Asian Vegetable Research and Development Center - The world Vegetable Center
CAC : Conformitas Agraria Communitatis ou Conformité Agricole Communautaire
CATIE : Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CIAT : Centro Internacional de Agricultura Tropical
CBNM : Conservatoire Botanique National de Mascarin
CBSD : Cassava Brown Streak Disease
CDB : Convention sur la Diversité Biologique
CDD : Contrat à Durée Déterminée
CDI : Contrat à Durée Indéterminée
CEDEAO : Communauté Economique Des États de l'Afrique de l'Ouest
CES : Contrat Emploi Solidarité
CFR : Centre Français du Riz
GCP 21 : Global Cassava Partnership for the 21st Century
CGIAR : Consultative Group on International Agricultural Research
CIOM : Comité Interministériel de l'Outremer
CIP : Centro Internacional de la Papa
CIPV : Convention Internationale pour la Protection des Végétaux
CIRAD : Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
CITES : Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
CIV : Culture *In Vitro*
CMD : Cassava Mosaic Disease
CNEARC : Centre National d'Etudes Agronomiques des Régions Chaudes
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
COV : Certificat d'Obtention Végétale
CRB : Centre de Ressources Biologiques
CRP-RTB : CGIAR Research Program for Roots, Tubers and Bananas
CTA : Connaissances Traditionnelles Associées aux ressources génétiques
CTIFL : Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes
DAF : Direction de l'Agriculture et de la Forêt
DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes

DHS : Distinction, Homogénéité et Stabilité
 DPI : Droits de Propriété Intellectuelle
 EI : Engagement International de la FAO
 ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
 FAO : Food and Agriculture Organisation
 FDGDON : Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles
 FEADER : Fonds Européen Agricole pour le Développement Rural
 FEDER : Fonds Européen de Développement Economique et Régional
 FIDA : Fonds International de Développement Agricole
 GBS : Genotyping By Sequencing
 GERMINATION : Genetic Resources Management in Action Toward an Indian Ocean Network
 GNIS : Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants
 HCERES : Haut Conseil de l'Evaluation de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur
 HLB : HuangLongBing
 IBISA : Infrastructures en Biologie, Santé et Agronomie
 IBPGR : International Board for Plant Genetic Resources
 IITA : International Institute for Tropical Agriculture
 INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
 IPA : Agronomic Institute of Pernambuco
 IPK : Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
 IRD : Institut de Recherche pour le Développement
 ISTA : International Seed Testing Association
 ITCF : Institut Technique des Céréales et des Fourrages
 LAMP : Loop-mediated isothermal AMplification
 MS : Matière Sèche
 NGS : Next-Generation Sequencing
 NORAD : Norwegian Agency for Development Cooperation
 OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Économique
 OAPI : Organisation Africaine de la Propriété Intellectuelle
 ODEADOM : Office de développement de l'économie agricole des départements d'Outre mer
 OPA : Organisation Professionnelle Agricole
 OYDV : Onion Yellow Dwarf Virus
 PED : Pays En Développement
 PNUE : Programme des Nations Unies pour l'Environnement
 POCT : Programme Opérationnel de Coopération Territoriale
 PPM : Plant Preservation Mixture
 PVBMT : Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical
 RAD : Restriction-Associated DNA
 RG : Ressources Génétiques
 RGVA : Ressources Génétiques Végétales Agricoles
 RITA : Réseau d'Innovation et de Transfert Agricole
 RPA : Recombinase Polymerase Amplification
 RPG : Ressources PhytoGénétiques
 SADC : Southern African Development Community
 SEMOI : Semences de l'Océan Indien
 SNES : Station Nationale d'Essais de Semences
 SNP : Single Nucleotide Polymorphism
 SOC : Service Officiel de Contrôle et Certification
 SPAT : Santé végétale et Production Agroécologique en milieu Tropical

SPV : Service de la Protection des Végétaux
SQD : Semences de Qualité Déclarée
SSR : Simple Sequence Repeat
TIRPAA : Traité International sur les Ressources Phytogénétiques pour l'Alimentation et l'Agriculture
TYLC : Tomato Yellow Leaf Curl
UCBSV : Uganda Cassava Brown Streak Virus
UMR : Unité Mixte de Recherche / UMT : Unité Mixte Technologique
UPOV : Union internationale pour la Protection des Obtentions Végétales
VAT : Volontaire à l'Aide Technique
VATE : Valeur Agronomique, Technologique et Environnementale
VATEL : Vanilliers, Aulx Tropicaux Et Légumes lontan
VSC : Volontaire du Service Civique

I - PARCOURS PROFESSIONNEL

1.1 - Introduction

Le parcours professionnel qui m'a conduit au poste de chercheur que j'occupe actuellement au Cirad à La Réunion est atypique. Alors que les embauches de chercheurs s'effectuent aujourd'hui après des études de doctorat, voire un parcours post doctoral, j'ai été recruté en 2001 au niveau ingénieur en agronomie avec cependant une expérience spécifique pour le poste proposé. L'acquisition de cette expérience et l'accès à des niveaux croissants de responsabilités au cours de ma carrière se sont traduits par des périodes d'activités professionnelles et de reprises d'études diplômantes. Les premiers postes de technicien que j'ai occupés m'ont permis d'acquérir des compétences dans des domaines variés, de plus en plus axés, au fil du temps, sur la recherche agronomique avec une première expérience en tant que stagiaire à l'INRA. Par la suite, j'ai exercé une activité de recherche en expatriation au Cirad en Guadeloupe ; cette affectation outremer m'a permis d'acquérir des compétences élargies en culture *in vitro* et de bénéficier de l'appui et la formation des chercheurs expatriés en génétique-amélioration des plantes et en phytopathologie. J'ai pu ainsi par la suite assumer de nouvelles responsabilités, en particulier à Madagascar dans un projet de recherche et développement en agriculture financé par la coopération norvégienne. Cette expérience a été vécue dans un contexte humain très enrichissant mais avec des conditions de travail difficiles. A ce stade de ma carrière, j'ai repris mes études pour préparer un diplôme d'Ingénieur du CNEARC (Centre National d'Etudes Agronomiques des Régions Chaudes). Cela m'a permis d'assumer différentes responsabilités, en France métropolitaine au Centre Français du Riz (CFR) et outremer à Mayotte à la Direction de l'Agriculture et de la Forêt (Station Agronomique de Dembeni), lesquelles m'ont amené au poste que j'occupe actuellement au Cirad à La Réunion.

Depuis plus de 16 ans à La Réunion, j'assume des responsabilités de chercheur au sein de l'Unité Mixte de Recherche 53 PVBMT (Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical) dans une équipe de génétique des plantes. Dans ce cadre, mes travaux de recherche à vocation finalisée répondent à des problématiques axées sur la gestion et la valorisation des ressources génétiques et sur la qualité sanitaire du matériel végétal. Cette activité, à l'origine ciblée sur des problématiques locales du territoire de La Réunion, s'est rapidement étendue à l'échelle régionale vers les pays insulaires du Sud-Ouest de l'océan Indien.

J'ai ainsi pu acquérir des connaissances approfondies sur des espèces végétales agricoles variées (pomme de terre, riz, plantes maraichères, vanille... certaines étant considérées comme sous utilisées) dans les domaines de la génétique et la de sélection en lien étroit avec la santé des plantes.

Mes différentes activités de technicien et d'ingénieur, exercées en France et à l'étranger, sont résumées dans le tableau 1 et dans mon curriculum vitae en annexe 1. Mes activités de recherche les plus récentes sont développées dans les chapitres suivants.

Mon souhait de préparer un diplôme de Doctorat par la VAE s'inscrit logiquement dans mon évolution de carrière pour une meilleure valorisation de mes activités de recherche et une reconnaissance de mon travail par rapport aux standards de la recherche internationale (PhD).

Tableau 1 : synthèse des expériences professionnelles

Organisme/société	Intitulé du poste	Activité	Durée
Coopérative Agricole	Technicien commercial	Conseil aux agriculteurs, vente d'intrants agricoles	2 ans
Etablissements de vente de matériels agricoles, matériels électriques	Technicien commercial	Vente tracteurs Renault et matériel agricole, vente matériel électrique industriel et domestique	4 ans
Cirad - Guadeloupe	Technicien laboratoire	Appui à la mise au point de méthodes de culture <i>in vitro</i> (génétique-amélioration des plantes, phytopathologie)	1 an
Groupement de Recherche Français sur le Palmier dattier	Assistant Ingénieur	Mise au point d'une méthode de multiplication <i>in vitro</i> pour le palmier dattier	1 an
NORAD (Norwegian Agency for Development) / Projet FIFAMANOR Madagascar	Consultant	Mise en place d'une filière de production de semences saines de pomme de terre (Labo CIV, production de vitroplants, sevrage, contrôle sanitaire...)	5 ans
Centre Français du Riz	Consultant puis Directeur technique	Appui au CFR sur la connaissance et le contrôle des maladies du riz en Camargue Gestion de l'équipe technique du centre. Réalisation d'un programme annuel de recherche - expérimentation	2,5 ans
DAF Mayotte	Responsable de la Station Agronomique de Dembeni	Gestion administrative de la station. Réalisation d'un programme annuel de recherche - expérimentation	2 ans
Cirad La Réunion	Chercheur dans l'UMR PVBMT	Réalisation de programmes de recherche et développement Coordination de projets de coopération régionale dans l'océan Indien	16 ans

1.2 - Le Centre Français du Riz (CFR)

Ma spécialisation en protection intégrée des cultures au CNEARC m'a permis d'effectuer mon stage de fin d'études en France, sur une plante majoritairement cultivée en milieu tropical : le riz. Ce stage de 6 mois au Cirad Montpellier a été réalisé sous la responsabilité de Jean Loup Notteghem que je connaissais par ailleurs depuis mon séjour à Madagascar. Mon sujet de stage était l'étude des maladies des tiges de riz causées par des champignons à sclérote en Camargue au CFR (Centre Français du Riz) à Arles. Il a donné lieu à la rédaction d'un mémoire de fin d'études intitulé « Analyse épidémiologique des maladies du riz causées par *Sclerotium oryzae* Catt. et *sclerotium hydrophilum* Sacc. en Camargue ». Ce stage a été prolongé par un

CDD de 9 mois qui m'a permis de finaliser mon étude, de contribuer à la vulgarisation de nouvelles méthodes de lutte et d'assurer un appui technique aux techniciens du CFR ainsi qu'aux riziculteurs camarguais.

Par la suite, j'ai été recruté comme Directeur Technique du CFR pour reconstruire avec les partenaires du Centre, un programme de recherche validé par un Conseil Scientifique et répondant aux attentes des riziculteurs. Pour répondre à des problématiques très diverses, ce programme faisait appel à de nombreuses disciplines et comportait des expérimentations variées s'appuyant sur des partenariats avec les organismes de recherche nationaux et le secteur privé. Parmi ces actions on peut citer :

- La lutte contre les riz rouges (riz crodos) et adventices spécifiques du riz, *Echinochloa*, *Cyperaceae* : IRD, INRA, Cirad
- La lutte contre les maladies du riz, piriculariose et champignons des tiges (*Sclerotium spp.*) : Cirad
- La lutte contre les Chironomes et la Pyrale du riz : Université d'Avignon, INRA Sophia Antipolis
- L'homologation de nouvelles molécules (herbicides, insecticides) : Firmes phytosanitaires
- L'évaluation de nouvelles variétés : Cirad, coopérative Sud Céréales
- La préparation des sols de rizière et la gestion de l'eau : INRA Montpellier, Cirad
- L'amélioration de la fertilisation : INRA Montpellier

Pour réaliser ces actions, j'avais la responsabilité d'une équipe de trois techniciens de terrain, appuyée par des stagiaires (bac à bac + 3) et des ouvriers en personnel temporaire.

Durant mon séjour au CFR, j'ai mis en place une démarche qualité « Bonnes Pratiques d'Expérimentation (BPE) ». L'agrément BPE délivré par le COFRAC en 1998 était nécessaire pour réaliser, avec des firmes phytosanitaires, des essais officiellement reconnus pour l'homologation de matières actives. La demande d'agrément repose pour l'essentiel sur la rédaction de procédures et modes opératoires, accompagnée de la mise en place d'équipements et de formation du personnel, mais aussi de méthodes, protocoles pour obtenir et interpréter les résultats d'essais.

J'ai assuré l'administration du CFR avec le montage de budget, la rédaction et la justification des demandes de financement, en particulier auprès des conseils généraux et régionaux, la préparation des conseils d'administration et des conseils scientifiques.

J'ai également représenté le CFR dans des projets européens tels que BICORER (Biology and COntrol of REd Rice) et « Agronomic Data Base of European Rice growing area ». Ces projets m'ont conduit à participer à plusieurs séminaires et réunions de travail en France, Italie, Espagne et Portugal.

Le travail réalisé au CFR a été valorisé par un article sur les maladies à sclérotés du riz publié dans un dossier spécial de l'ITCF (Roux-Cuvelier, 1995), par la participation à deux autres articles (Notteghem et al., 1997 ; Puard et al., 1999) et à une conférence internationale sur le riz à Nottingham (cf. liste des productions p.109).

J'apporte une mention toute particulière pour ma collaboration avec Guy Clément, sélectionneur riz au Cirad, que j'ai côtoyé au quotidien et qui a été une source inestimable de connaissances sur le riz et la génétique en particulier.

Cette activité, au contact de chercheurs de différentes disciplines et dans un environnement particulier (riziculture intensive dans un milieu protégé, le Parc Régional Naturel de Camargue), m'a apporté de nombreux compléments de connaissances scientifiques et de nouvelles compétences en termes d'organisation et de gestion de moyens humains, financiers et techniques. Elle m'a permis aussi de développer le sens des relations permettant de mettre

en synergie les activités de nombreux intervenants, dans des disciplines différentes, de manière à développer une approche intégrée d'un système de culture et d'une filière.

Après plus de deux ans d'une activité très riche au CFR, j'ai souhaité repartir outremer, sur une offre de poste de la DAF de Mayotte, pour diriger une station d'expérimentation agronomique à Dembeni. J'ai donc quitté le CFR après avoir pris soin, avec le Conseil Scientifique du centre, de recruter un successeur qui puisse poursuivre les actions engagées.

1.3 - La Direction de l'Agriculture et de la Forêt à Mayotte

J'ai rejoint Mayotte en février 1999 avec un contrat de vacataire de 3 ans en tant qu'ingénieur, responsable de la Station Agronomique Expérimentale de Dembeni, sous l'autorité du Directeur de l'Agriculture et de la Forêt. Cette station a pour vocation la réalisation d'expérimentations agronomiques dans les domaines des cultures vivrières, maraîchères ainsi que sur les plantes fourragères et de couverture. Outre un ensemble de parcelles aménagées et irriguées, la station hébergeait un laboratoire opérationnel de culture *in vitro* pour la production de vitroplants de bananiers et un laboratoire de diagnostic et d'analyses phytosanitaires rattaché au Service de la Protection des Végétaux de la DAF. Le personnel de la station sous ma responsabilité se composait de 20 personnes :

- Trois cadres : un ingénieur et deux techniciens supérieurs.
- Une équipe de 17 agents techniques dont 5 CES (Contrat Emploi Solidarité)

Deux agents du SPV et un ingénieur CDD sous contrat ODEADOM (Office de développement de l'économie agricole des départements d'Outre-mer) responsable d'un programme de réhabilitation de la bananeraie Mahoraise complétaient l'effectif.

J'avais la responsabilité administrative de la station avec en particulier la gestion du personnel, la gestion du budget (programmation annuelle, suivi, restitution) et des infrastructures (entretien, construction de hangars, locaux de stockage, abri serres...)

Dans un premier temps, j'ai mis en place un comité de pilotage de la station de Dembeni pour m'assister dans la programmation et la réalisation des activités de recherche appliquée. Conscient d'être très isolé sur le plan scientifique, je me suis attaché à établir rapidement des collaborations avec les organismes de recherche nationaux et internationaux (INRA, Cirad, AVRDC - Asian Vegetable Research and Development Center ...).

Mes activités et mes sujets d'étude listés ci-dessous étaient orientés vers trois thématiques principales :

- la constitution de collections d'espèces variées, locales et introduites (maïs, taro, patate douce, manioc, pomme de terre, tomate, plantes de couverture)
- l'évaluation variétale (maïs, patate douce, salade, oignon, chou-fleur, melon, tomate) pour la diffusion d'un matériel végétal (semences et plants) de qualité
- la santé des végétaux : pyrales du maïs (*Chilo partellus*), mildiou du taro (*Phytophthora colocasiae*), tolérance de la tomate à *Ralstonia solanacearum*

L'expérience acquise au cours de ces deux années à Mayotte a été une nouvelle fois très enrichissante en raison d'une prise de responsabilités croissantes, mais aussi parce que cette expérience s'est déroulée dans un environnement climatique, sociologique et économique particulier. En effet, outre l'isolement scientifique, comparable voire supérieur à celui rencontré lors de mon séjour à Madagascar, la société mahoraise était confrontée, au début des années 2000, à une mutation très rapide, notamment avec l'évolution contrainte d'une très petite agriculture familiale vers une agriculture organisée, productive, répondant à des logiques de marchés et dont le développement était piloté par le Ministère de l'Agriculture.

Dans ce contexte, j'ai été amené à me poser de nombreuses questions sur l'efficacité du travail réalisé en termes de transfert de résultats de recherche et d'adoption de nouvelles techniques par les agriculteurs. Le modèle de développement agricole et les méthodes de vulgarisation me semblaient être peu adaptés au contexte humain très particulier de l'île de Mayotte, confronté de plus à une immigration clandestine croissante et non maîtrisée pesant lourdement sur le milieu agricole.

J'ai alors démissionné de mon poste en accord avec la direction de la DAF après deux ans d'activité. En effet, en milieu de deuxième année, le Cirad m'a proposé un poste d'ingénieur certificateur de matériel végétal (statut chercheur), en CDD à La Réunion pour une durée de 18 mois, prolongé en CDI. Avant mon départ de Mayotte, je me suis attaché à assurer la pérennité des activités de la Station de Dembeni reprise par le Cirad qui y affecta un chercheur.

1.4 - Le Cirad à La Réunion (depuis 2001)

1.4.1- Introduction

Située dans le Sud-Ouest de l'océan Indien, l'île de La Réunion possède une diversité climatique importante liée à sa géographie associée à des gradients importants d'altitude (0 à plus de 3 000 m) et de pluviométrie (précipitations annuelles de 500 mm à l'Ouest et de plus de 10 m à l'Est). Cette situation particulière et la présence de sols volcaniques plus ou moins récents a permis à La Réunion de développer une agriculture très diversifiée, aussi bien en productions tempérées que tropicales, sur des surfaces limitées.

Le Cirad est présent à La Réunion depuis plus de 50 ans. Son dispositif accueille une représentation de tous ses départements de recherche et près de 200 agents permanents ; c'est le plus important dispositif outremer. En 2001, j'ai été recruté au département AMIS (Améliorations des Méthodes pour l'Innovation Scientifique), devenu département BIOS (Systèmes Biologiques) en 2006, et affecté au Pôle de Protection des Plantes (3P) inauguré en décembre 2001. Ce Pôle qui regroupait à l'origine, le Cirad, le SPV (Service de la Protection des Végétaux) et la FDGDON (Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles) avait pour objectif de fédérer l'ensemble des compétences travaillant dans les domaines de la santé des végétaux et de la biodiversité, et de mutualiser les moyens disponibles. Les restructurations successives du Ministère de l'Agriculture ont conduit au remplacement du SPV par l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), représentée aujourd'hui par son laboratoire national pour les plantes tropicales.

1.4.2 - Position au sein de l'organisme

En 2003, le partenariat entre le Cirad et l'Université de La Réunion a été formalisé et s'est traduit par la création de l'UMR C53 PVBMT « Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical » (<http://umr-pvbmt.cirad.fr/>), unité à laquelle je suis rattaché depuis son origine. L'activité scientifique a été organisée en quatre axes de recherche de 2003 à 2009 et les effectifs ont été répartis en cinq équipes. Pour le contrat quinquennal 2010-2014, l'UMR PVBMT a été reconduite, toujours sous la double tutelle de l'Université de La Réunion et du Cirad, avec l'accueil de deux Directeurs de Recherche associés, INRA et IRD. L'activité des cinq équipes était regroupée en 3 champs thématiques :

- Génomique et épidémiologie des agents pathogènes émergents
- Complexes d'espèces et gènes d'intérêt
- Dynamiques écologiques en milieu insulaire

L'UMR PVBMT est localisée au Pôle de protection des plantes (3P) à Saint-Pierre, où sont présents la majorité des effectifs permanents et non permanents. Une partie des effectifs universitaires est localisée sur le Campus du Moufia à Saint Denis, à la Faculté des Sciences et Technologies, où se réalisent les enseignements de biologie en Licence et ceux de la plupart des Unités d'enseignement du master Biodiversité et écosystèmes tropicaux (BEST).

Lors de la dernière évaluation de l'AERES en 2014, une nouvelle organisation des équipes a été proposée et validée (cf. annexe 2 : organigramme de l'unité). Le champ thématique 2 auquel j'appartenais a été réorganisé et renommé "Diversité et utilisation durable des Ressources Génétiques Végétales en milieu tropical". Au sein de cette équipe qui regroupe 5 chercheurs, 5 enseignants-chercheurs et 13 agents de maîtrise, je suis responsable du projet 2 "Conservation et valorisation des ressources génétiques végétales". L'UMR 53 PVBMT a été reconduite jusqu'en 2019. Les équipes et projets de recherche de l'UMR sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : organisation actuelle de l'UMR PVBMT

Equipe 1 Génomique et épidémiologie des agents pathogènes émergents	Equipe 2 Diversité et utilisation durable des ressources génétiques végétales en milieu tropical	Equipe 3 Dynamiques écologiques en milieu insulaire
<i>Projet 1 : diagnostic des bactéries et virus phytopathogènes</i>	<i>Projet 1 : résistances durables aux maladies des plantes cultivées</i>	<i>Projet 1 : biologie et génétique évolutive des pollinisateurs et des aleurodes</i>
<i>Projet 2 : adaptation à l'hôte</i>	<i>Projet 2 : conservation et valorisation des ressources génétiques végétales</i>	<i>Projet 2 : gestion agroécologique des ravageurs des cultures et lutte contre les plantes invasives</i>
<i>Projet 3 : surveillance épidémiologique et épidémiologie moléculaire</i>	<i>Projet 3 : biologie et génétique évolutive des plantes indigènes ou patrimoniales</i>	<i>Projet 3 : biologie et écologie des arthropodes auxiliaires et des mouches des fruits</i>
		<i>Projet 4 : pratiques agroécologiques de protection de la culture cannière contre les ravageurs</i>

Placé hiérarchiquement sous l'autorité de Jacques Dintinger, généticien et responsable Cirad du champ thématique 2 avec Pascale Besse, Professeure à l'Université de La Réunion, j'interagis couramment avec Bernard Reynaud, Directeur de l'Unité. Bien que rattaché à cette équipe, j'occupe dans l'unité une position transversale qui implique de nombreuses relations avec mes collègues chercheurs de l'équipe 1 (projets 1 et 3) mais aussi de l'équipe 3 (projet2). Sur le plan des relations extérieures, mes activités m'ont permis de développer de nombreuses collaborations :

- Au niveau local avec l'ARMEFLHOR (Association Réunionnaise pour la Modernisation de l'Economie Fruitière, Légumière et HORTicole), structure qui réalise des expérimentations agronomiques, la Chambre d'Agriculture et les professionnels du secteur privé ((coopératives, groupements de producteurs, établissements semenciers : SEMOI (Semences de l'océan Indien), Flhorys.))
- Au niveau national, avec le GNIS (Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants) et le SOC (Service Officiel de Contrôle), le GEVES (Groupe d'Etude et de contrôle des Variétés Et des Semences) et la SNES (Station Nationale d'Essais de Semences) mais également avec des unités de recherche du Cirad (UMR BGPI, AGAP...) et de l'IRD (UMR DIADE, IPME) à Montpellier et l'unité GAFL de l'INRA Avignon.

- Plus récemment au niveau international, avec les organismes étatiques de recherche agronomique comme le FOFIFA à Madagascar, l'INRAPE aux Comores, le FAREI à l'île Maurice, les universités des pays de la zone Sud-Ouest de l'océan Indien, les organismes internationaux de recherche, principalement l'IITA (International Institute for Tropical Agriculture) en Tanzanie et l'AVRDC.

1.4.3 - Les missions

J'ai été affecté au Pôle de Protection des Plantes sur le site Cirad de Ligne Paradis, à Saint-Pierre (La Réunion) avec pour mission initiale de mettre en place les réglementations européennes appliquées en France en matière de production et de commercialisation des semences et plants pour l'ensemble des espèces produites sur l'île (cf. annexe 3 : lettres de mission). Dans ce cadre, j'ai assuré durant plus de 12 ans pour l'UMR, la coordination de tous les programmes des partenaires locaux et nationaux liés à ces activités et plus précisément dans le cadre du programme sectoriel fruits et légumes de l'ODEADOM. En parallèle, j'avais la responsabilité de programmes de gestion et valorisation de ressources génétiques végétales avec en particulier des travaux de sélection et d'amélioration variétale pour différentes espèces.

A partir de 2009, une part importante de mon activité a été consacrée aux projets de recherche Cryoveg, InterTrop, CIOM Réunion et Mayotte sur la conservation, la gestion et la valorisation des ressources génétiques végétales. Plus récemment, ces activités ont été étendues à l'international, au niveau régional océan Indien, avec la mise en place des projets GERMINATION (Genetic Resources Management in Actions Towards an Indian Ocean Network), phases I et II, dont j'assure actuellement la coordination.

Je me suis également investi dans la structuration et le fonctionnement de la plateforme 3P en participant activement à sa labellisation IBISA (Infrastructures en Biologie, Santé et Agronomie), à la mise en place du Centre de Ressources Biologiques (CRB) VATEL labellisé IBISA en 2008 et de l'Unité Mixte Technologique « SPAT » (Santé végétale et Production Agroécologique en milieu Tropical) qui a été reconnue en 2013. J'ai transféré la responsabilité du CRB VATEL à un collègue de l'équipe en 2011 afin de libérer du temps pour préparer les projets de coopération régionale.

J'ai assuré également l'intérim de la direction de l'UMR durant 4 à 10 semaines par an jusqu'en 2014 et j'ai été responsable du projet CIOM – Mayotte pour les activités de l'UMR avec l'encadrement d'un ingénieur VSC en poste à Mayotte.

Au cours de ces 14 années passées à La Réunion, mes missions et mes responsabilités dans un organisme de recherche finalisée, ayant un statut d'EPIC, ont largement évolué. Jusqu'à ce jour, cette évolution a suivi une ligne directrice axée sur deux thématiques : la qualité des semences et des plants commercialisés et la gestion, valorisation des ressources génétiques. Mon expérience peut être présentée chronologiquement sous forme de 2 projets conduits dans un premier temps à La Réunion puis élargis à l'international.

1.4.4 - Cadre de travail et gestion du personnel

De 2001 à 2007 mes activités s'inscrivaient dans le cadre des "Programmes Sectoriels fruits et légumes de l'ODEADOM". De 2008 à 2014 mes différents travaux ont été intégrés au programme REGENDA (Ressources Génétiques pour la Diversification de l'Agriculture) dont j'avais la responsabilité et qui était financé hors Programme Opérationnel de l'UE, par la Région Réunion, l'ODEADOM et le Cirad. Ce programme était constitué des projets REGENDA 1 : "Conservation et amélioration des ressources génétiques locales" et REGENDA 2 : "Valorisation des ressources génétiques à multiplication végétative". Depuis 2015, mes

activités sont financées par l'Union Européenne (FEADER : Fonds Européen Agricole pour le Développement Rural), la Région Réunion et le Cirad.

Pour la réalisation globale de mes activités, j'ai la responsabilité d'une équipe composée de 7 techniciens de terrain et de laboratoire de différents niveaux (jusqu'à BAC+3) et, en appui de 2002 à 2013, d'un ingénieur ou master VAT (Volontaire à l'Aide Technique) ou VSC (Volontaire du Service Civique). Il s'agit de la plus importante équipe de l'unité. Le management de cette équipe s'effectue essentiellement par des réunions hebdomadaires de bilan et programmation des activités.

1.4.5 - Activités d'enseignement, formation et encadrement

Dans le cadre de l'UMR PVBMT, j'assure depuis 2008 une charge d'enseignement à la Faculté des Sciences de l'Université de La Réunion au sein du Master « biodiversité, écologie et évolution » parcours « biodiversité des écosystèmes tropicaux terrestres », à raison de 6h/an (cours magistraux). Mes interventions portent sur les deux sujets suivants : "Protection des obtentions végétales, droits de propriété" et "Accès aux ressources génétiques végétales et transfert de matériel végétal". Ces enseignements sont dispensés au niveau M1 et depuis 2014 au niveau M2.

Par ailleurs j'ai assuré plusieurs formations professionnelles dans les domaines de la production de semences d'espèces potagères, notamment pour l'agriculture biologique, la gestion et la caractérisation de ressources génétiques. Ces formations, pour lesquelles j'ai réalisé tous les supports, étaient destinées à des techniciens d'organismes de recherche-expérimentation, d'organismes de développement (Chambre d'Agriculture) ou, à l'étranger, des agents d'ONG.

De 2002 à 2015 j'ai assuré l'encadrement de 19 stagiaires de niveau BAC+2 à BAC+5 pour des durées de 3 à 6 mois (cf. annexe 4). J'ai également recruté et encadré dix VAT et VSC, essentiellement de niveau BAC + 5 (tableau 3). A ces encadrements s'ajoutent de nombreux stages de formation professionnelle agricole (Brevet Technique, BEPA...) de courte durée.

Tableau 3 : encadrements de VAT et VSC

Année	Qualification	Etablissement	Nom
2003	Licence	Université de Lille	Bénédicte DEZ
2004	Ingénieur	Agro campus Ouest	Ellen BOUTY
2005/2006	DESS	Université Paris VI	Marianne Hedont
2007/2008	DESS	Université Paris XII	Johan Agrapart
2008/2009	Master	Université Paris XII	Thomas Deslandes
2010	Master	Université d'Angers	Radhati Abdou*
2010/2011	Ingénieur	Montpellier Supagro	Aline Dumont
2012/2013	Ingénieur	ESA Angers	Thomas Chesneau*
2012/2013	Master	Agro campus Ouest	Pierre Emmanuel Brandeis
2014/2015	Ingénieur	ISTOM	Charles Geffray*

(* VSC en poste à Mayotte encadrés depuis La Réunion)

1.4.6 - Projet 1 : mise en œuvre de la réglementation européenne en matière de production et commercialisation de semences et plants à La Réunion

1.4.6.1 - Contexte

Au début des années 2000, alors que la Réunion est département français depuis 1946 et fait partie des régions ultrapériphériques européennes, aucune réglementation en matière de production et de qualité des semences et plants n'est appliquée. L'apparition de crises phytosanitaires telles que l'épidémie de TYLC (*Tomato yellow leaf curl*), ou l'importance croissante des maladies des agrumes (chancre citrique, tristeza des agrumes), aggravées par l'absence de structuration de la filière fruits et légumes a eu des conséquences économiques importantes. De plus, en France et donc à La Réunion, la commercialisation des semences et des plants est réglementée selon plusieurs directives européennes. Dans ce cadre, les semences et plants commercialisés doivent posséder des qualités minimales et appartenir à des variétés distinctes, décrites et inscrites au Catalogue officiel des espèces et variétés. Les services de l'Etat (DAF, SPV) et la profession ont alors sollicité le Cirad pour le montage d'un projet visant à appliquer la réglementation européenne en matière de production et commercialisation de semences et plants à La Réunion en tenant compte du contexte insulaire et tropical particulier. Cette réglementation est aujourd'hui en vigueur à La Réunion. Les responsabilités que j'ai assumées précédemment, dans différents contextes et plus précisément dans le domaine de la qualité des semences et plants pour diverses espèces, m'ont permis de prendre en charge ce projet avec une autonomie immédiate.

La première initiative a été la mise en place d'un Comité de pilotage nommé « Amélioration du matériel végétal de base ». Ce comité regroupait l'ensemble des intervenants de la filière fruits et légumes appelés à jouer un rôle dans le projet, à savoir, la DAF et le SPV, le centre technique ARMEFLHOR, la Chambre d'Agriculture, la FDGDON, le marché de gros et l'établissement semencier SEMOI. J'ai assuré la coordination et l'animation de ce comité jusqu'en 2007, date de démarrage du nouveau Programme Opérationnel FEDER/FEADER. En parallèle, j'ai initié et développé les collaborations avec le GNIS-SOC (Linda Till, Hugues de Boisgrollier) et l'INRA – GEVES (François Boulineau, Joël Guiard, Richard Brand...) qui étaient au niveau national français les acteurs de la mise en œuvre de la réglementation européenne. Ces collaborations se sont traduites par l'organisation de missions d'appui à La Réunion et des échanges réguliers. Durant cette phase de mise en place du projet, les financements nécessaires à la réalisation des actions ont notamment été acquis au travers des programmes sectoriels fruits et légumes de l'ODEADOM établis pour 3 ans. En outre, j'ai assuré la coordination des actions menées par les chercheurs du 3P durant 4 programmes ODEADOM successifs de 2002 à 2013. Les financements ODEADOM de l'ordre de 100 000 € par an ont ainsi été pérennisés sur une période de plus de 10 ans d'activités.

En partenariat avec les différents intervenants impliqués, trois normes découlant de directives européennes et correspondant à des groupes d'espèces et des niveaux qualitatifs différents ont été mises en place.

- La norme « Semences standard, règles et normes CE » qui concerne les semences et plants d'espèces potagères produits à La Réunion
- La norme de « certification » qui concerne majoritairement les grandes cultures et certaines espèces à multiplication végétative comme l'ail ou la pomme de terre (Directive n° 2002/55/CE et 2008/72/CE. Décrets n° 81-605 et 94-510).

- La norme CAC (*Conformitas Agraria Communitatis*) pour la production de plants d'agrumes (Directive n° 2008/90/CE et Décret n°2010-1329).

1.4.6.2 - Normes « Semences standard, règles et normes CE » et « Certification »

Le préalable obligatoire à l'application des normes européennes pour la production et la commercialisation des semences et plants est l'inscription des variétés concernées au Catalogue Officiel pour les espèces éligibles. J'ai donc mis en place des programmes de sélection visant à homogénéiser des variétés populations locales d'aubergine et piment afin de pouvoir répondre aux épreuves de DHS (Distinction, Homogénéité, Stabilité) obligatoires pour l'inscription au catalogue officiel. Ce travail a permis l'inscription de 2 variétés d'aubergine et une de piment. Il a également contribué à structurer la filière de production de plants maraîchers ; il en a résulté une augmentation importante de la production de plants qui est passée d'environ 3 millions début 2000 à plus de 50 millions en 2016. Une filière de production de semences norme « semences standard » a également été mise en place en partenariat avec les établissements semenciers SEMOI puis FLHORYS.

Concernant les variétés locales d'aulx, deux variétés ont été assainies et inscrites au catalogue officiel sur la liste « variétés indemnes d'OYDV ». Dans la continuité, j'ai mis en place la filière de production de semences commerciales en transférant le matériel végétal et les techniques de production à l'Armefflor, centre technique local et principal partenaire du Cirad pour les filières fruits et légumes et la ferme semencière FLHORYS. En effet, compte tenu de la taille très réduite du marché local, aucune entreprise semencière française n'est en mesure d'assurer la diffusion des variétés locales. Depuis 2012, une filière de « semences ail certifiées » est opérationnelle. La production, contrôlée par le SOC, est en constante augmentation (800 kg en 2012, 2T en 2013) et devait atteindre son optimum en 2015 pour couvrir entièrement la demande locale et développer l'exportation de semences. Le Cirad assume aujourd'hui la responsabilité de la maintenance des variétés inscrites et la production de semences de prébase.

1.4.6.3 - Norme CAC Agrumes

A La Réunion, la production d'agrumes est en déclin depuis plusieurs années en raison de vergers vieillissants et de contraintes sanitaires importantes, spécifiques au milieu tropical. Afin d'améliorer l'état sanitaire et la conformité variétale des plants d'agrumes, il a été demandé au Cirad d'assurer la mise en œuvre de la norme CAC. J'ai réalisé ce travail en partenariat étroit avec le GNIS – SOC (en charge du contrôle officiel de la norme CAC dans les DOM), la DAF, l'Armefflor, la Chambre d'agriculture et les partenaires professionnels. Le premier travail a consisté à rédiger un règlement technique annexe officiel pour la production de plants d'agrumes norme CAC. Ce document qui définit le schéma de production avec en particulier la définition de mesures de traçabilité et de prophylaxie et les exigences en termes de tolérance de maladies et parasites, a été validé par le GNIS-SOC en 2008. Il a été rédigé avec relation avec le SOC et avec l'appui de phytopathologistes agrumes du 3P. Il s'inspire du Règlement Technique CAC rédigé pour l'olivier en France. En parallèle, j'ai mis en place le schéma de conservation des variétés d'agrumes et la production de greffons destinés aux pépiniéristes agréés norme CAC. Le Cirad a ainsi obtenu son agrément CAC en 2008. Le maintien des variétés et la production de greffons sont réalisés dans des serres insect-proof en polycarbonate et un contrôle sanitaire strict est appliqué. Il consiste en la réalisation de tests annuels de détection de virus (ELISA et immuno-empreinte) et de contrôles visuels pour les autres maladies et parasites. Trois maladies majeures en milieu tropical sont prises en compte : le *Citrus tristeza virus* (CTV), le chancre citrique causé par la bactérie *Xanthomonas citri* pv. *citri* et plus récemment, le Huanglongbing (HLB) causé par plusieurs souches de la

bactérie *Candidatus liberibacter*. Entre 20 000 et 25 000 greffons par an, à destination des pépiniéristes ont été produits et commercialisés depuis 2008.

En 2013, ce programme a évolué avec le transfert de la production de greffons à notre partenaire Armeflhor. Le Cirad a gardé la responsabilité du maintien des variétés d'agrumes et la production de matériel de base pour l'Armeflhor. Deux nouvelles serres insect proof sont aujourd'hui opérationnelles pour la conservation du matériel végétal dans de bonnes conditions.

Le schéma actuel de certification CAC est représenté dans la figure 1.

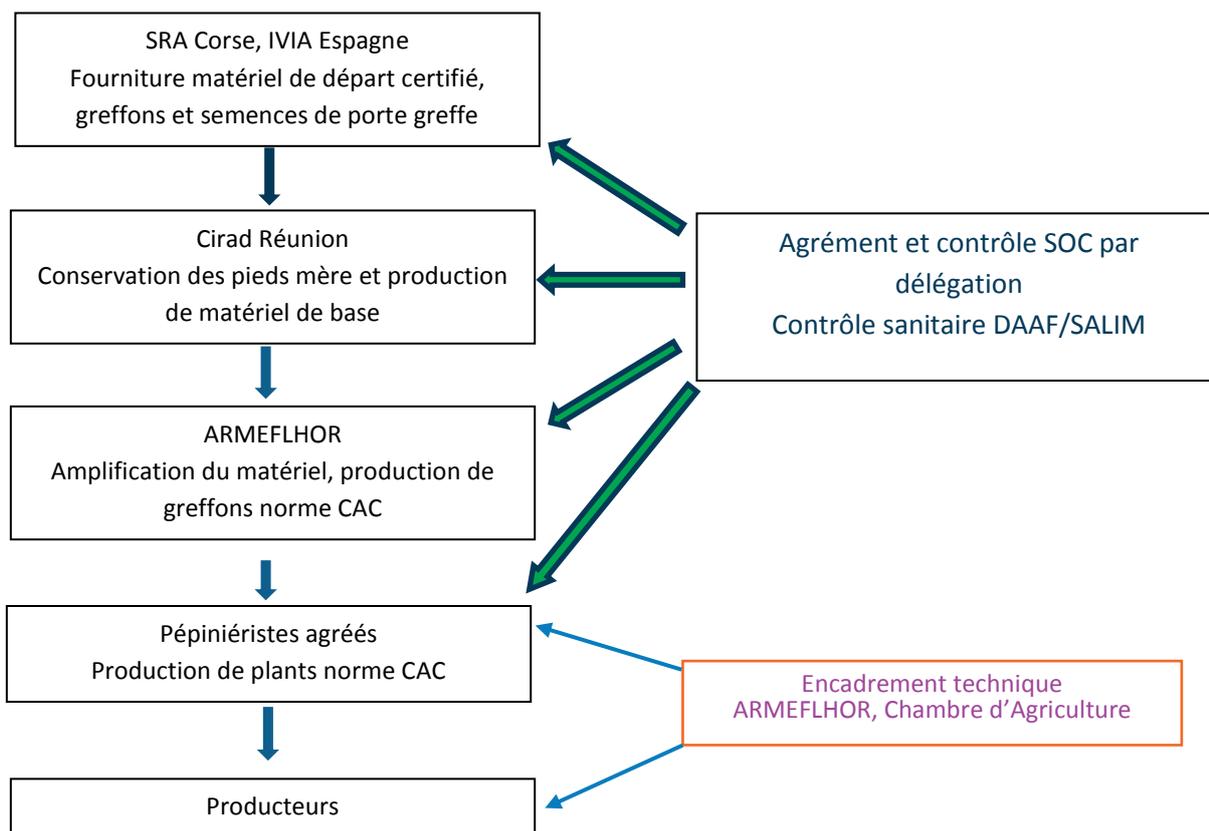


Figure 1 : schéma de certification CAC Agrumes à La Réunion

Ce projet de recherche appliquée au développement a eu globalement des résultats très positifs pour l'agriculture réunionnaise et a permis de renforcer les projets de recherche en bactériologie conduits au Cirad.

De manière plus globale, cette expérience de mise en application de réglementations européennes en milieu tropical souligne les imperfections et quelquefois les incohérences des normes (cf. chap. 2.5.3). En effet, si les exigences qui sont imposées sont parfaitement adaptées aux pays du Nord (tempérés), elles sont souvent difficilement applicables en l'état dans les zones tropicales pour deux raisons essentielles :

- les caractéristiques spécifiques des espèces et variétés adaptées au milieu tropical (adaptation à la température, à la photopériode, aux conditions agro-climatiques...), non prises en compte dans les réglementations, créant ainsi des vides juridiques,
- la spécificité des facteurs biotiques et abiotiques pouvant impacter la production végétale, en particulier les contraintes phytosanitaires et climatiques.

1.4.7 - Projet 2 : conservation et valorisation des ressources génétiques

1.4.7.1 - Contexte

La réalisation des activités décrites dans le précédent projet a mis en avant l'importance de la conservation et de la valorisation des ressources génétiques végétales d'intérêt agricole. A la Réunion, cela concerne en particulier toutes les variétés d'espèces orphelines ou sous-utilisées (souvent tropicales) qui ont été ou sont cultivées et qui ne bénéficient pas de systèmes appropriés de préservation et de protection. L'intérêt de cette problématique m'a amené à développer des actions spécifiques de préservation d'une partie menacée de l'agrobiodiversité de l'île et a conduit à la reconnaissance de notre unité de recherche en termes de gestion des ressources génétiques végétales agricoles.

Le développement de cette thématique au niveau régional océan Indien, résulte d'une part, de l'implication du Cirad Réunion dans de nombreux projets régionaux de recherche et de développement agricole financés par l'Union Européenne et d'autre part de recommandations de l'AERES notifiées lors des 2 évaluations de l'UMR PVBMT. L'élargissement de nos travaux de conservation et de valorisation des ressources génétiques végétales agricoles (RGVA) aux pays voisins se justifie par la présence dans notre zone géographique, 1) de petits états iliens où l'agrobiodiversité est en danger en raison de l'accroissement démographique et des risques climatiques, 2) de Madagascar, "île continent" qui présente une extraordinaire diversité d'espèces et variétés elles aussi largement menacées.

1.4.7.2 - Activités à La Réunion

Mise en place de collections *ex situ* de ressources génétiques : une première collection est directement issue des travaux décrits précédemment. Elle regroupe des cultivars locaux menacés d'érosion génétique, voire de disparition, représentant des espèces vivrières et maraîchères appelées communément « légumes lontan » à La Réunion. Au fil des années, j'ai mis en place cette collection qui est constituée aujourd'hui par plus de 200 accessions représentant 14 familles différentes, 10 espèces à multiplication végétative et 23 à multiplication sexuée. Une deuxième collection, constituée de 36 variétés d'aulx tropicaux originaires de l'océan Indien et d'Afrique a été constituée par le Cirad dans les années 80 et continue d'être conservée à La Réunion.

Afin de sécuriser ces collections, des travaux de recherche ayant pour objectif la mise au point ou l'adaptation de protocoles de conservation *in vitro* ou de cryoconservation ont été conduits.

Le Centre de Ressources Biologiques VATEL : les deux collections citées ci-dessus, ainsi que l'importante collection de vanilliers mise en place et gérée par mon collègue Michel Grisoni, ont permis de créer le CRB VATEL dont j'ai assuré la responsabilité depuis sa création en 2007 jusqu'en 2011. Le CRB a été labélisé par le GIS IBISA en 2008 et dans ce cadre, j'ai participé, à la demande de l'AFNOR, à la rédaction de la norme AFNOR NF-S 96-900 spécifique à la démarche qualité dans les CRB. Cette labellisation nous a permis également de devenir partenaire des projets Inter-Trop (2010-2012) et CryoVeg (2009-2011) financés par le GIS IBISA et dont j'avais la responsabilité pour La Réunion.

En parallèle, j'ai développé avec Michel Grisoni la démarche Qualité du CRB VATEL en rédigeant la documentation nécessaire. Le CRB VATEL a été certifié NF-S 96-900 en septembre 2016.

La labellisation du CRB et les projets associés ont permis de le structurer et de lui donner une légitimité au niveau local, national et international. Cela s'est traduit par des activités de

recherche développées à partir des collections, en particulier pour la collection de vanilliers mais aussi sur les aulx et les "légumes lontan". Dans le cadre du projet Safe PGR (Towards Safer Plant Genetic Resources through improved viral diagnostics) financé par le consortium NetBiome, des travaux particuliers de métagénomique visant à inventorier la diversité des virus dans des plantes à multiplication végétative ont été conduits sur les collections d'aulx, de vanilliers, de patates douces et d'ignames du CRB VATEL.

Activités associées : Ces travaux sur les ressources génétiques m'ont permis de rédiger la partie « légumes » d'un ouvrage sur les fruits et légumes lontan de La Réunion publié aux Editions Orphie. La partie « fruits » consacrée également aux espèces traditionnelles a été rédigée par un collègue de la Chambre d'Agriculture de La Réunion (Vincenot et Roux-Cuvelier, 2011).

De plus, je me suis également intéressé tout particulièrement aux aspects juridiques liés aux droits de propriété pour les ressources génétiques ainsi qu'aux règles de transfert et d'échange de matériel végétal. A ce titre, j'ai rédigé un chapitre d'ouvrage sur les aspects juridiques spécifiques aux vanilliers et aux échanges de matériel végétal entre pays (Roux-Cuvelier et Grisoni, 2010). Cet ouvrage a été traduit en japonais en 2015.

1.4.7.3 - Développement à l'international, le projet GERMINATION

Dès 2007, dans le cadre du Projet Régional de Protection des Végétaux (PRPV) porté par l'UMR, la problématique de la qualité sanitaire du matériel végétal (semences et plants) a été soulevée par l'ensemble des pays de la zone Sud-Ouest de l'océan Indien. La sécurisation de l'approvisionnement en semences pour les paysans ainsi que la préservation et la valorisation des ressources génétiques végétales d'intérêt agricole ont été rapidement associées à cette problématique. Dans ce contexte, j'ai assuré la coordination d'un projet de coopération régionale bénéficiant de financements européens (POCT-FEDER coopération), adossé à nos activités au Cirad Réunion.

Le projet GERMINATION (Genetic Resources Management In Actions Toward an Indian Ocean Network) avait pour objectif de rassembler les acteurs et les compétences en matière de gestion et valorisation des ressources génétiques végétales agricoles (RGVA) au sein d'un réseau régional dans le Sud-Ouest de l'océan Indien. Il associait des partenaires institutionnels, des organismes publics et des entreprises privées.

La phase initiale du projet (novembre 2013 - juin 2015) a été concrétisée par la mise en place du réseau GERMINATION qui regroupe aujourd'hui 65 partenaires dans 6 pays de la zone : Madagascar, Maurice (et Rodrigues), Seychelles, Comores, Zanzibar (Tanzanie) et La Réunion (France). Cette première phase a fait l'objet des actions pilotes indiquées dans le tableau 4.

Tableau 4 : principales actions réalisées dans le cadre du projet GERMINATION

Actions	
Formation	<p><u>Maurice (Rodrigues)</u> : techniques de multiplication des arbres fruitiers tropicaux et gestion de collection de RGVA</p> <p><u>Seychelles</u> : Idem</p> <p><u>Tous pays</u> : "accès aux RGVA, échange et partage dans l'Océan Indien" Statut juridique des RGVA</p>
Expertises	<p><u>Madagascar</u> : Propositions pour la redynamisation des activités de recherche du FOFIFA sur la vanille et la réhabilitation de la Station d'Ambohitsara</p> <p><u>Comores</u> : Appui scientifique et technique aux partenaires du projet : évaluation des dispositifs de conservation des RGVA : mise en place de collections, expertise laboratoire de culture <i>in vitro</i> (2 missions)</p> <p><u>Zanzibar</u> : Evaluation des dispositifs de conservation des ressources génétiques et des besoins en formation</p>
Financement et encadrement de stages étudiant	<p><u>Comores</u> : inventaire des ressources amyloacées en Grande Comore, taro, manioc, patate douce, igname et banane (5 stages)</p> <p><u>Madagascar</u> : Inventaires des populations locales de maïs et vigna dans le Sud-Ouest de Madagascar et de Tacca (<i>Dioscoreaceae</i>) dans l'Est (2 stages)</p>

Un des principaux objectifs de la deuxième phase du projet (juil. 2015 - déc. 2017) est la préparation de l'édition d'un catalogue régional des espèces et variétés d'intérêt alimentaire s'appuyant sur la caractérisation et la valorisation de collections de RGVA. Ce catalogue sera le principal livrable de la dernière phase du projet (2018/2019). Un inventaire des RGVA des pays partenaires est en cours de finition. Des activités d'analyse de la diversité génétique de plusieurs espèces (ail, igname, manioc, patates douces), utilisant une approche GBS (Genotyping-by-Sequencing) seront conduites par le Cirad en partenariat avec les universités et centre nationaux de Recherche des pays partenaires.

La coordination du projet s'appuie sur un comité de pilotage constitué par les représentants des organismes partenaires et un conseil scientifique qui regroupe des représentants des instituts de recherche et des universités des pays membres du projet.

1.4.8 - Activités de recherche conduites à La Réunion

Les principales activités de recherche réalisées se rattachent aux deux thématiques présentées ci-après (tableau 5). Trois de ces activités seront développées dans la seconde partie de ce dossier.

Tableau 5 : activités de recherche conduites à La Réunion

<i>Activités en sélection, amélioration des plantes</i>			
Problématique	Projet développé	durée	Résultats
Diversification variétale oignon	Création variétale*	14 ans	Nouvelles variétés améliorées, inscription au catalogue officiel
Amélioration de la production d'ail	Assainissement des variétés locales	6 ans	2 variétés assainies, inscription au catalogue officiel
Mise en conformité de variétés potagères locales	Sélection, homogénéisation de variétés de piment, aubergine et concombre	4 ans	Inscription au catalogue de 2 variétés d'aubergine, 1 de piment, 1 de concombre (liste c) en cours
Développement d'une filière de production de cœurs de palmier	Mise au point d'une méthode de multiplication <i>in vitro</i> pour le palmier <i>Bactris gasipaes</i> *	4 ans	Mise au point d'un protocole d'embryogénèse somatique Création d'une startup
<i>Activités de gestion et valorisation des ressources génétiques</i>			
Problématique	Projet développé	durée	Résultats
Sécurisation des collections de ressources génétiques	Mise au point d'une méthode de cryoconservation pour les collections de vanilliers et légumes à graines*	4 ans	Mise au point de protocoles (non utilisables en routine)
Perception de la population pour la valorisation des légumes lontan	Audit patrimonial	1 an	Résultat d'audit, création d'une association pour la valorisation des légumes lontan
Diversité génétique de la collection d'aux tropicaux du CRB VATEL	Analyse AFLP	1 an	Différenciation de groupes variétaux mais résultat peu reproductible.

*projet détaillé en partie 2

1.4.9 - Activités de recherche conduites à Mayotte

De 2010 à 2014, en parallèle de mes activités à La Réunion, j'ai assuré la coordination des programmes de recherche portés par l'UMR PVBMT à Mayotte avec l'appui de collègues de l'unité, spécialisés en entomologie et bactériologie. Localement, les travaux ont été réalisés successivement par deux VSC Ingénieurs Agronomes. Financées par le CIOM (Comité Interministériel de l'Outremer) puis dans le cadre du RITA (Réseau d'Innovation et de Transfert Agricole), ces activités qui représentaient la composante 2 du projet "Amélioration de la production maraîchère et fruitière à Mayotte" ont concerné :

i) l'inventaire des mouches des fruits et mouches des légumes et de leurs parasites en s'appuyant sur la mise en place d'un réseau de piégeage. En parallèle, ce travail a permis de mettre en évidence pour la première fois à Mayotte, *Xanthomonas citri* pv *citri*, bactérie responsable du chancre bactérien des agrumes (Hoarau et al., 2013) qui a fait l'objet d'un travail de caractérisation moléculaire.

ii) l'analyse de la diversité génétique des souches de *Ralstonia Solanacearum* à Mayotte : collecte exhaustive d'échantillons, isolement des bactéries, détermination des phylotypes et séqu岸ars, diversité génétique et phylogénie, cartographie des souches, étude d'agressivité sur une core collection et des variétés commerciales de tomate. Un article intitulé "Sequevar diversity and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* phylotype I on Mayotte Island (Indian Ocean)" a été soumis à la revue "Frontiers".

iii) l'expérimentation variétale et la gestion de collections de ressources génétiques. Dans ce cadre un bio-agresseur du manioc non décrit à Mayotte a également été mis évidence et caractérisé. Il s'agit du l'Uganda *cassava brown streak virus* (UCBSV), un des virus responsable de la maladie des striures brunes du manioc (Roux-Cuvelier et al., 2014). Durant cette période j'ai assuré le suivi des activités à Mayotte grâce à 3 à 4 missions annuelles.

1.4.10 - Production scientifique

Mes travaux conduits à La Réunion et Mayotte ont permis la production de :

- 6 variétés inscrites au catalogue officiel ou en cours d'inscription
- 6 publications
- 1 ouvrage
- 1 chapitre d'ouvrage
- 4 communications publiées dans des actes de colloques internationaux et nationaux
- 5 rapports d'expertise et projet (cf. liste des productions p.109).

Les documents de référence, rapports annuels, autres rapports sont indiqués en annexe 5.

II - ACTIVITES DE RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT

2.1 - Éléments de contexte

Pour répondre aux enjeux globaux liés au changement climatique, à la sécurité alimentaire et l'utilisation durable de la biodiversité, de nouveaux concepts tels que l'agriculture écologiquement intensive ou l'agriculture climato-intelligente ont été développés. Cela se traduit entre autres par le développement de l'agroécologie qui est à la base d'un système global de gestion d'une agriculture durable à l'échelle du territoire et qui valorise les agro-écosystèmes, optimise la production et respecte l'environnement. Le modèle "Produire plus avec moins", soutenu par la FAO (Food and Agriculture Organisation), s'inscrit dans cette démarche. Il souligne l'importance des variétés améliorées de plantes cultivées, d'origines génétiques diverses, adaptées aux changements climatiques et aux différents écosystèmes agricoles.

La gestion optimisée des ressources génétiques végétales est largement tributaire de l'évolution des connaissances et des techniques dans le domaine des sciences biologiques. On constate notamment depuis plusieurs décennies, des avancées marquantes dans la connaissance de la diversité génétique des plantes grâce à l'évolution continue des techniques et des outils de biologie moléculaire, marqueurs AFLP, RFLP, microsatellites, Genotyping By Sequencing (GBS) et Next-Generation Sequencing (NGS) (Falque, 2011 ; Elshire et al., 2011 ; Massart et al., 2014 ; Roossinck et al., 2015)

En parallèle, on constate également des changements fondamentaux dans l'accès aux ressources génétiques et leurs utilisations avec la mise en place de cadres juridiques stricts qui découlent de l'application de la Convention sur la Diversité Biologique (CDB, 1992) et notamment du principe de la souveraineté des Etats sur leurs ressources biologiques et du Protocole de Nagoya (2010).

Mes travaux de recherche au Cirad s'inscrivent dans ce contexte où l'utilisation durable de l'agrobiodiversité passe par une gestion et une valorisation optimales des ressources génétiques végétales. Les particularités de l'île de La Réunion, région ultrapériphérique européenne en milieu tropical, en font un terrain d'étude original où peuvent être conduits des travaux répondant à des problématiques locales mais également à des enjeux globaux sur l'utilisation des ressources génétiques pour l'agriculture en milieu tropical.

Trois projets de recherche répondant à ces questionnements sont présentés ci-après. Deux d'entre eux, l'amélioration variétale oignon et la multiplication du palmier péjibaye, concernent la diversification de la production agricole végétale à La Réunion. Ces projets reflètent l'importance de l'accès aux ressources génétiques et de leur utilisation. Le 3^{ème} projet sur la cryoconservation répond à la problématique de l'optimisation des techniques de conservation et de sécurisation des ressources génétiques végétales agricoles. S'appuyant sur le cas de La Réunion, une analyse du contexte réglementaire en lien avec les droits de propriété intellectuelle et l'accès aux ressources génétiques complète cette présentation.

2.2 - Amélioration variétale d'une population d'oignon de jours courts

2.2.1 - Introduction

L'oignon (*Allium cepa* L.) est une plante herbacée, à cycle bisannuel, de la famille des *Alliaceae*. Le genre *Allium* regroupe plus de 700 espèces (Messiaen et Foury, 2003). L'oignon est probablement originaire d'Asie centrale (Boulineau et al., 2006) et a migré vers la Mésopotamie (2 500 av JC) et l'Egypte (1 600 av JC) avant de diffuser dans toute l'Afrique (Messiaen et Rouamba, 2004). Il présente une grande diversité génétique qui a permis sa culture sous toutes les latitudes depuis des temps anciens.

La production mondiale d'oignons secs s'élève à environ 85 millions de tonnes/an. Les principaux pays producteurs sont la Chine et l'Inde qui produisent environ 42 millions de tonnes. Le continent africain, où la culture de l'oignon est largement répandue, produit près de 10 millions de tonnes (FAO-Stat, 2013)¹. Dans les îles du Sud-Ouest de l'océan Indien, l'oignon est très largement consommé et rentre dans la composition de nombreux plats traditionnels. Bien que largement déficitaire, la production est répandue dans toutes les îles. Elle est destinée aux marchés locaux, à l'exception de Madagascar qui produit entre 8 à 10 000 T d'oignons secs par an et exporte entre 1 600 et 2 500 T dans les pays de la zone (FAO-Stat, 2013).

L'oignon est une plante à reproduction sexuée, diploïde à $2n=2x=16$ chromosomes. Elle est essentiellement allogame en raison d'un décalage temporel net de la maturité des organes mâles par rapport aux organes femelles (protandrie). Les plantes issues d'autofécondations contrôlées présentent une forte dépression de consanguinité. L'inflorescence, de type ombelle, comporte de 200 à 700 fleurs bisexuées dont l'anthèse peut durer 20 jours (Foury et Schweisguth, 1992). L'induction florale nécessite une vernalisation de durée très variable suivant les cultivars (température et durée), ce qui représente une contrainte à la production de semences en milieu tropical. L'optimum de température se situerait entre 8 et 12°C pour la plupart des variétés tempérées et de 15 à 21°C pour les variétés "africaines" (Kamenetsky et Rabinovitch, 2002).

La plupart des oignons cultivés sous les tropiques sont de type "jours courts", avec une bulbaison induite par la réponse d'un phytochrome à la durée de la nuit (Currah, 2002). Ce sont essentiellement des variétés populations bien adaptées aux conditions locales (longueur du jour, température ...) et qui souvent produisent des bulbes avec une bonne aptitude à la conservation. Les cultivars africains se répartissent en trois catégories :

- Les cultivars africains tropicaux (violet de Galmi, rouge de Tana...), variétés-populations caractérisées par une forte teneur en matière sèche (MS) qui leur confère une excellente aptitude à la conservation.
- Les cultivars méditerranéens (Texas grano...) à plus gros bulbes mais à teneur en MS plus faible.
- Les cultivars du groupe créole (Red créole...) intermédiaire entre les deux groupes précédents et dont l'origine pourrait remonter à une sélection de cultivars africains introduits dans le "Nouveau Monde" à l'époque de la traite des esclaves.

Plusieurs firmes semencières telles que Technisem ou East West Seed ont conduit des travaux de sélection en vue d'améliorer les oignons tropicaux de jours courts (Messiaen et Rouamba, 2004).

¹ <http://www.fao.org/faostat/en/#data>

A La Réunion, la variété "Véronique" a été sélectionnée par un producteur de semences privé, Jean Bernard Grondin, dans une population locale appelée "Rouge de Chateaufort", elle-même issue d'un croisement fortuit entre une variété ancienne, "Rouge pâle de Niort" cultivée dans l'Ouest de la France (Boulineau et al, 2006) et un cultivar indien (Messiaen et Rouamba, 2004). Il est probable que la variété "Noflaye", sélectionnée par la société Technisem, ait les mêmes origines.

La biologie florale et la forte baisse de vigueur observée dès la première ou deuxième autofécondation (inbreeding) justifient la persistance des variétés-populations (Foury et Schweisguth, 1992). Différentes méthodes permettent l'amélioration génétique de l'oignon :

- L'amélioration génétique des oignons tropicaux est encore largement basée sur la sélection massale appliquée à des populations locales. Cette méthode permet de sélectionner un nombre restreint de caractères héréditaires tels que la forme et la couleur des bulbes, la résistance aux maladies ou l'aptitude à la montée en graines. L'efficacité de cette méthode dépend de la variabilité génétique des populations parentales et de l'hérédité des caractères. Cependant, les variétés-populations créées restent très hétérogènes, ce qui limite leur intérêt.
- La création d'hybrides F1 basée sur la stérilité male nucléo-cytoplasmique a été largement exploitée pour l'amélioration des oignons tempérés. Elle nécessite l'identification préalable d'individus ou de lignées males-stériles utilisables comme parents et leur maintien par autofécondation. L'oignon a été la première espèce cultivée pour laquelle des variétés commerciales ont été obtenues grâce à la stérilité mâle cytoplasmique (Boulineau et al., 2006). L'intérêt des hybrides F1 en milieu tropical n'a pas été clairement démontré notamment en termes de rendement (Messiaen et Rouamba, 2004).
- La sélection récurrente intra population permet d'exploiter la variabilité génétique de départ dans une population et de l'améliorer progressivement par une série de cycles alternés d'autofécondations et de croisements. Il s'agit dans ce cas d'une sélection familiale sur le phénotype avec des familles S1 (Gallais, 2011). Cette méthode continue d'être utilisée avec succès comme le montre le dépôt de brevets aux USA sur la variété NUN 17210 ONL par la société Nunhems (Watson, 2016, Patent application number: 20160128290) et la variété "Dulciana" (Bowman, 2014, Patent N°: US 2014/0007274 A1) ou l'obtention de la variété "NuMex Allure" (Cramer, 2015) et la variété "Valinia inia" au Chili (González et Herrera, 2012).

2.2.2 - Problématique

A La Réunion, jusqu'au début des années 2000, la production d'oignons était basée sur l'utilisation par les agriculteurs d'une seule variété-population, « Véronique », inscrite au catalogue officiel français en 1995. La concurrence d'oignons d'importation en provenance d'Inde ou de Madagascar a entraîné une réduction importante des surfaces cultivées et de la production qui est passée de 8 000 T/an environ dans les années 1990 à 700 T en 2013, quantité très insuffisante pour couvrir la demande locale qui est estimée à 9 000 T/an (source : Chambre d'Agriculture de La Réunion). A la demande des producteurs et des autorités locales (DAAF et Chambre d'Agriculture) il a été décidé de mettre en place un programme permettant de réduire les importations et de relancer la production d'oignons à La Réunion. Ce programme était articulé autour de deux axes : i) l'amélioration de l'itinéraire technique de production avec en particulier, la mécanisation de la phase semis/repiquage et l'amélioration des conditions de stockage. Ce travail a été assuré par l'ARMEFLHOR. ii) la diversification variétale et l'augmentation des rendements. Ce dernier axe a été confié au

Cirad et j'ai pris la responsabilité du projet à mon arrivée à La Réunion en 2001, deux ans après son démarrage.

L'objectif principal était la création de nouvelles variétés-populations d'oignons adaptées aux conditions agro-pédo-climatiques des différentes zones de production (Fig. 2). Ces zones à pluviométrie annuelle moyenne (entre 540 mm dans l'Ouest et 950 mm dans le Sud) se situent sur un gradient d'altitude de 0 à 750 m.

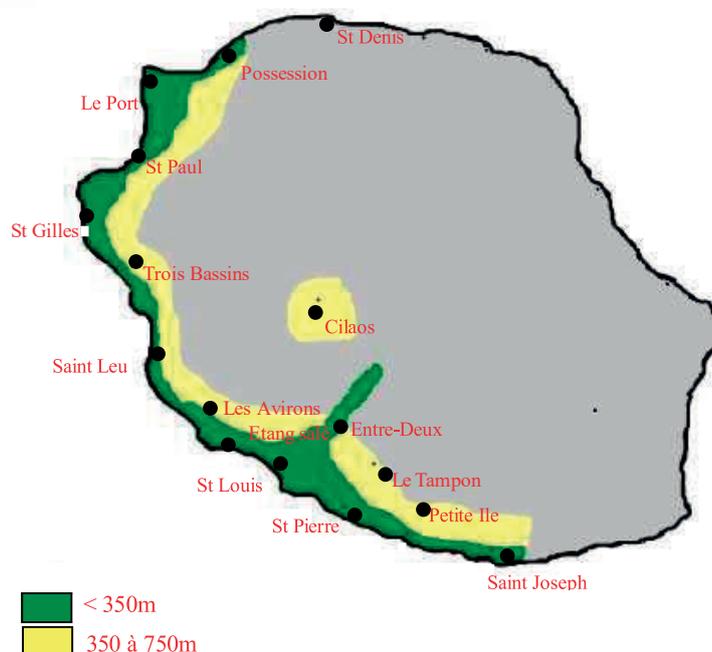


Figure 2 : zones de production de l'oignon à La Réunion (Gourc et al., 2007)

2.2.3 - Schéma et objectifs de sélection

Le matériel de départ utilisé, la variété locale "Véronique", présente des caractéristiques intéressantes en termes de goût, de forme et de couleur de bulbes, mais surtout une teneur élevée en matière sèche (MS) qui lui confère une très bonne aptitude au stockage en milieu tropical. Toutefois, le potentiel de rendement de cette variété est trop faible (de l'ordre de 15 T/ha) pour que sa production soit compétitive par rapport à l'oignon d'importation. Pour améliorer ce critère en particulier, la variété Véronique a été croisée avec des variétés introduites à fort potentiel de rendement.

2.2.3.1 - Schéma de sélection

Conformément aux recommandations de Bertrand Schweisguth, chercheur à l'INRA et spécialiste des Alliées, la variété locale "Véronique" a été améliorée par croisement avec des variétés exotiques introduites selon le schéma de sélection suivant. Il a été réalisé en 14 ans et comprend 4 étapes (Fig. 3).

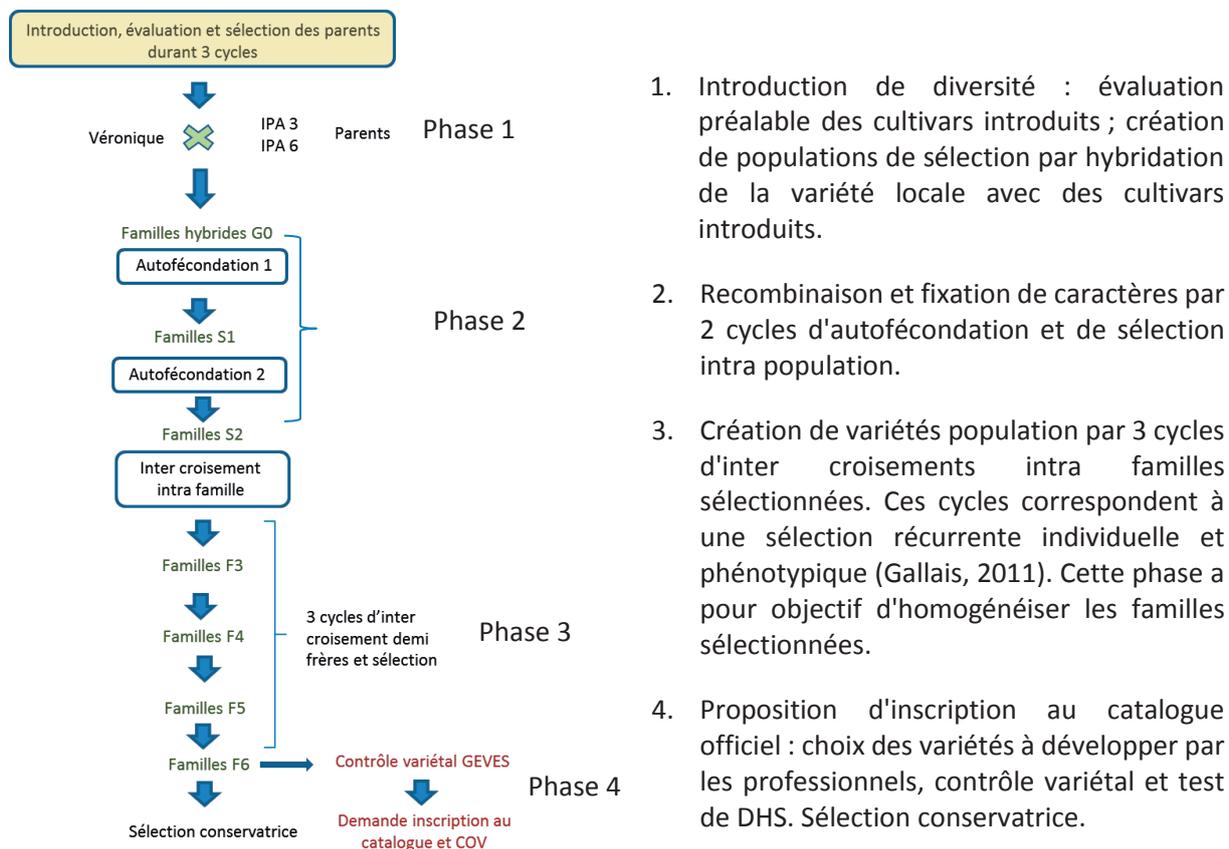


Figure 3 : schéma de sélection de nouvelles variétés d'oignon

2.2.3.2 - Caractères sélectionnés

Afin d'améliorer la variété population existante "Véronique", les principaux caractères d'intérêt sélectionnés sont, par ordre d'importance, les suivants:

- Le rendement en bulbes : le rendement moyen est largement contrôlé par des facteurs génétiques, avec des taux d'héritabilité au sens large variables mais souvent supérieurs à 0.7 (Pavlovic et al., 2003 ; Cardoso et Costa, 2003 ; Haydar et al., 2007). Le choix de variétés à fort rendement comme parents et la sélection basée sur le niveau individuel de performances doivent donc permettre d'améliorer ce caractère dans les variétés finales. L'objectif est de doubler le rendement moyen de Véronique soit 30 à 40 T/ha.
- La teneur en MS : elle conditionne la tenue au stockage et a été prise en compte dans le choix des parents à croiser avec la variété Véronique. Les héritabilités pour la MS et la teneur en sucres solubles sont respectivement de 52.6 % et de 36.1 % avec une forte corrélation entre ces deux caractères (Porta et al., 2014). On recherchera des teneurs en MS supérieures à 15 %, dans les variétés finales.
- La tolérance aux maladies et parasites : en particulier le dépérissement bactérien de l'oignon causé par *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*, le botrytis causé par le champignon *Botrytis squamosa* et le *Iris yellow stripe virus* (IYSV) et son vecteur le thrips (essentiellement *Thrips tabaci*).
- La couleur du bulbe : ce caractère complexe est contrôlé par au moins 5 gènes majeurs (El-Shafie et Davis, 1967). Le choix de parents de couleur rose à rouge correspond à la préférence des consommateurs. De plus, la couleur foncée des enveloppes du bulbe semble corrélée avec une teneur en MS élevée (Porta et al., 2014)
- La forme du bulbe : selon les critères UPOV (2008), les formes « elliptique aplatie moyen » (proche de Véronique) à « losangique » sont recherchées. En raison de la demande des

professionnels qui mécanisent le traitement post-récolte, une forme de bulbe losangique est recherchée car elle permet de mieux nettoyer le plateau racinaire.

- L'adaptation aux jours courts : toutes les variétés retenues dans le programme présentent cette caractéristique essentielle. L'adaptation aux conditions de culture de La Réunion est évaluée à travers la réalisation d'essais multiloceaux en milieu paysan durant le programme de sélection.

- Autres critères de sélection : certains caractères peu héréditaires comme le goût piquant (Wall et al., 1996) et le "cœur simple" (Gashua et al., 2013) ne sont pas pris en compte dans le choix des parents ; ce dernier est uniquement sélectionné au cours des phases 2 et 3.

2.2.4 - Matériels et méthodes

2.2.4.1 - Matériel végétal

La variété locale "Véronique" a été croisée avec 3 variétés exotiques introduites, choisies parmi 65 variétés-populations de jours courts (cf. annexe 6) de diverses origines et testées à La Réunion. Après 2 cycles d'évaluations variétales, trois variétés d'origine brésilienne, (Instituto Agrônômico de Pernambuco) IPA 3, 6 et 10 ont été retenues. Les formules hybrides sont codés en prenant la première lettre de la variété Véronique et les chiffres des variétés IPA (ex. **V6** = Croisement Véronique ♀ x IPA 6 ♂). En cours de programme, la variété "Grondin 2", lignée sélectionnée dans la variété population "Véronique" par son obtenteur, a aussi été utilisée pour une série de croisements complémentaires.

2.2.4.2 - Itinéraire technique de culture et dispositifs expérimentaux

La production de bulbes ou semences est réalisée en hiver austral en période de jours courts (11h à 12h). En fonction de l'altitude, les repiquages s'échelonnent de début mai à fin août pour une récolte de mi-septembre à mi-décembre. L'itinéraire technique employé dans notre programme est celui d'une production d'oignon à partir de plants de semis pour faciliter l'observation individuelle des plantes. Les semis sont réalisés en pépinière 1,5 mois avant repiquage.

La production s'effectuant sous paillage plastique pour un meilleur contrôle des adventices, l'irrigation et la fertilisation sont assurés par un dispositif de fertirrigation en goutte à goutte. Ce type d'irrigation permet également une meilleure maîtrise du dépérissement bactérien de l'oignon dont l'agent est véhiculé par l'eau et le vent. Les densités de plantation varient de 400 000 à 600 000 plants / ha en fonction du type de repiquage effectué (plants en mini motte ou individuel). Le semis direct est également utilisé à raison d'environ 1 million de graines/ha.

Les évaluations des variétés candidates introduites ainsi que des croisements initiaux (phase 1) ont été réalisées sur la station Cirad de Bassin Martin à une altitude de 300 m. Tous les travaux de sélection (phase 2) ont été réalisés sur 3 sites : à la station Cirad de Bassin plat (160 m), où a été étudié le comportement des familles S1 et S2 dans des conditions difficiles, en particulier au niveau de l'enherbement (forte infestation de Cypéracées) ; en milieu paysan à St Louis (350 m) où le potentiel des familles S1 a pu être parfaitement évalué grâce à de bonnes conditions de culture (sols profonds, fertiles, peu d'adventices, suivi sanitaire strict...) et à l'Entre Deux (480 m) où les conditions de sol et d'enherbement étaient plus défavorables. Les évaluations variétales en milieu paysan (phase 3) ont été conduites dans les zones traditionnelles de culture de l'oignon entre 100 et 1 200 m d'altitude sur différents types de sols : sols brun andiques plus ou moins riches en argile à basse et moyenne altitudes, andosols perhydratés au-dessus de 700 m.

Après récolte, les bulbes sont stockés en filets sur des étagères aérées, à température ambiante, dans un hangar à ventilation naturelle.

Le dispositif expérimental utilisé pour les essais d'évaluation au champ des variétés candidates (familles F3 à F6) en milieu paysan est un bloc de Fisher randomisé à 3 répétitions incluant comme témoins les parents des croisements initiaux. Cent plants par parcelle élémentaire sont repiqués sur des billons de 1.2 m de large, avec des espacements de 15 cm entre lignes et 12 cm entre plants. Un passe pieds de 40 cm sépare les billons. Des évaluations multilocales en milieu paysan ont été réalisées en fin de programme. Des données ont pu être exploitées en prélevant des bulbes sur 1 m linéaire d'une planche de 6 lignes avec 6 répétitions par parcelle.

2.2.4.3 - Contrôle des pollinisations

En l'absence de stérilité mâle, un travail préliminaire de mise au point de pollinisation manuelle croisée a été effectué. Deux méthodes utilisant la castration manuelle et l'ensachage des fleurs ont été testées.

- Dépôt de mouches pollinisatrices, *Stomoxys calcitrans*, dans les sacs.
- Fécondation manuelle à l'aide d'un pinceau ; cette dernière méthode a été retenue.

Différentes méthodes d'autofécondation telles que l'isolement par ensachage des fleurs non castrées et dépôt contrôlé de mouches ont été testées. La méthode adoptée est l'isolement de 1 à 3 ombelles issues du même bulbe dans des sacs de pollinisation « insect et pollen proof ». Un mouvement alternatif des tiges, réalisé manuellement tous les jours entre 11h et 14h (pollens pulvérulents), permet la dispersion homogène du pollen.

Après différents essais, la production de semences des familles sélectionnées a été réalisée en isolement sous structures ou tunnels « insect proof » de 2, 5, 20 et 40 m². Les structures sont espacées de 100 m minimum pour éviter des contaminations polliniques par le vent. Des ruches ou ruchettes sont placées dans les structures lorsque 25 % environ des plantes présentent des fleurs.

2.2.4.4 - Mesures effectuées

Les mesures effectuées sont qualitative (forme du bulbe, couleur des tuniques et chair, feuillage...) et quantitatives (hauteur de plant, nombre de feuilles, diamètre au collet, diamètre et poids des bulbes, cœurs doubles, rendement parcelle...). Elles sont effectuées sur des effectifs minimum de 30 individus choisis au hasard par famille. Le comportement vis-à-vis des maladies est noté (échelle de 1 à 5) en particulier le dépérissement bactérien, l'IYSV et le botrytis, ainsi que l'aptitude à la floraison en jours courts qui est un critère essentiel pour la production de semences. La tenue au stockage est évaluée entre la récolte et la plantation suivante par comptage et élimination des bulbes présentant des symptômes de pourriture.

Une méthode de mesure non destructrice de la MS a été testée et comparée au protocole classique de dessiccation en étuve. Cette méthode basée sur la mesure de l'indice de réfractométrie consiste à prélever une goutte de jus à l'intérieur du bulbe à l'aide d'une seringue et de mesurer l'indice BRIX. En effet, cet indice, qui représente la teneur en sucres solubles d'une solution, montre une forte corrélation ($R^2 = 0.99$) avec la matière sèche (Sinclair et al., 1995). Dans nos essais, cette méthode a été vérifiée sur les bulbes d'IPA et montre une

bonne corrélation entre les deux méthodes. Un exemple de résultat d'analyse est donné dans la figure 4. Les effectifs étudiés sont de 35 individus par famille, tirés au hasard après triage.

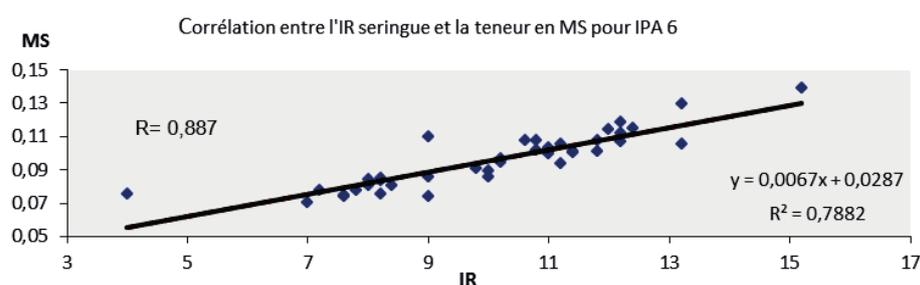


Figure 4 : corrélation entre l'indice de réfractométrie et la teneur en MS mesurée sur 35 individus de la variété IPA 6

2.2.4.5 - Traitement statistique des données

Le traitement statistique des données est réalisé à l'aide du logiciel SAS/STAT dans un premier temps puis du logiciel R. Une analyse de variance (ANOVA) et un test de comparaison des moyennes (Test de Tukey ou T de Student) sont en général effectués.

L'intensité de sélection est déterminée par la différence entre la valeur moyenne des plantes sélectionnées et la moyenne des populations dont elles ont été extraites, différence exprimée en unités d'écart-type de la distribution. Pour une proportion d'individus sélectionnés dans une population, inférieures à 50 %, elle est estimée à partir du tableau de détermination établi par Gallais (2011).

2.2.5 - Résultats

2.2.5.1 - Phase préliminaire, sélection des parents

Un essai d'adaptation aux conditions de culture de La Réunion pour les 65 variétés introduites a été effectué. Quarante d'entre elles (cf. tableau 6) ont montré une croissance et une bulbification acceptables pour être mises en essai comparatif.

Tableau 6 : liste des 40 variétés d'oignon retenues pour essai comparatif

Variétés	Couleur	Obtenteur/Pays	Variétés	Couleur	Obtenteur
White Hawk	Blanc	Bejo Zaden/NLD	H 95	Jaune	Hazera/ISR
Liberty	Jaune		Ram 763	Jaune	
Globe yellow Denver	Jaune		HA675	Jaune	
Caraïbe	Rouge	Technisem/FRA	ASG Granex	Jaune	ASGROW/USA
F1 Goldor	Jaune		XP 6781	Jaune	
Noflaye	Rose		XP 6995	Jaune	
Véronique	Rose	Grondin/FRA	Rojo	Rouge	Sunseeds/USA
RCS 3404	Rouge		Red Granex 38017	Rouge	
RCS 1006	Jaune	Rio Colorado/USA	Dessex-1	Jaune	Hygrotech/RSA
RCS 1069	Jaune		Gold Rush	Jaune	
RCS 1027	Jaune		Jaguar	Jaune	
Rio Raji	Rouge		Z 516	Jaune	
Sweet	Jaune	Hazera/ISR	Z 512	Jaune	Yates/AUS
Ram 735	Jaune		E 515	Jaune	
Ram 710	Jaune		AG 558	Jaune	
Shahar	Jaune	Hazera/ISR	Composto IPA 6	Rose	IPA/BRA
HA 870	Jaune		Vale Ouro IPA 11	Jaune	
H 950	Jaune		Franciscana IPA 10	Rouge	
Haz-Grano F1	Jaune		Mutuali IPA 8	Rouge	
HA 9	Jaune		Roxa IPA 3	Rose	

Les résultats de l'essai comparatif portant sur les critères de poids moyen d'un bulbe et indice de réfractométrie (Brix) sont présentés dans le tableau 7. Le classement des moyennes (ANOVA et test T de Student au seuil de 5%) permet d'effectuer un tri dans les variétés candidates.

Tableau 7 : comparaison du poids moyen d'un bulbe et de l'indice de réfractométrie pour un échantillon de 14 variétés

Variétés	Poids moyen d'un bulbe en g	IR moyen
Roxa IPA 3	167,2 a	9.9 d
Composto IPA6	151,5 ab	9.7 d
Ram763	144,9 abc	7.5 fg
Mutuali IPA8	139,2 abcd	9.9 d
Dessex-1	121,5 bcde	6,7 hijkl
RCS 1069	118,7 bcdef	5,2 lm
RCS 1006	114,3 bcdefg	5,5 klm
RCS 3404	107,2 bcdefgh	5,8 jklm
H 95	104,7 cdefgh	6,1 ijklm
H A9	104 cdefgh	6,1 ijklm
Ram 710	95,7 defghi	6,8 hijkl
.....
Véronique	65 efghi	15.4 a
Noflaye	73 efghi	13.5 a
Franciscana IPA 10	72 efghi	9,7 d

Les moyennes suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de 5% (test t)

Trois variétés-populations brésiliennes d'oignon rose et rouge, Roxa IPA 3, Mutuali IPA8 et Composto IPA6 ont été sélectionnées en raison d'un poids moyen de bulbe élevé (140-150 g) et un faible pourcentage de déchets à la récolte traduisant un bon potentiel de rendement. La forme de bulbes de type ovoïde à arrondi est hétérogène. Malgré la forte pression parasitaire (dépérissement bactérien et botrytis) ces 3 variétés ainsi qu'IPA 10 ont gardé un appareil végétatif sain durant les essais. Cette dernière variété qui présente une forme de bulbe plus régulière de type arrondie et homogène a été également sélectionnée pour le cycle d'évaluation suivant ainsi que deux variétés de couleur jaune, Ram763 et RCS 1006, présentant également un bon potentiel de rendement

Concernant la MS et l'aptitude à la conservation, le témoin Véronique et la variété Noflaye (issues de la même population d'origine Chateaufort) présentent les meilleurs indices réfractométriques (13 et 15°Brix). Les variétés IPA 3, 6, 8 et 10 présentent des valeurs moyennes intermédiaires (10°Brix). La variété Mutuali IPA 8 n'a pu être conservée en raison d'un manque de semences.

Le dernier essai d'évaluation variétale permettant le choix des parents a été conduit en milieu paysan dans des conditions difficiles (sécheresse avec problème d'irrigation et forte attaque de thrips). Les résultats sont synthétisés dans la figure 5.

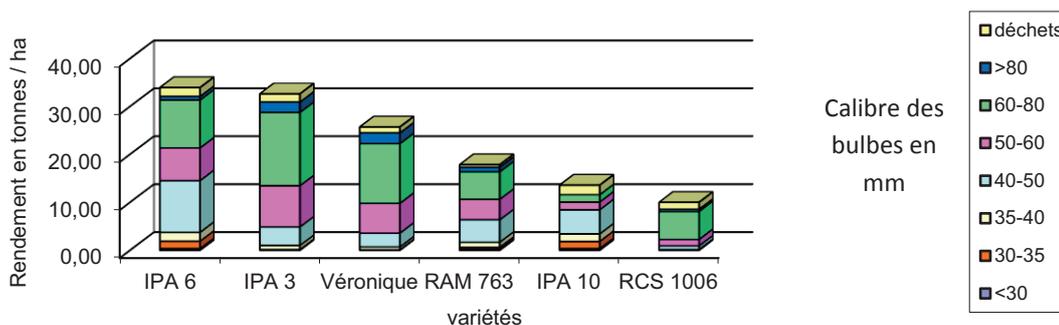


Figure 5 : répartition selon le diamètre des bulbes des variétés sélectionnées comme parents et comparaison pour le rendement en tonnes/ha

Les variétés RAM 763, IPA 10 et RCS 1006 ont eu des performances insuffisantes en termes de rendement et d'homogénéité de calibre dans ces conditions difficiles. RAM 763 et RCS 1006 ont été éliminées en raison d'un taux de floraison inférieur à 20%, ce qui restreint la source de diversité aux variétés brésiliennes de l'IPA.

Les deux variétés IPA 3 et IPA 6 ont un rendement commercialisable significativement supérieur au témoin Véronique (respectivement + 41 et + 47 %). Elles ont été choisies comme parents à croiser avec la variété Véronique.

2.2.5.2 - Phase 1 : création de populations de sélection par hybridation

Soixante-huit (68) croisements directs et réciproques ont été réalisés entre la variété Véronique et les variétés IPA 3 et IPA 6, en privilégiant la variété IPA 6 qui donne les meilleurs résultats depuis le début des travaux. Une synthèse est donnée dans le tableau 8.

Tableau 8 : création de 68 populations de sélection : caractéristiques des croisements réalisés

Croisement	Code	Nb combinaisons hybrides	Nombre de graines récoltées	Nb moy graines par ombelle	PMG (g)	Taux de germination (%)	Nb bulbes hybrides G0 obtenus en N+1
Véronique x IPA 6	Vx6	38	1231	32	3,93	84	334
IPA 6 x Véronique	6xV	17	360	21	3,02	23	94
Véronique x IPA 3	Vx3	5	130	26	3,13	60	23
IPA 3 x Véronique	3xV	8	174	22	3,09	50	55

Même si les conditions de culture n'ont pas été optimales, on constate des Poids de Mille Grains (PMG) conforme à la normale qui se situe en 2,5 et 4 gr. Ces graines permettent d'avoir des plants assez vigoureux pour la suite du programme. Les semences issues du croisement IPA6 X Véronique présentent un taux de germination très faible.

Ces 68 combinaisons G0 ont été semées pour évaluation l'année suivante avec des % de levées variables : 31 % des lignées entre 80 et 95 %, 42 % entre 50 et 79 % et 27 % entre 7 et 48 %. La production a été contrariée par des vols (3 hybrides V6 perdus) et des conditions climatiques difficiles durant la phase de bulbification. Au total 506 bulbes G0 ont été récoltés pour la poursuite des travaux (cf. annexe 7).

L'intensité de sélection exprimée en unités d'écart-type à ce stade est variable, du simple au double (Tab. 9)

Tableau 9 : intensité de sélection appliquée sur les hybrides

Croisement	Nb hybrides obtenus	Nb hybrides sélectionnés N+1	Nb bulbes récoltés N+1	Nb bulbes sélectionnés N+2	Intensité de sélection (I)
Vx6	38	27	334	84	1.271
6xV	17	5	94	6	1.951
3xV	8	1	55	1	2.421
Vx3	5	5	23	8	1.058

Le graphe suivant (Fig. 6) montre que pour les 16 meilleurs hybrides, 12 ont comme parent mâle IPA 6, ce qui confirme l'intérêt de ce géniteur. L'hybride V6.17 se démarque également au champ visuellement par une homogénéité végétative et des caractéristiques de qualité de bulbes très intéressantes. On constate des écarts types importants dans les poids de bulbes ce qui traduit une forte variation. Les bulbes sélectionnés ont fait l'objet de deux cycles d'autofécondation.

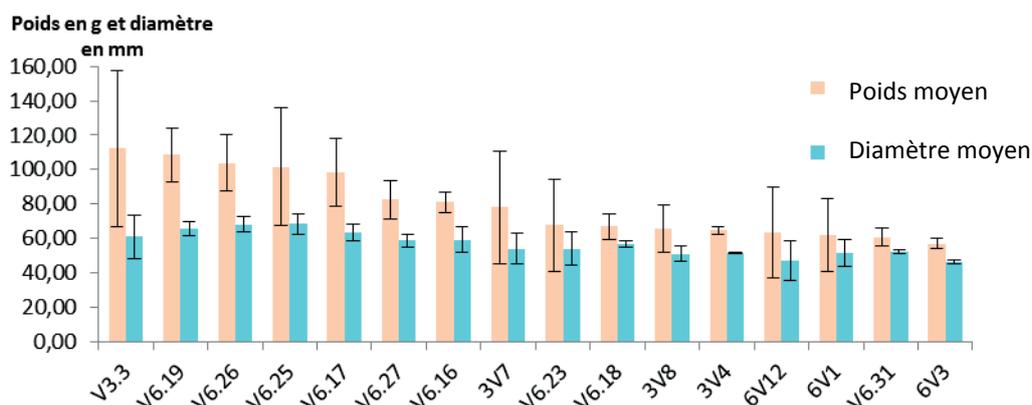


Figure 6 : poids et diamètre moyen d'un bulbe pour les 16 meilleures familles hybrides S0

2.2.5.3 - Phase de sélection sur familles S1 et S2

Après chacun des 2 cycles d'autofécondation une sélection a été effectuée en culture et sur les bulbes à la récolte. Les résultats du premier cycle d'autofécondation présentés en annexe 8 sont synthétisés dans le tableau 10.

Tableau 10 : synthèse des résultats du premier cycle d'autofécondation

Code	Nb bulbes sélectionnés	Nb auto fécondation réalisées	Nombre de graines récoltées	Nb moy de graines par ombelle
3xV	1	1	455	113.5
Vx3	8	4	2 392	79.1
Vx6	84	27	20 765	39.4
6xV	6	5	1 029	39.0

La famille V6.17 est la plus représentée avec 18 autofécondations et plus de 8 000 graines récoltées. Les écarts entre bulbes sélectionnés et le nombre d'autofécondations réalisées sont

liés aux pertes en cours de stockage et à l'absence de montée à fleur pour certains bulbes. L'hybride 3xV a été éliminé à ce stade en raison d'un manque de semences.

- Sélection dans les familles S1

Environ 11 000 plants ont été produits et répartis sur deux sites (St Louis et Bassin Plat) pour évaluation et sélection. 30 % des semences ont été conservées en chambre froide pour sécurisation.

Une synthèse des principales familles S1 sélectionnées dans les descendance d'hybrides et de leurs caractéristiques est donnée dans le tableau 11.

Tableau 11 : synthèse des résultats d'évaluation des familles S1 au champ (2 sites)

Famille S1	Nb bulbes produits	Nb bulbes conservés	% conservé	Pds moyen bulbe (g)		% floraison	% cœurs doubles
				St Louis	Bassin Plat		
V6.17a	507	352	69,4	237,1	53,5	7,9	32,1
V6.17b	33	30	90,9	262,1	48,3	0	23,4
V6.17e	123	80	65,0	238,8	59,3	8,2	11,7
V6.17m	85	55	64,7	200,0	62,3	8,8	10,5
V6.17n	26	11	42,3	220,0	66,7	2	18,6
V6.17o	76	57	75,0	203,7	46,0	2,5	38,7
V6.17q	114	71	62,3	214,1	50,0	0	14,1
V3.5	75	52	69,3	272,8	67,4	7,6	50,0
6V1	55	34	61,8	245,1	92,7	0	54,9
V6.28	16	9	56,2	236,4	50,0	0	13,9
V6.19j	80	34	42,5	225,0	48,8	30,1	7,7
Véronique				152,6	49,3	3,2	6,8
IPA 6				320,7	100,9	26,0	21,3
.....

Les excellentes conditions de culture de St Louis ont permis d'évaluer le potentiel réel de rendement des familles. On constate que le poids moyen des bulbes des lignées se positionne entre les deux parents (Fig. 7). Cependant les écarts entre les parents et entre les parents et les lignées sont nettement réduits en conditions de culture difficiles (Bassin Plat). Cela traduit la nécessité d'une meilleure maîtrise de la culture pour exprimer tout le potentiel des variétés améliorées, ainsi que la capacité des variétés population à assurer une production acceptable en conditions peu favorables. La présence de cœurs multiples a pu être observée sur les bulbes de gros diamètre récoltés sur le site de St Louis et une sélection pour ce critère a été réalisée. Globalement on ne constate pas d'interactions génotype X environnement mais un fort effet environnemental.

Les observations et prélèvements effectués sur les parcelles ont mis en évidence la présence d'un virus inconnu à La Réunion. Il a été identifié comme l'IYSV (*Iris yellow spot virus*), Tospovirus transmis par thrips (*Thrips tabaci* essentiellement), très répandu en parcelles d'oignon. Ces travaux ont permis la publication d'une note (First report) dans Plant Pathology (Robène et al., 2006). Cette épidémie d'IYSV a permis de sélectionner le matériel pour la tolérance à ce virus.

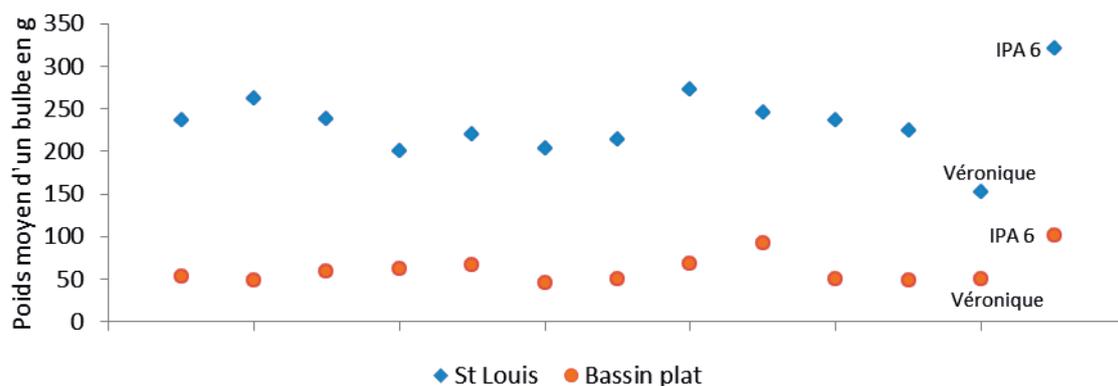


Figure 7 : comparaison du poids moyen d'un bulbe des meilleures familles S1, sur 2 sites d'évaluation (parcelle agriculteur St Louis et station Bassin Plat), par rapport aux parents

Une mesure de la matière sèche a été réalisée après 4 mois de stockage (Fig. 8). On constate que les principales familles S1 se positionnent entre les valeurs des parents.

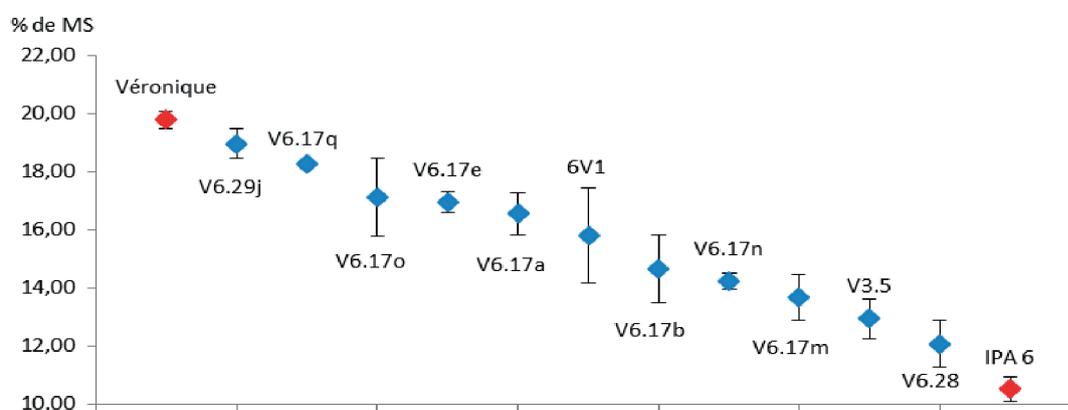


Figure 8 : comparaison du taux de MS moyen des 11 meilleures familles S1 (site de St Louis) par rapport aux parents

Les pertes en cours du stockage des bulbes varient de 10 à 57 %. Elles sont de 30.6 % pour V6.17a. La famille V6.28 a été éliminée en raison de sa mauvaise tenue au stockage. Parmi les bulbes restants, un premier choix de familles a été réalisé à partir des données collectées en culture et à la récolte. Afin de ne pas perdre de matériel potentiellement intéressant, certaines familles présentant des caractéristiques proches ont été regroupées en lot (bulks) destinés à être utilisés ultérieurement dans le cadre de la poursuite d'un programme de sélection.

- Second cycle d'autofécondation

A ce stade, 871 bulbes sur 1249, sélectionnés après stockage et représentant 17 descendance d'hybrides ont été plantés. Environ 20 % des bulbes n'ont pas fleuri et ont été éliminés. Aucune descendance complète n'a été écartée sur ce critère. Pour les plants florifères, 409 autofécondations ont été réalisées. Les résultats détaillés sont donnés dans le tableau 12 pour les principales familles retenues.

Tableau 12 : synthèse des résultats du second cycle d'autofécondation

Famille S1	Nb bulbes plantés	Nb autofécondations réalisées	Nb semences S2 récoltées	Nb moy de graines par ombelle	Nb familles S2 conservées (autofec réussies)
V6.17a	141	129	17 021	74.3 +/- 51	100
V6.17b	21	18	5 540	81.3 +/- 53	18
V6.17e	65	29	5 010	65 +/- 47	26
V6.17m	16	9	2 273	70.3 +/- 36	8
V6.17n	6	2	130	48.7 +/- 23	2
V6.17o	35	16	3 506	84.9 +/- 56	14
V6.17q	30	10	1 526	73.8 +/- 40	10
V6.19j	5	3	487	43.3 +/- 11	3
V6.29j	21	16	1 234	68.4 +/- 43	11
V3.5	38	15	2 630	104.2 +/- 53	11
V3.2a	31	19	3 605	78.1 +/- 64	13
6V1	16	4	747	75.1 +/- 42	3
.....

On observe une très grande variabilité dans le nombre de graines produites par ombelle. L'ensachage de plusieurs ombelles (2 à 4) issues d'un même bulbe donne de meilleurs résultats que l'ensachage d'une fleur unique. Le PMG moyen des semences est de 3.08 g +/- 0.59. La famille "V6.17n" a été éliminée en raison d'un nombre de semences récolté trop faible et de mauvaise qualité.

- Sélection dans les familles S2

Les semences des familles S2 ont été semées individuellement puis repiquées au champ sur deux sites, en station et en milieu paysan à l'Entre Deux (alt. 460 m) pour évaluation. En raison d'un problème d'herbicide sur la parcelle de l'agriculteur, seule la parcelle en station a pu être exploitée correctement. Environ 11 260 bulbes représentant 409 familles S2 ont été récoltés. Une sélection en 2 étapes a été opérée : « inter lignées » qui conduit au maintien ou au rejet d'une lignée puis « intra lignée » (sélection massale) pour celles maintenues. Cette sélection a été réalisée sur des critères visuels après stockage (manque ponctuel de personnel). La famille V3.5 a été éliminée en raison de l'hétérogénéité et la mauvaise qualité des bulbes. Au total, 52 familles sur 409 ont été conservées pour la suite des travaux.

Le tableau 13 indique le nombre de familles S2 et de bulbes correspondants sélectionnés.

Tableau 13 : Intensité de sélection appliquée sur les familles S2

Familles	Nb total S2	Nb S2 sélectionnées	Nb bulbes total	Nb bulbes sélectionnés	Intensité de sélection
V6.17a	100	24	3213	455	1.590
V6.17b	18	1	711	15	2.421
V6.17e	26	2	743	33	2.106
V6.17m	8	3	469	37	1.858
V6.17o	14	7	414	37	1.804
V6.17q	10	2	309	29	1.779
V6.19j	12	2	268	30	1.709
V6.14d	7	2	256	55	1.372
V6.14e (blanc)	7	6	352	190	0.798
V3.2a	13	2	589	66	1.709
6V1	3	1	101	4	2.154
.....

2.2.5.4 - Phase d'inter-croisement et sélection des familles demi-frères

Sur les 52 familles S2 sélectionnées, 17 ont été placées en pollinisation libre, sous structures « insect et pollen proof » avec utilisation d'abeilles pollinisatrices, (de même que les bulks constitués des 35 familles restantes pour produire un stock de semences à conserver). L'utilisation d'abeilles permet d'obtenir un meilleur rendement en graines et une meilleure qualité, en particulier pour le PMG. Les résultats de production du premier cycle sont donnés en annexe 9. Ce dispositif de multiplication de semences a été mis en place durant 3 cycles et continue d'être utilisé pour conserver les variétés population.

Une première sélection sur les familles S2 sélectionnées a été réalisée en station avec la mise en place de deux répétitions comportant chacune 26 familles et 9 bulks. Les effectifs varient de 850 à 16 800 plants par famille. Malheureusement, les mauvaises conditions climatiques de l'année ont entraîné la destruction d'une grande partie des parcelles avant récolte (près de 200 mm de pluie en 24h). Des observations qualitatives, en particulier, le comportement vis-à-vis du dépérissement bactérien et la montée à fleur ont pu être réalisées, conduisant à l'élimination de 12 familles. Tous les bulbes disponibles (familles F3) ont été récupérés pour assurer la multiplication des semences l'année suivante, avec des pertes importantes durant la phase de stockage des bulbes.

En parallèle de la multiplication des familles, trois cycles d'essais variétaux ont été conduits afin d'appliquer une sélection massale pour homogénéiser le matériel et comparer les familles entre elles.

- Sélection des familles en milieu paysan et résultats d'essais variétaux

Les sept familles qui ont présenté le meilleur comportement au champ ont été sélectionnées pour la poursuite du programme. Il s'agit de : V6.19j9, V6.17a21, V6.17e8, V6.17b3, V6.17a63, V6.17o3 et V6.17e6 blanc.

L'intensité de sélection appliquée au cours des 3 générations est indiquée dans le tableau 14 en termes de proportion de bulbes sélectionnés dans la génération précédente. Elle est relativement faible avec des taux de bulbes conservés souvent supérieurs à 50 % et variables selon les lignées et les générations.

Tableau 14 : intensité de sélection appliquée durant 3 générations sur les familles sélectionnées

Familles	F3 vers F4			F4 vers F5			F5 vers F6		
	Nb bulbes récoltés	Nb bulbes sélection.	% bulbes sélection.	Nb bulbes récoltés	Nb bulbes sélection.	% bulbes sélection.	Nb bulbes récoltés	Nb bulbes sélection.	% bulbes sélection.
V6.17e8	627	360	57,4	678	519	76,5	1075	571	53,1
V6.19j9	505	215	42,6	684	483	70,6	1681	190	11,3
V6.14e6blanc	522	227	43,5	813	368	45,3	723	Arrêt en F5	
V6.17b3	567	144	25,4	519	340	65,5	440	Arrêt en F5	
V6.17a21	503	205	40,8	756	625	82,7	783	600	76,6
V6.17a63	462	254	55,0	753	228	30,3	355	156	43,9
V6.17o3	762	220	28,9	639	353	55,2	903	128	14,2

Globalement, en termes de production, on constate que les lignées sont supérieures au parent Véronique, mais le gain est faible et souvent non significatif. Seules les variétés V6.17o3 et V6.19j9 présentent des différences significatives durant les trois cycles de sélection

(cf. tableau 15). L'analyse des différents essais montre que les écarts sont modulés par rapport aux conditions de culture du site et de l'année. Au cours de cette phase de sélection, une épidémie de mildiou (*Peronospora destructor*), maladie peu courante à La Réunion, s'est déclarée chez un agriculteur en raison de conditions favorables (surdosage d'azote, irrigation par aspersion mal maîtrisée). La variété Véronique s'est montrée particulièrement sensible de même que la famille V6.17a63 qui a été éliminée par la suite. Par contre, les autres familles et le parent IPA 6 montrent un bon niveau de tolérance au mildiou.

Les résultats de gain de poids de bulbe peuvent être exprimés sous la forme de différences de poids moyen de bulbe en grammes par rapport aux 2 parents pour une base 100. Le tableau 15 présente ces comparaisons au cours des 3 générations. Trois variétés, V6.17e8, V6.19j9, V6.17o3, montrent des gains de poids de bulbes significatifs.

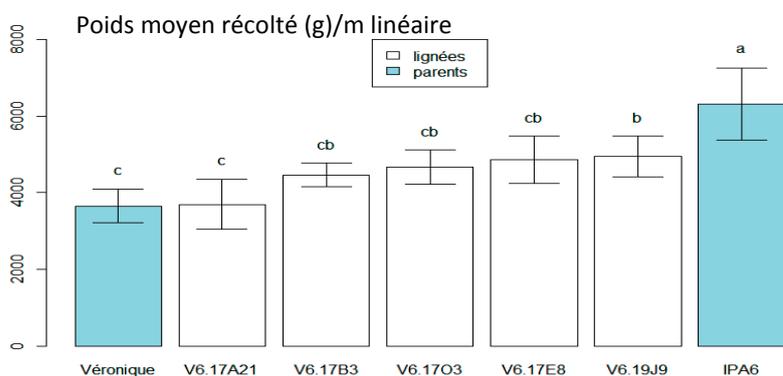
Pour une même génération les variétés ne sont pas comparables entre elles car les résultats sont issus d'essais conduits au cours d'années différentes.

Tableau 15 : évolution durant 3 générations du poids moyen d'un bulbe pour les familles sélectionnées

Familles	F3 vers F4		F4 vers F5		F5 vers F6	
	Véronique	IPA6	Véronique	IPA6	Véronique	IPA6
	Base 100					
V6.17e8	122ns	63.2*	136.0*	57.2*	132.6*	76.3*
V6.19j9	151.7*	62.0*	137.7*	58.0*	122.3*	70.3*
V6.14e6 blanc	109.7ns	45.1*	80.8ns	41.8*	109.9ns	46.3*
V6.17b3	106,6ns	55.4*	124.0ns	40.3*	n/a	n/a
V6.17a21	118.8ns	48.8*	104.6ns	54.3*	108.5ns	45.7*
V6.17a63	118.6ns	48.7*	127.3ns	66.2*	111.1ns	46.8*
V6.17o3	137.9*	71.0ns	163.4*	68.8ns	119.4*	68.7*

ns : non significatif au seuil de 5%. * : significatif au seuil de 5%. n/a : données manquantes

La figure 9 montre les résultats obtenus sur 4 parcelles de démonstration en milieu paysan sur lesquelles le rendement a été calculé à partir de 6 mesures de poids de bulbes récoltés sur 1 m linéaire par parcelle et par variété.



Le trait indique l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil de 5 %

Les lettres indiquent le niveau de signification du test de comparaison de moyenne (Test de Tukey)

Figure 9 : comparaison du rendement de 5 lignées sélectionnées (poids moyen récolté en g par mètre linéaire, moyenne de 4 parcelles) par rapport aux parents

Conformément à ce qui était recherché, la MS mesurée en fin de programme montre des teneurs proches (15 à 17 %) du parent de référence Véronique (17 %) et significativement supérieures au parent IPA6 (12 %) (cf. Fig. 10).

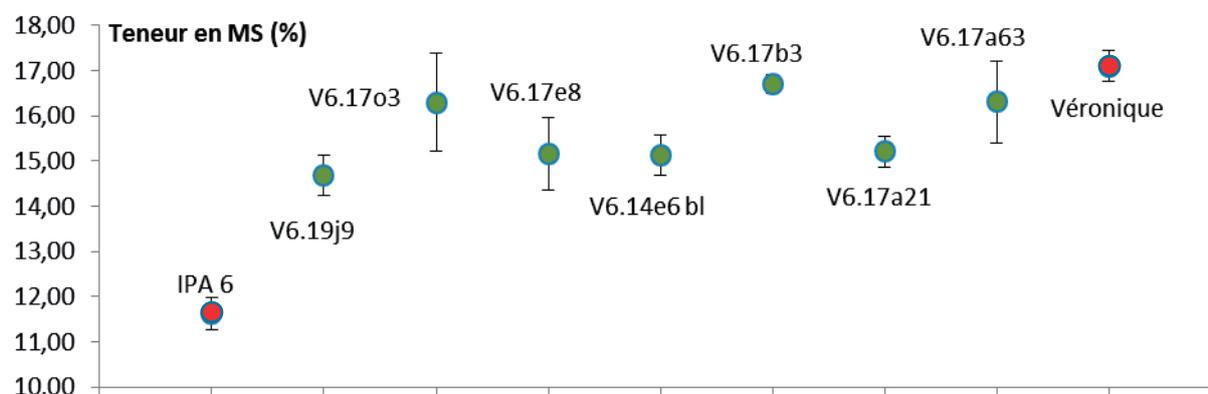


Figure 10 : comparaison de la teneur en MS de 7 lignées F6 sélectionnées par rapport aux parents

2.2.5.5 - Valorisation des variétés

Les six lignées retenues ont été présentées à un groupe de professionnels composé d'agriculteurs producteurs d'oignon, de techniciens d'OPA (Organisations Professionnelles Agricoles) et de techniciens du développement. Ce groupe a effectué un classement sur des critères visuels. Les résultats par ordre de préférence et les caractéristiques des variétés sont donnés dans le tableau 16. Les lignées de couleur blanche V6.17e6 blanc et "paille" V6.19-j9 n'ont pas été retenues car elles ne répondent pas aux exigences des consommateurs réunionnais qui ne consomment que des oignons colorés. Elles seront conservées pour répondre à des demandes spécifiques en dehors de La Réunion. Au préalable, les essais successifs d'évaluation, réalisés en milieu paysan, avaient permis de recueillir les remarques des producteurs et les préférences des variétés.

Tableau 16 : classement des variétés d'oignon sélectionnées par les professionnels (ordre de choix) et principales caractéristiques

variétés	Couleur	Poids en g et (diamètre) en mm d'un bulbe	Teneur MS (%)	Rendement potentiel (T/ha) estimation	Floraison en culture (%)
Véronique	Violet	93 (62)	16,2	20 - 25	2
V6.17-o3	Violet clair	141 (69)	16,3	30 - 40	1
V6.17-e8	Violet	121 (68)	15,2	25 - 35	1,2
V6.17-b3	Rose	107 (62)	16,7	23 - 28	0
V6.17-a21	Violet	90 (59)	15,2	20 - 25	0,1
V6.19-j9	Jaune - vert	130 (65)	14,7	33 - 38	8
V6.17-e6 bl.	Blanc	88 (61)	15,1	18 - 23	1
IPA6	Violet	200 (75)	11,5	40 - 50	17

Les photos des variétés retenues sont présentées dans la figure 11.

Il a été décidé, dans un premier temps, de ne présenter à l'inscription au catalogue qu'une seule variété, avec au préalable un contrôle variétal pour les 5 premières variétés (cf. tableau 16) destiné à vérifier l'homogénéité du matériel dans les conditions d'essai DHS (Distinction, Homogénéité, Stabilité) du GEVES à Cavaillon.

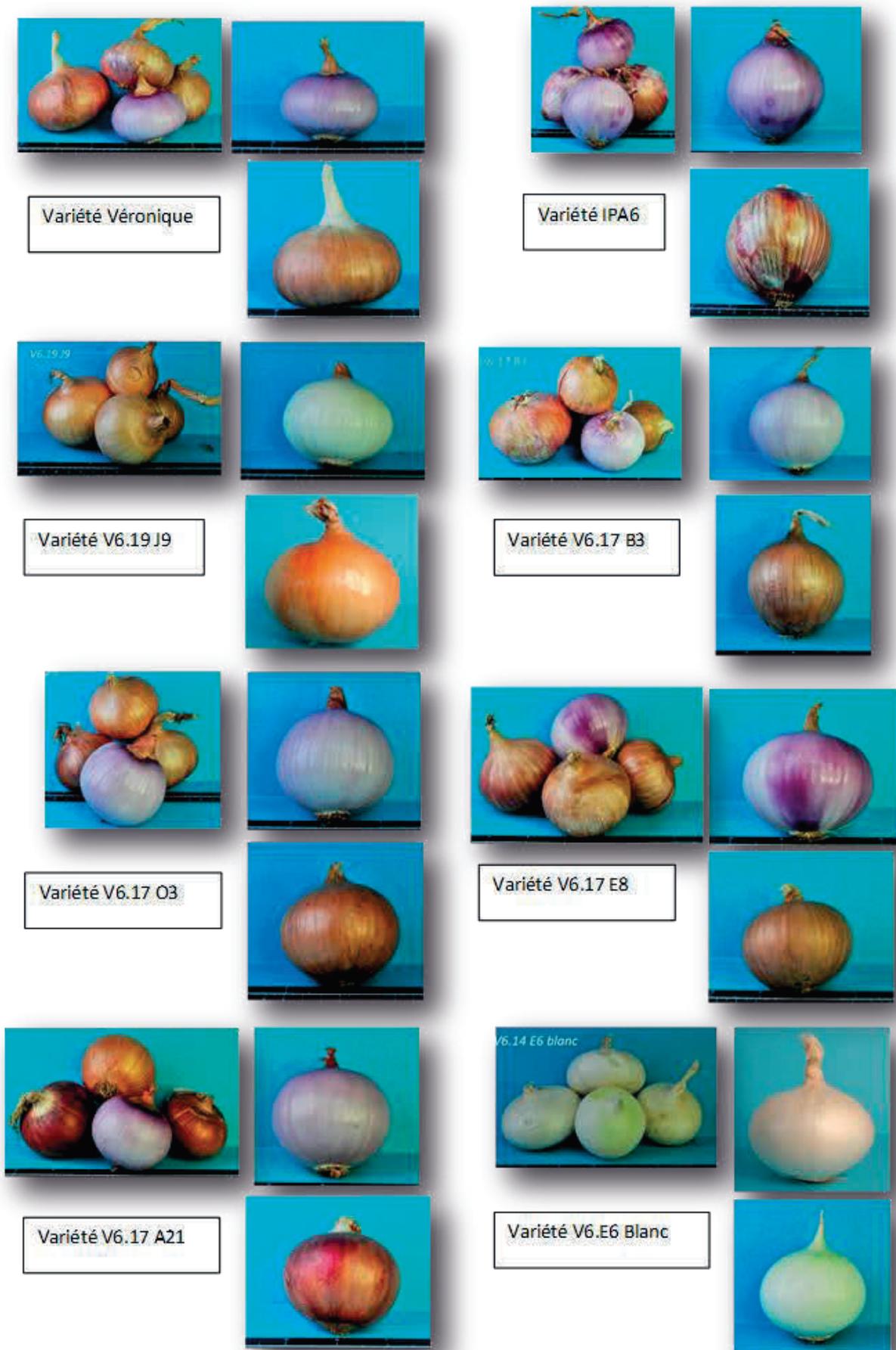


Figure 11 : photos des variétés sélectionnées

Photos : M. Roux-Cuvelier

Les conclusions du contrôle variétal GEVES sur bulbes sont les suivantes :

- Familles V6.17-o3 et V6.17-b3 : homogénéité insuffisante pour la forme et la couleur des écailles sèches et charnues.
- Famille V6.17-a21 : homogénéité acceptable pour la couleur des écailles sèches et charnues (supérieure à Véronique et Rose Bourbon), mais insuffisante pour la forme.
- Famille V6.17-e8 : homogénéité suffisante pour la forme et la couleur des écailles sèches et charnues.
- Famille V6.19-j9 : homogénéité insuffisante pour la forme et la couleur des écailles sèches et charnues.

On constate que le principal problème est le manque d'homogénéité des variétés. Seule la variété V6.17-e8 s'avère suffisamment homogène pour répondre aux critères de DHS. Elle arrive en deuxième position dans le choix des professionnels et a donc été proposée pour inscription au catalogue officiel en 2015.

2.2.6 - Discussion

L'objectif de départ a été en grande partie atteint. De nouvelles variétés sont en phase finale de sélection et seront prochainement diffusées aux agriculteurs. Elles devraient permettre de diversifier et de rendre plus compétitive la production d'oignon à La Réunion. Plus globalement, la réalisation de ce travail, qui demande un investissement sur le long terme avec des moyens humains importants, souligne la difficulté de conduire un programme de sélection sur l'oignon du fait de sa biologie (plante allogame bisannuelle).

Avec le recul et l'expérience acquise, plusieurs remarques et recommandations peuvent être émises.

2.2.6.1 - Sources de diversité utilisées

Le travail préliminaire de choix des parents a été essentiel et montre que malgré un nombre important de variétés tropicales de jours courts testées, seules cinq d'entre elles se sont avérées correctement adaptées aux conditions agro-climatiques de La Réunion. Cette situation peut être illustrée par l'inadaptation de la variété « Awahia » sélectionnée sur l'île d'Hawaï sous la même latitude que La Réunion (mais dans l'hémisphère Nord) et dans des conditions de culture analogues.

Le choix des deux variétés brésiliennes IPA3 et IPA6 s'est également imposé par le manque de moyens pour tester en croisement des variétés d'autres origines géographiques pour élargir la base génétique du matériel de sélection. Les deux variétés population retenues présentaient une hétérogénéité importante qui a pu cependant être exploitée à travers la diversité des descendances obtenues dans la phase 2 du programme.

2.2.6.2 - Efficacité du schéma de sélection

Le schéma de sélection utilisé n'a pas complètement répondu aux objectifs initiaux. Si les caractères intéressants de la variété Véronique ont pu être conservés, le gain de rendement final est inférieur à ce qui était attendu compte tenu du potentiel des parents IPA6 et IPA3. De même, les variétés créées présentent encore un niveau d'hétérogénéité trop important malgré les trois cycles de sélection appliqués après les autofécondations. On peut proposer plusieurs alternatives au schéma de sélection.

- L'amélioration du schéma utilisé : la sélection récurrente permet d'aboutir à des variétés améliorées à condition de prendre le soin et le temps de créer des populations de départ à base génétique suffisamment large, d'en évaluer la variabilité et l'héritabilité d'un nombre limité de traits prioritaires à sélectionner. Plusieurs pistes sont à explorer comme : élargir les bases génétiques du matériel de départ en brassant plus largement le matériel disponible afin d'optimiser les recombinaisons favorables ; démarrer par un ou plusieurs cycles de sélection massale afin de ne pas réduire trop vite la variabilité génétique ; disposer de populations complémentaires desquelles les géniteurs pourraient être extraits. Cependant, ces travaux auraient eu l'inconvénient de rallonger de plusieurs années la durée du programme. Une autre piste aurait été l'identification, dans le matériel initial introduit d'individus mâles stériles naturellement présents chez l'oignon, individus qui auraient facilité le travail d'hybridation et permis l'obtention d'un nombre plus élevé d'hybrides. Les observations ont montré que les variétés introduites ne présentaient pas de stérilité mâle.
- Le recours à l'haplo-diploïdisation : après la première phase d'hybridations, cette technique serait idéale pour fixer d'emblée toutes les recombinaisons possibles afin d'obtenir des lignées homozygotes et stables. Cela permettrait un gain de temps important mais aussi une meilleure efficacité par rapport au schéma de sélection appliqué, avec l'augmentation de la vigueur dans les combinaisons hybrides (Hyde et al., 2012).

L'oignon étant récalcitrant à l'androgenèse (Keller et Korzun, 1996), la méthode d'haplo-diploïdisation la plus utilisée est la gynogenèse avec l'emploi de bourgeons floraux, de fleurs non pollinisées ou d'ovaires (Dhatt et Thakur, 2014).

Dans notre cas, la mise en œuvre de cette méthode nécessiterait des tests préalables en raison de la spécificité des oignons tropicaux de jours courts pour lesquels peu de données sont disponibles. Plusieurs auteurs soulignent une variabilité importante entre cultivars dans la réponse à la gynogenèse (Dhatt et Thakur, 2014). De plus, seuls 10 à 30 % des plants d'oignons issus de gynogenèse sont des haploïdes doublés spontanés (Bohanec, 2002), de sorte que l'induction du doublement des chromosomes est nécessaire. Des stratégies basées sur l'utilisation d'agents anti-mitotiques tels que la colchicine ou l'oryzalin ont été développées (Alan et al., 2007 ; Dhatt et Thakur, 2014). Fayos et al. (2015) ont utilisé l'haplo-diploïdisation sur des variétés espagnoles d'oignons de jours longs et soulignent également la nécessité d'améliorer l'efficacité de la gynogenèse. Des méthodes alternatives telles que la régénération somatique ont été testées (Luthar et Bohanec, 1999).

Au démarrage du projet, le Cirad ne disposait pas des infrastructures nécessaires à la mise en place de cette technique. Cependant, dans l'éventualité de la poursuite d'un programme de création variétale d'oignons de jours courts au Cirad Réunion, l'haplo-diploïdisation serait aujourd'hui privilégiée compte tenu de nos compétences et moyens en culture *in vitro* disponibles.

2.2.6.3 - Discussion des résultats du contrôle variétal Geves

Les contrôles variétaux réalisés au Geves à Cavaillon montrent des résultats qui diffèrent de ceux obtenus à La Réunion, en particulier des tailles de bulbes inférieures à ce qui est observé dans nos conditions. Les conclusions du Geves sont toutefois acceptables mais cela souligne la difficulté de réaliser, en milieu tempéré, des travaux de caractérisation et de DHS de matériel tropical. De grandes variations des conditions climatiques, de durée de jour ou de conditions agronomiques peuvent entraîner des modifications morphologiques et

physiologiques pouvant conduire à un refus d'inscription d'une variété. Dans l'hypothèse de nouvelles demandes d'inscription au catalogue de variétés d'oignon sélectionnées à La Réunion (où dans d'autres DOM en milieu tropical) des discussions devraient être engagées avec le Geves pour délocaliser la réalisation des essais de DHS dans le milieu d'origine. Cette constatation est également applicable à d'autres espèces (cf. chapitre 2.5.3.2 - Semences "standard" et plants maraîchers)

2.2.6.4 - Intérêt des variétés obtenues

Les six variétés obtenues en fin de programme présentent un réel intérêt pour la diversification variétale en termes de gains qualitatif et quantitatif (goût, couleur, teneur en MS et aptitude à la conservation, rendement supérieur à Véronique). Leurs caractéristiques les positionnent plus près de la variété locale Véronique que de la variété brésilienne IPA6 ce qui permet de conserver en grande partie les qualités de Véronique. Le gain de rendement est significatif, même si on pouvait espérer un meilleur résultat. Associées à l'amélioration des itinéraires techniques, ces variétés pourraient contribuer à reconquérir des parts de marché sur l'oignon d'importation.

2.2.6.5 - Perspectives

Un nombre important de familles reste encore à évaluer. Une série de croisements complémentaires a été réalisée en 2004 à partir de populations plus homogènes que celles d'origine. Il s'agit d'IPA 6 qui a subi deux cycles de sélection massale et une famille proche de la variété Véronique dénommée G2. Faute de temps et de moyens, les descendances de ces croisements n'ont pas encore pu être complètement exploitées, mais les premières évaluations de matériel au champ mettent en évidence plusieurs familles intéressantes.

Un programme de sélection résiduel est mis en place depuis 2014. Il a pour objectif la poursuite de la sélection généalogique destinée à homogénéiser les variétés sélectionnées V6.17-o3 et V6.17-b3 et l'évaluation du matériel produit en 2004. En parallèle la variété proposée à l'inscription au catalogue est maintenue et la production de semences de prébase est assurée. La diffusion de la variété V6.17-E8 et la production de semences commerciales ont été confiées à l'établissement semencier FLHORYS.

2.3 - Mise au point d'une méthode d'embryogenèse somatique pour la multiplication du palmier *Bactris gasipaes* Kunth.

2.3.1 - Introduction

Dans les îles des Mascareignes (Maurice et Rodrigues, La Réunion), onze espèces d'Arécacées endémiques sont menacées d'extinction (Maunder et al., 2002). C'est le cas du palmiste rouge (*Acanthophoenix rubra* H. Wendl.), espèce des forêts humides de La Réunion et de Maurice, à large amplitude écologique et que l'on peut rencontrer de 100 à 1 500 m d'altitude. Commune avant l'arrivée de l'homme, elle a presque entièrement disparu des paysages forestiers après avoir été exploitée à outrance pour son « cœur de palmier » comestible. Elle ne subsiste plus, à l'état naturel, que dans les zones escarpées et difficiles d'accès. Les populations naturelles actuelles restent menacées par les effets de la fragmentation, par les plantes invasives et par le braconnage (prélèvement de cœurs de palmier *in situ*).

Les choux palmistes produits à La Réunion proviennent de trois espèces de palmiers endémiques des Mascareignes : *Dictyosperma album* (palmiste blanc), *Acanthophoenix rubra*

(palmiste rouge des bas) et *Acanthophoenix crinita* (palmiste rouge des hauts) Le "chou palmiste" est un aliment de choix utilisé comme légume dans la cuisine traditionnelle et très prisé par la population locale. Le palmiste rouge est le plus apprécié pour ses qualités gustatives.

La culture des palmistes est possible en sous-bois ou en plein champ, mais leur croissance est lente les deux premières années. Les choux palmistes sont récoltés par destruction de la plante, lorsque le diamètre du stipe a atteint 18 à 22 cm, le plus souvent au bout de 5 ou 6 ans. Dans des conditions de culture optimales (bonne irrigation, fertilisation des sols...), la récolte des cœurs, peut intervenir à partir de la quatrième année.

Les palmistes sont des plantes rustiques, résistantes aux vents violents et adaptées aux zones humides de La Réunion. Ils permettent de valoriser les terrains en pente ou peu fertiles et ne nécessitent que peu d'entretien à partir de la troisième année de culture. La demande croissante de cœurs de palmiste et leur prix de vente élevé ont incité les agriculteurs à développer cette production. Or, ce développement présente deux contraintes majeures : i) la durée de production des plants en pépinière à partir de graines, ii) la durée limitée de conservation et les problèmes pour la transformation post récolte dus au brunissement très rapide du cœur après la coupe, provoqué par les polyphénols oxydases, en particulier les catécholases (Van der Burg, 2004).

2.3.2 - Introduction du péjibaye à la Réunion

Bactris gasipaes est un palmier originaire du Costa Rica, de la Colombie et de l'Equateur dont la domestication par les populations indiennes remonte à plus de 10 000 ans (Clement et al., 2010). C'est une espèce cespiteuse (produisant une touffe compacte) dont les stipes peuvent atteindre une taille de 10 à 20 mètres de hauteur et de 10 à 20 cm de diamètre (cf. fig 12).

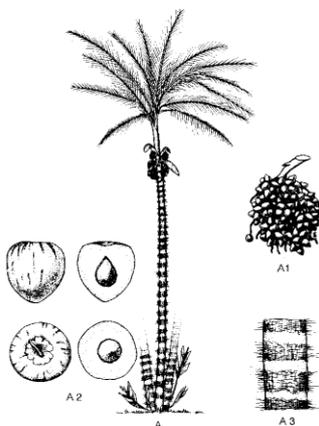


Figure 12 : schéma du palmier *Bactris gasipaes* (FAO, 1994)

Elle présente des rejets avec 1 à 13 stipes, cylindriques et non ramifiés. La dominance apicale du stipe principal contrôle la croissance des rejets. La couronne est composée de 10 à 30 palmes ou feuilles. Celles-ci peuvent atteindre jusqu'à 4 mètres de longueur avec le pétiole (Vandermeer, 1977). Les racines se développent sur les 20 premiers centimètres du sol et peuvent atteindre jusqu'à deux mètres de profondeur selon les types de sol (Mora-Urpi et al., 1997). Le stipe peut présenter ou non de longues épines noires et les feuilles des épines plus petites. On observe une variabilité selon les individus allant de fortement épineux à inermes (Michels, 2003). La présence ou non d'épines serait, selon Kerr et Clement (1980), un caractère mendélien sous la dépendance de plusieurs gènes (Clement et Manshardt, 2000). Dans la zone

traditionnelle de production (Mésosamérique), la floraison commence généralement après 3 à 5 années de culture et chaque palmier peut fructifier pendant 50 à 75 ans (Overbeek, 1990). Le péjibaye est une espèce monoïque, allogame, avec des fleurs unisexuées mâles ou femelles se développant sur le rachis d'un spadice émergeant à l'aisselle des feuilles. L'anthèse des fleurs mâles et femelles n'est pas synchrone et la fécondation croisée est en partie assurée grâce à deux insectes pollinisateurs, *Andranthobius palmarum* et *Phyllotrox* sp. qui sont des coléoptères et les principaux vecteurs du pollen (Listabarth, 1996 ; Mora-Urpi et al., 1997). C'est un palmier à croissance rapide qui permet, dans de bonnes conditions (climatiques, hydrométriques...), de récolter son cœur après 18 mois de culture. La présence de rejets permet de pérenniser les parcelles et de limiter l'érosion grâce à la couverture rapide et permanente du sol.

A la fin des années 90, en raison des difficultés rencontrées dans le développement de la culture des palmistes locaux et pour répondre à une demande croissante de choux palmiste, il a été décidé d'introduire à La Réunion, en provenance de la collection du Cirad en Guyane, le palmier *Bactris gasipaes* Kunth, communément appelé péjibaye ou peach palm. Les essais de comportement de l'espèce dans différents milieux à La Réunion ont été confiés au Cirad. Les résultats obtenus durant 5 ans ont montré une excellente adaptation de l'espèce dans les zones humides de l'Est de La Réunion où sont traditionnellement cultivés les palmistes locaux. Les maladies et parasites qui existent dans les plantations de péjibaye d'Amérique du Sud sont absents à La Réunion, limitant ainsi l'utilisation de pesticides. De plus, ses caractéristiques physiologiques, en particulier l'absence de brunissement du cœur après la coupe, permettent d'envisager son utilisation pour la filière de transformation, notamment pour la confection de produits de quatrième et cinquième gamme. Cela permettrait l'introduction des choux palmistes dans la grande distribution, les rendant ainsi accessibles à un plus grand nombre de consommateurs. Le péjibaye pourrait aussi jouer un rôle important dans la diversification des cultures des Hauts humides de La Réunion (Michels, 2003).

2.3.3 - Problématiques pour la production de plants de péjibaye à La Réunion

A La Réunion, la floraison du péjibaye intervient de novembre à fin janvier et de mars à juin (Normand, 2001). Les conditions optimales de pollinisation sont un vent léger, l'absence de pluie et la présence d'abeilles, à priori moins efficaces que les curculionidés, coléoptères pollinisateurs des zones d'origine, mais pouvant jouer un rôle dans la pollinisation (Michels, 2003). En raison de l'absence de ces insectes pollinisateurs et de floraisons erratiques qui contrarient la pollinisation naturelle, les arbres présentent un taux important de fruits parthénocarpiques. Aussi, la production de semences est très insuffisante pour approvisionner le marché des plants nécessaires au développement de la production sur l'île. Pour résoudre ce problème, plusieurs solutions ont été envisagées.

- La pollinisation manuelle croisée qui consiste à collecter du pollen sur les fleurs mâles, le conserver au froid à 4°C jusqu'à l'ouverture des spathes et féconder les fleurs femelles. Cette méthode qui s'avère peu efficace, difficile à mettre en œuvre et coûteuse en main d'œuvre, a été abandonnée.
- La multiplication végétative horticole par séparation de rejets qui apparaissent à la base de la plante dès la première année. Cette technique s'est également révélée peu efficace car les rejets sont très difficiles à séparer de la souche et les taux de multiplication et de reprise sont faibles (Michels, 2003).
- L'approvisionnement extérieur en semences d'Amérique centrale permettant ainsi de répondre rapidement à la demande en plants. Outre son coût élevé, l'introduction de

semences présente des risques sanitaires importants avec la présence de *Phytomonas* spp et d'un nématode *Bursaphelenchus cocophilus* pouvant être transmis par semences (Esser et Meredith, 1987). Ces deux parasites de quarantaine sont absents à La Réunion.

- la mise au point d'une méthode de multiplication *in vitro* rapide et massive, option développée de 2008 à 2010, permettant de cloner les individus élites présentant des caractères d'intérêt tels que l'absence d'épines sur le stipe ou la capacité à émettre des rejets.

2.3.4 - Choix de la méthode de multiplication : l'embryogénèse somatique

Pour s'affranchir des contraintes de multiplication spécifiques à La Réunion, un protocole de multiplication *in vitro* par embryogénèse somatique a été développé en s'appuyant sur les nombreux travaux conduits en particulier par le Cirad et l'IRD sur le palmier à huile (*Elaeis guineensis* jacq.) par Teixeira et al. (1994) ou Duval et al. (1995), le cocotier (*Cocos nucifera* L.) par Verdeil et al. (1994, 1995, 1999) et le palmier dattier (*Phoenix dactylifera*) par Sané et al. (2006) ou Fki et al. (2011).

L'utilisation de l'embryogénèse somatique chez les palmiers est donc courante. Un brevet a notamment été déposé en 2011 par l'Agricultural Research Development Agency en Thaïlande pour le palmier à huile (Tragoonrog et al. 2013). Cette technique pourrait être également utilisée chez les Bactris, pour multiplier à l'identique et en masse des individus sélectionnés pour leurs caractéristiques. Les premiers travaux de culture *in vitro* de *Bactris gasipaes* Kunth (Arias et Huete, 1983) ont porté sur l'organogénèse indirecte puis sur l'embryogénèse somatique (Valverde et al., 1987 ; Stein et Stephens, 1991). Afin d'optimiser l'obtention d'embryons somatiques, la méthode de couches cellulaires minces ou Thin Cell Layer (TCL) peut être employée. Cette technique, qui a été décrite pour la première fois chez le tabac *Nicotiana tabacum* (Trân Thanh Van, 1974), consiste à déposer l'explant en couches minces sur un milieu de culture contenant des macros et des micro éléments (Murashige et Skoog, 1962) additionné de vitamines, de régulateurs de croissance et autres produits (charbon actif...). En effet, selon Trân Thanh Van (2000), l'excision des explants permet de déclencher la synthèse d'enzymes qui vont activer de nouvelles molécules jouant un rôle dans le développement et la croissance cellulaire. La petite taille de l'explant permet un contact intime entre les cellules blessées et les autres cellules, mais aussi avec le milieu enrichi en hormones de croissance.

L'utilisation d'inflorescences immatures a permis l'obtention d'embryons somatiques chez *Bactris gasipae* (Steinmacher et al., 2007) mais aussi chez d'autres espèces telles que le palmier à huile (Teixeira et al., 1994), le cocotier (Verdeil et al., 1994) ou le palmier à bétel *Areca catechu* L. (Karun et al., 2004).

Avec l'appui d'Alain Borgel (D.R. IRD), nous avons fait le choix de tester cette méthode sur *Bactris gasipaes*, dans nos conditions. La première étape présentée ci-après concerne l'étude des conditions d'induction de cals embryogènes sur différents tissus de péjibaye. Des explants de deux origines (limbes foliaires et inflorescences immatures) ont été testés. Une analyse histologique permettant de révéler les tissus aptes à la callogenèse a été conduite. Ce travail a fait l'objet d'un stage de Master 2 de l'université de Paris XII Val de Marne (Boungnong, 2007) puis d'un projet tuteuré de 5 étudiants de l'IUT de St Pierre, Département Génie Biologique.

2.3.5 - Matériels et méthodes

2.3.5.1 - Mise en culture de jeunes feuilles de *Bactris gasipaes*

Matériel végétal : les plants utilisés, âgés de 4 à 10 mois, sont issus de semis de graines prélevées sur le parc semencier du Cirad Guyane et sont identifiés par un code. La hauteur des plants en cm et le nombre de feuilles sont enregistrés.

Milieux de culture : huit milieux de culture, additionnés d'hormones de croissance et d'un milieu témoin sans hormone, sont utilisés. Leurs compositions sont indiquées en annexe 10. Deux auxines, le 2,4-D et le Picloram (4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid) et une cytokinine, la 2- iP (6- γ -[Dimethylallylamino]-purine), sont testées.

Désinfection des tissus pour la mise en culture : les explants sont traités dans un bain de Bénomyl + Tween 20 pendant 40 min. puis dans l'alcool à 70° pendant 5 min. suivi d'un bain d'eau de Javel à 5,2° chlorométrique pendant 45 min et rincés dans 3 bains successifs d'eau distillée stérile.

Mise en culture des explants : sous une hotte à flux laminaire, les plants sont découpés en segments de 4 mm. Chaque segment est partagé en quatre fragments et déposé sur chaque milieu. La polarité naturelle est respectée lors du transfert sur le milieu. Le collet constitue le premier fragment noté S0.

Conditions de culture : les boîtes de Pétri, scellées avec du parafilm, sont mises en culture dans une étuve à l'obscurité à 27°C.

2.3.5.2 - Mise en culture d'inflorescences immatures

Matériel végétal : les explants proviennent de la dissection de cœurs de palmiers qui sont prélevés au champ sur des pieds âgés d'environ 6 ans. La partie la plus tendre correspond aux feuilles immatures et au tissu subapical. Les inflorescences immatures, d'une longueur de 5 à 14 mm, sont localisées à la base du cœur et accessibles après retrait des spathes internes.

Milieux de culture : deux milieux de culture utilisant du 2,4-D et du Picloram sont testés. Le milieu de base est identique à celui utilisé pour les feuilles (cf. annexe 10).

Désinfection et mise en culture des explants : les inflorescences ne nécessitent pas une désinfection aussi poussée que les feuilles car elles sont protégées du milieu extérieur. Cependant, avant le prélèvement des inflorescences, le cœur est plongé dans de l'éthanol à 70° pendant 5 minutes puis dans trois bains de 10 min. d'eau distillée stérile avant mise en culture. Les boîtes de Pétri sont placées en enceinte de culture à l'obscurité à 27°C.

2.3.5.3 - Plan expérimental et traitement des données

Mise en culture des explants foliaires :

- 42 plants ont été mis en culture sur les 8 milieux testés
- 840 explants mis en culture sur les 8 milieux (42 plants x 5 segments x 4 explants)
- 105 explants par milieu (840 explants / 8 milieux)
- 21 explants par traitement (combinaison milieu x segment) correspondant à 21 répétitions (105 explants par milieu / 5 segments).
- 4 plants témoins ont été placés sur un milieu sans hormone.

Mise en culture des inflorescences : la récupération des inflorescences immatures est difficile à réaliser compte tenu de la rigidité du stipe. Le nombre d'inflorescences prélevées et mises en culture est différent pour chaque palmier.

Traitement statistique des données : les résultats numériques obtenus sont présentés sous forme de tableaux de contingence et utilisation d'un test de khi² de Pearson, avec un intervalle de confiance de 95%, pour tester :

- la différence de callogenèse entre les segments
- la différence de callogenèse entre les différents traitements
- l'influence du 2-iP sur la callogenèse.

2.3.5.4 - Analyse histologique des explants

Les tissus végétaux à observer suivent des étapes de préparation (fixation, déshydratation) pour être inclus par la suite dans la résine de type époxy (Historessin de Reichert-Jung) selon le protocole de Schwendiman et al. (1988). 45 explants correspondant à un segment par milieu sont prélevés après trois, huit et quatorze jours de culture.

Les blocs de résine contenant les échantillons sont découpés en épaisseur de 4 μm à l'aide d'un microtome Reichert-Jung. Les coupes sont colorées à l'acide periodique – réactif de Schiff (PAS) et au Naphtol Blue Black (NBB). La coloration permet de mettre en évidence l'amidon et les composés polysaccharidiques qui apparaissent colorés en rose. Le NBB colore les protéines solubles du cytoplasme en bleu clair, celles du noyau et du nucléole en bleu foncé et celles des corps protéiques en bleu noir.

L'observation des coupes se fait sous microscope optique Olympus BX 40, relié à un appareil photo Olympus.

2.3.6 - Résultats

2.3.6.1 - Origine de la callogenèse primaire

Aucune modification macroscopique et microscopique n'a été observée sur les tissus d'inflorescences immatures 24 semaines après mise en culture. Les observations ont donc été concentrées sur les explants foliaires.

- Description macroscopique de la gaine foliaire du péjibaye

La figure 13A montre que les gaines qui entourent le pétiole de la future feuille sont volumineuses et d'épaisseur inégale. La mise en culture de la gaine entraîne un gonflement des cellules mais sans effet callogène (Fig. 13B).

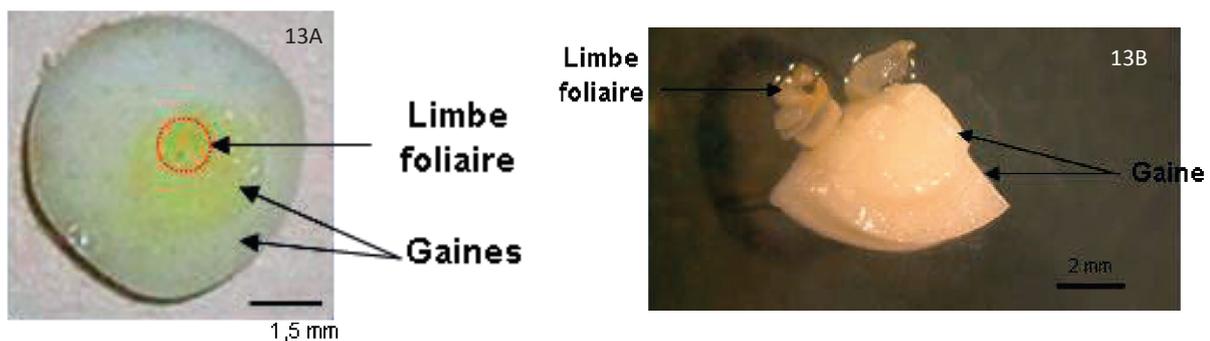


Figure 13 : photos macroscopiques de la gaine foliaire de péjibaye

- Description histologique de la gaine foliaire

Les coupes histologiques représentées par les figures 14 A, B et C montrent les cellules de la gaine foliaire après 14 jours de culture sur un milieu contenant 10 mg/L de 2,4-D et 2 mg/L de 2-iP. La gaine apparaît composée essentiellement de faisceaux conducteurs et de cellules du parenchyme (P). La structure est homogène avec de nombreux faisceaux vasculaires (FC) (Fig. 14A). Les cellules du parenchyme de forme globulaire sont de taille importante et contiennent un petit noyau, coloré en bleu foncé par le Naphtol Blue Black (NBB). Il n'est pas observé d'activité des cellules du parenchyme intrafasciculaire (PIF) (Fig.14B). Le faisceau conducteur

(Fig.14C) est composé du xylème (X) et du phloème (Ph) entourés par les cellules du PIF présentant parfois un noyau coloré en bleu foncé. Aucune activité callogène n'est observée au niveau de la gaine après 14 j de culture.

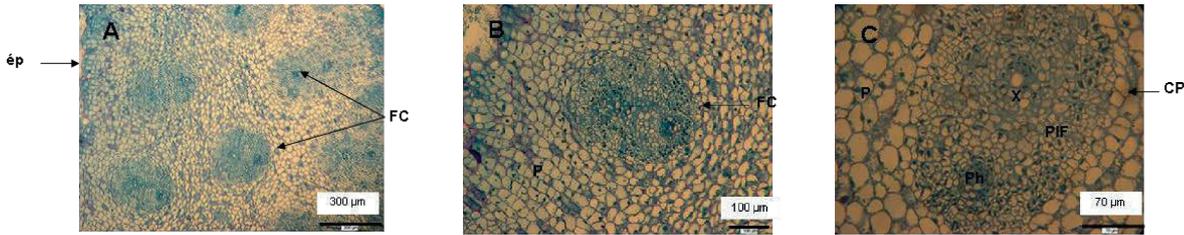
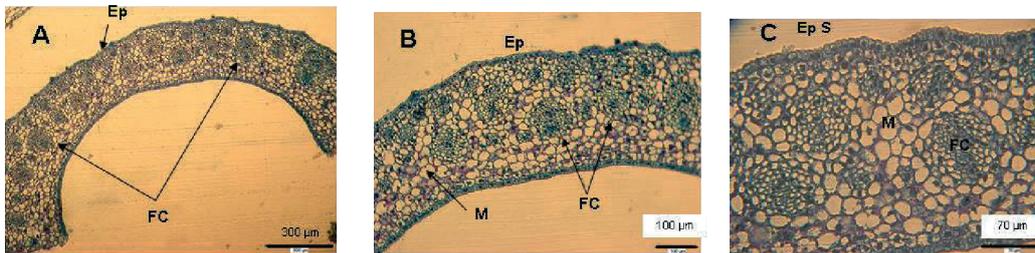


Figure 14 : coupes histologiques de la gaine foliaire de péjibaye

- Description histologique du limbe foliaire

La figure 15 ci-dessous représente des coupes histologiques d'un limbe foliaire après 3 jours de culture sur un milieu MS sans ajout d'hormone de croissance (témoin à l'état initial). Le limbe foliaire, d'une épaisseur d'environ 300 µm, est constitué de nombreux faisceaux conducteurs répartis dans le mésophylle avec la présence de deux épidermes bien lisses (Fig. 15A). Le mésophylle est homogène, il présente un faisceau conducteur tous les 100 µm environ (Fig. 15B). L'épiderme est composé d'une assise de cellules alignées les unes à côté des autres de façon régulière. Elles présentent pour la plupart un gros noyau central coloré en bleu foncé dans un cytoplasme dense coloré en bleu, non vacuolisé (Fig. 15C). Les cellules du parenchyme foliaire ou mésophylle présentent un petit noyau, pas toujours visible sur les coupes. Le volume de la cellule est occupé par une grosse vacuole.



FC : faisceau vasculaire, M : mésophylle, Ep S : épiderme supérieur

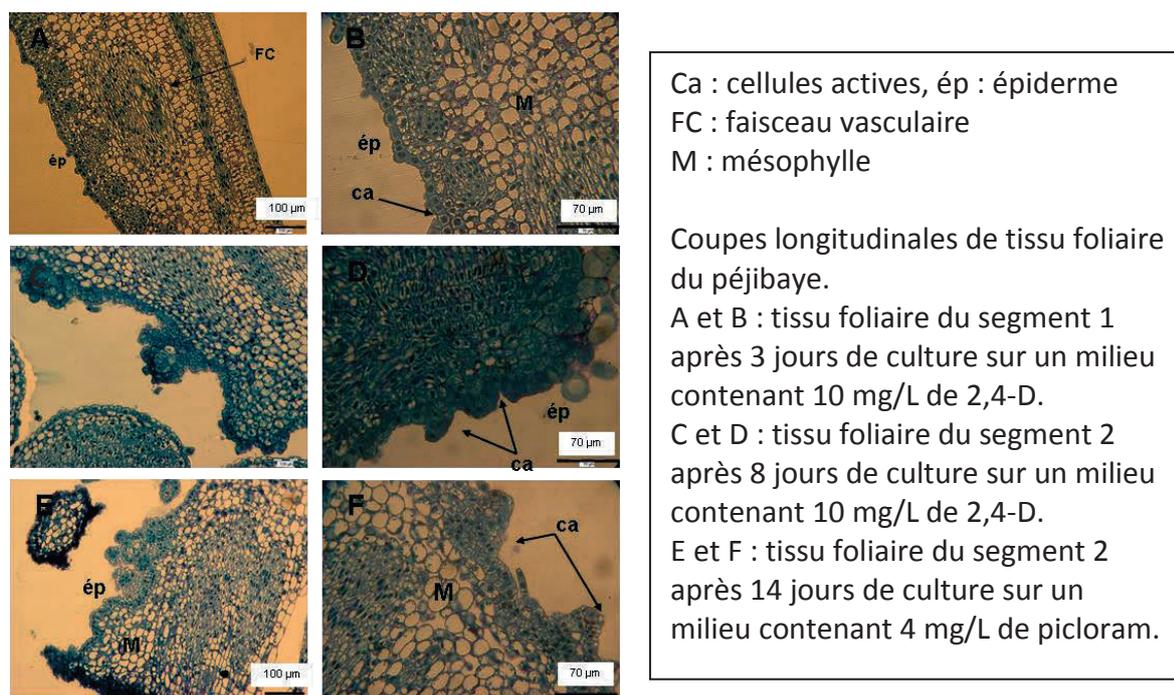
Figure 15 : coupes histologiques de limbe foliaire de péjibaye après 3 jours de culture

- Origine histologique des cals primaires

Les coupes histologiques des explants de limbes foliaires mis en culture sur les milieux avec du 2,4-D ou du picloram montrent clairement la formation des cals au niveau de l'épiderme de quelques cellules, quelle que soit l'hormone utilisée (Fig. 16). Après 3 jours de culture sur un milieu enrichi de 10 mg/L de 2,4-D, l'épiderme réagit alors que le mésophylle et le faisceau conducteur ne sont pas modifiés (Fig. 16A et B).

Après 8 jours de culture, les cellules de l'épiderme se sont divisées et forment des «renflements» de groupes de cellules. L'épiderme, qui initialement était formé par une couche de cellules, s'est épaissi et forme par endroit des protubérances pluri-cellulaires (Fig. 16C) qui sont constituées de cellules méristématiques contenant un noyau et un cytoplasme dense très riche en protéines intensément coloré en bleu par le NBB. Ces cellules se divisent activement (Fig. 16D). Après 14 jours de culture sur un milieu contenant 4 mg/L de picloram, de plus en plus de cellules actives au niveau de l'épiderme sont observées et forment des protubérances plus importantes (Fig. 16E). Les cellules du mésophylle ne réagissent pas aux

auxines utilisées et gardent leur aspect parenchymateux ainsi que le faisceau vasculaire qui conserve son aspect initial (Fig. 16F).



Ca : cellules actives, ép : épiderme
FC : faisceau vasculaire
M : mésophylle

Coupes longitudinales de tissu foliaire du péjibaye.

A et B : tissu foliaire du segment 1 après 3 jours de culture sur un milieu contenant 10 mg/L de 2,4-D.

C et D : tissu foliaire du segment 2 après 8 jours de culture sur un milieu contenant 10 mg/L de 2,4-D.

E et F : tissu foliaire du segment 2 après 14 jours de culture sur un milieu contenant 4 mg/L de picloram.

Figure 16 : observation de cals primaires sur l'épiderme de limbe foliaire de péjibaye après 3, 8 et 14 j de culture

2.3.6.2 - Description macroscopique de la callogenèse et de l'embryogenèse somatique

- Description de la callogenèse

L'évolution des explants a été suivie durant 14 semaines à partir de la mise en culture. Plusieurs événements importants ont été mis en évidence :

- une réaction du limbe foliaire de la majorité des explants dès le troisième jour de culture quel que soit le milieu utilisé. Cette réaction se caractérise par le développement (gonflement, augmentation de la taille) des tissus foliaires comme le montre la figure 17A. Après trois jours de culture, il n'y a pas encore de formation de cal visible à l'œil nu.
- la gaine ne gonfle que tardivement sans donner de cals visibles à l'œil nu.
- l'émergence de cals compacts à partir des limbes foliaires observables dès le premier mois de mise en culture.

Après deux mois de culture, on constate une activité importante de prolifération de cals compacts et nodulaires sur certains limbes foliaires, allant de 0,8 à 1,6 mm de diamètre (Fig. 17B). Ces cals évoluent lentement.

- Description des proembryons

Comme le montre la figure 17C, de nombreux proembryons se sont développés sur un des cals primaires d'un explant mis en culture sur un milieu MS additionné de 5 mg/L de 2,4-D. Ils apparaissent après environ 40 jours de culture sous la forme de petites protubérances qui grossissent et prennent un aspect globuleux et lisse après 2 mois. Les proembryons sont translucides et d'aspect lisses comparativement aux cals qui sont d'une couleur jaunâtre et d'aspect granuleux. A 83 jours de culture, les proembryons font environ 300 µm de diamètre.

L'explant (Fig.17C) a été repiqué sur un milieu MS contenant 8,8 mg/L de 2,4-D, 2 mg/L de 2-iP, 1 g/L de glutamine et 0,5 g/L d'hydrolysate de caséine pour favoriser son développement.

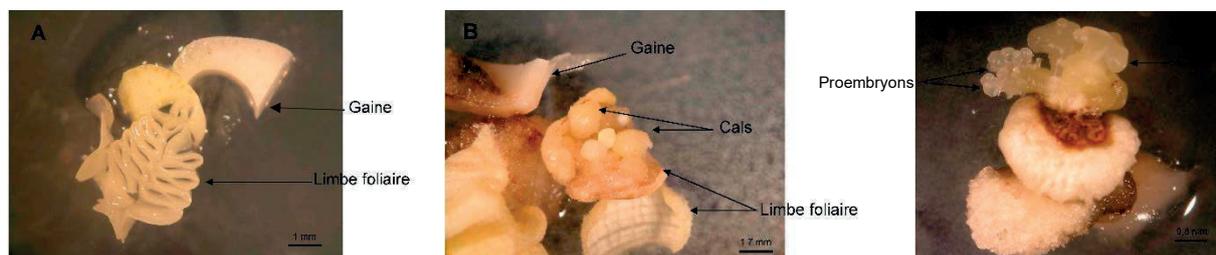


Figure 17 : photos de gaine et limbe (A) après mise en culture (mec), cals (B) 40 j après mec et proembryons (C) 60 J après mec

2.3.6.3 - Effet de la segmentation et du milieu de culture sur la callogénèse

- Influence de la segmentation du cœur sur la fréquence de la callogénèse

Les observations finales ont été réalisées 98 jours après la mise en culture de 960 explants. 120 explants ont été utilisés pour les études histologiques. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 17.

Tableau 17 : Influence de la segmentation du cœur de péjibaye sur la callogénèse

Segment	Contamination			Total	Nombre d'explants callogènes/nombre d'explants observés
	Explants contaminés	Explants non contaminés (avec limbe foliaire)	Explants non contaminés (gaine seule)		
S0	103	23	42	168	12/23 (52%)
S1	99	37	32	168	12/37 (32%)
S2	97	50	21	168	6/50 (12%)
S3	97	55	16	168	5/55 (9%)
S4	99	57	12	168	10/57 (18%)

Sur les 840 explants restant après prélèvement pour l'histologie, seuls 235 (28.5 %) sont utilisables en raison de nombreuses contaminations des milieux. Quel que soit le segment, on constate environ 60 % de contaminations. Parmi les explants vivants, sur 222 qui présentaient des tissus de gaine et de limbe foliaire, 45 (20 %) ont donné au moins un cal. Les explants constitués uniquement de gaines n'ont pas produit de cals, ce qui confirme les résultats de l'étude histologique. Compte tenu de cette réduction importante d'effectifs, il a été nécessaire de regrouper des segments pour réaliser les traitements statistiques : exclusion des explants ayant seulement la gaine foliaire ; regroupement des segments S2 et S3.

Le test de χ^2 est effectué avec un intervalle de confiance de 95% ($\alpha=5\%$) et un degré de liberté (dl) égal à 3. L'hypothèse H_0 est qu'il n'y a pas de différence de callogénèse entre les segments. Les résultats du test sont donnés dans le tableau 18.

Tableau 18 : Influence de la segmentation du cœur sur la callogénèse. Test de χ^2

Segments	X ² obs	DI	P-value	Résultat
Tous	25.36	3	2,09e-05	Différences entre segments
0 - 1	1.55	1	0.21	Pas de différence entre segments 0 et 1
2/3 - 4	1.07	1	0.30	Pas de différence entre segments 2/3 et 4
1 – 2/3	8.17	1	0.05	Différences entre segments 1 et 2/3
1 - 4	2.01	1	0.02	Différences entre segments 1 et 4
0 - 4	4.01	1	0.045	Différences entre segments 0 et 4

Les résultats ci-dessus montrent qu'il existe un effet du segment sur la callogénèse. Le segment 0 serait aussi callogène que le segment 1 et le segment 2/3 serait aussi callogène que le segment 4.

- Influence de la composition hormonale du milieu de culture sur la callogénèse.

Les résultats sont donnés dans le tableau 19.

Tableau 19 : Influence de la composition hormonale du milieu de culture sur la callogénèse

Milieux	Nombre et % d'explants callogènes	Nombre total d'explants observés
2,4-D	11 (23 %)	48
2,4-D + 2-iP	9 (19%)	48
Picloram	17 (21.5 %)	79
Picloram + 2-iP	8 (17 %)	47
Total	45	222

Un test de χ^2 avec un intervalle de confiance de 95% a été réalisé sur ces données avec l'hypothèse H0 suivante : tous les traitements sont identiques pour l'obtention de cals. Les résultats obtenus sont : X² =0,66; dl= 3; p-value =0,88. La p-value étant supérieure à 5%, l'hypothèse H0 est acceptée avec un seuil de confiance de 0,05. Il n'y a donc pas de différence de callogénèse selon les hormones utilisées.

L'incidence du 2-iP sur la callogénèse a également été étudiée. Les résultats sont indiqués dans le tableau 20.

Tableau 20 : effet du 2iP sur la callogénèse

	Nombre et % d'explants callogènes	Nombre total d'explants observés
Présence de 2-iP	17 (18 %)	95
Absence de 2-iP	28 (22 %)	127
Total	45	222

Un test de χ^2 a été effectué sur ces données. L'hypothèse H0 est l'absence d'effet de 2-iP sur la callogénèse. Les résultats obtenus sont les suivants : X² =0,35; dl= 1 ;p-value = 0,55. La p-value est supérieure à 5%. Il n'y a donc pas d'effet du 2-iP sur la callogénèse.

2.3.7 - Discussion

2.3.7.1 - Conditions générales d'expérimentation

L'expérimentation conduite a mis en évidence l'absence de réactivité des tissus de gaines des feuilles alors que ceux des limbes foliaires sont très rapidement réactifs. On constate que plus

de 50 % des explants ont été contaminés dès la mise en culture par des champignons ou des bactéries qui colonisent le milieu de culture. L'utilisation de vitroplants comme matériel de départ devrait permettre de limiter le risque de contamination et présenterait également l'avantage d'uniformiser le stade physiologique.

Concernant l'analyse des données, les différents paramètres étudiés, segmentation, milieu, origine des tissus, peuvent interagir entre eux, entraînant des difficultés d'interprétation des résultats.

2.3.7.2 - Origine de la callogenèse

Les observations histologiques montrent que la callogenèse chez le péjibaye est d'origine périphérique. Ce sont les cellules de l'épiderme qui réagissent quelles que soient les auxines utilisées, 2,4-D ou picloram. La division cellulaire apparaît dès 3 jours après la mise en culture formant progressivement des protubérances. Le mésophylle et les faisceaux conducteurs ne se modifient pas sous l'action des hormones alors que les observations faites chez d'autres espèces de la famille des palmiers telles que le palmier à huile (Schwendiman et al., 1988), le palmier dattier (Sané et al., 2006) et le cocotier (Buffard-Morel et al., 1992), montrent que l'initiation de la callogenèse a lieu uniquement au niveau des cellules de la zone périvasculaire. Cette origine épidermique de la callogenèse apparaît comme étant caractéristique du péjibaye. En revanche, d'autres espèces monocotylédones telle la canne à sucre (Bonnel et al., 1983) présentent aussi une callogenèse d'origine épidermique mais également d'autres tissus (fibres sous-épidermiques, gaine périvasculaire et tissu vasculaire).

Au niveau macroscopique, le palmier dattier, le palmier à huile et le cocotier présentent des formations d'îlots méristématiques à l'intérieur des tissus qui, en se multipliant, finissent par déchirer l'épiderme. Chez le péjibaye, les cals sont initiés directement au niveau de l'épiderme sur les limbes foliaires, observation confirmée depuis à plusieurs reprises (Steinmacher et al., 2013).

2.3.7.3 - Facteurs influençant la callogenèse

- Choix des tissus de départ

Les observations ont montré que les différents tissus mis en culture n'ont pas la même réactivité. Les limbes de feuilles immatures présentent un gonflement 3 jours après la mise en culture et les premiers cals sont visibles à l'œil nu dès le premier mois. Les inflorescences immatures sont très peu réactives. Après 10 semaines de culture, elles présentent un léger gonflement, sans cals visibles à l'œil nu. D'après Steinmacher et al. (2007), les explants doivent être conservés en enceinte de culture pendant 32 semaines avant que les premiers cals ne soient transférés sur un deuxième milieu de culture.

Dans nos conditions d'expérimentation et avec les cultivars utilisés, les feuilles immatures présentent une meilleure réponse à la callogenèse que les inflorescences immatures. L'évolution des cals obtenus sur les limbes foliaires est lente sur le milieu initial et le transfert sur un milieu de maturation devrait permettre une évolution plus rapide vers le stade embryogène. Cela a été constaté chez le palmier dattier (Sané et al., 2006) pour lequel les cals nodulaires primaires sont fractionnés et isolés des explants primaires.

Les tissus de la gaine des feuilles ne présentent pas d'activité callogène. En effet, les observations effectuées après 98 jours de culture montrent un gonflement des tissus mais sans production de cal. Les coupes histologiques montrent également qu'après 14 jours de culture, les cellules ne sont pas modifiées et qu'aucune division cellulaire n'est induite.

Concernant les feuilles immatures, les données analysées indiquent que les différents segments n'ont pas la même aptitude à la callogenèse. Les segments proches du collet (0 et 1) semblent plus aptes à produire des cals. Ils présentent 40 % de callogenèse alors que les

segments 2-3 et 4 ne présentent que 13 % de callogenèse. Ceci pourrait s'expliquer par la présence de la zone méristématique sous-jacente au collet chez les palmiers (Broschat, 2013).

- Choix des hormones

Dans nos conditions d'expérimentation, on ne constate pas de différence significative entre le Picloram et le 2,4-D, deux auxines reconnues pour induire la formation de cals chez les plantes. Valverde (1987) a montré que chez le péjibaye, le Picloram avait une efficacité supérieure au 2,4-D. Cela a été confirmé ultérieurement sur différentes sources d'explants (Steinmacher, 2007). L'effet de la 2-IP, cytokinine connue pour favoriser l'embryogénèse n'a pas pu être mis en évidence.

2.3.8 - Poursuite des travaux

A la suite de ces travaux sur la callogenèse réalisés dans le cadre d'un stage de Master 2, les activités ont été poursuivies avec l'objectif d'obtenir la différenciation d'embryons somatiques puis de plantules racinées aptes au sevrage. Ces travaux ont été pris en charge par une société VitroRun, startup créée en 2010 par la technopole de La Réunion et le Cirad pour l'exploitation commerciale des résultats obtenus. Cette entreprise innovante a été créée par d'anciens doctorants de notre unité de recherche (Séverine Bory, Karin Fareyrol), et l'assistant ingénieur de mon équipe qui a réalisé les travaux de mise au point de la méthode d'embryogénèse somatique sur la "péjibaye".

Dans un premier temps, une convention a été signée entre notre assistant ingénieur et le Cirad permettant sa mise à disposition à la société VitroRun, pour une période de 18 mois. L'objectif était d'assurer le transfert de technologie et de savoir-faire à l'entreprise mais aussi de sécuriser l'agent avant la mise en place d'un "congé création d'entreprise".

Un contrat de service entre le Cirad et la Technopole de La Réunion, agissant au nom de VitroRun, a par la suite été établi pour la mise à disposition de locaux et d'équipements de laboratoire à la startup, ainsi que la mise à disposition de l'agent Cirad et la cession du matériel végétal déjà produit.

En parallèle, le Cirad a accordé à notre assistant ingénieur la propriété et la libre utilisation du savoir-faire à des fins commerciales à travers un "contrat de cession de savoir-faire" tout en conservant des droits d'utilisation des résultats grâce à un "contrat de licence de savoir-faire". Cependant, moins d'un an après le démarrage de la période d'essaimage, notre assistant ingénieur a quitté, pour des raisons personnelles, la société VitroRun et résilié avant terme la convention d'essaimage mise en place par le Cirad. Les travaux ont alors été repris par les autres partenaires de la société qui bénéficient encore de nos jours du soutien du Cirad et d'un accueil sur la plateforme IBiSA du Pôle de Protection des Plantes. Dans le cadre de ce partenariat, la société VitroRun, lauréate du concours OSEO-ANVAR 2012, a bénéficié d'une subvention d'aide à la création d'entreprise d'un montant de 30 000 euros.

Pour des raisons de confidentialité vis-à-vis de la société VitroRun seule une synthèse des travaux poursuivis est présentée.

- Production de cals embryogènes

Le protocole pour la production de cals à partir de tissus de feuilles immatures prélevés sur de jeunes plants âgés de 2 à 6 mois a été validé. L'utilisation d'un milieu de base MS complété avec des vitamines de Wetmore et Morel et du Picloram à 4 mg/l permet d'obtenir des cals friables embryogènes en grandes quantités. L'ajout de 1,5 g/l de charbon actif dans le milieu de culture limite le brunissement du milieu causé par l'oxydation des substances phénoliques excrétées par les explants. Des essais de multiplication de cals en culture pure par isolation et transfert sur milieu liquide en agitation constante et à l'obscurité ont été conduits. Cette technique a permis une augmentation de la biomasse des cals de

1600 % (un inoculum de 300 mg de cals produit environ 5 g de cals frais friables en 40 jours). Cette technique a par la suite été abandonnée en raison de difficultés relevées dans la différenciation en cals embryogènes.

De même, des essais de multiplication de cals embryogènes utilisant le système d'immersion temporaire RITA® ont été réalisés mais n'ont pas donné les résultats attendus. Cependant, un protocole d'utilisation de cette méthode pour le péjibaye a été amélioré et décrit récemment (Heringer et al., 2014). Ce système permet la multiplication des embryons somatiques avec une augmentation des protéines, de l'amidon et de l'activité de l'ADH (Alcohol Dehydrogenase).

- Différenciation en pôles végétatifs et développement des plantules

Sur milieu solide de callogenèse, les cals présentant des pro embryons (stade nodulaire) évoluent rapidement vers le stade embryon bipolaire caractérisé par la présence d'un pôle racinaire et d'un pôle caulinaire. Repiqués sur un milieu MS sans substance de croissance, ces embryons évoluent en plantules qui peuvent être séparées du cal initial et individualisées en tube ou en container.

- Sevrage, acclimatation

Les difficultés les plus importantes ont été rencontrées au niveau du sevrage des vitroplants. En effet, malgré la présence d'un plateau racinaire et de racines fonctionnelles, on constate une mortalité de près de 50 % des plants sevrés, caractérisée par une nécrose du plateau racinaire. Ce problème a été en partie résolu par le prolongement de la phase de culture *in vitro* jusqu'à l'apparition de racines secondaires et l'épaississement du collet. Une phase de pré-acclimatation *in vitro* accélère la formation de la cuticule cireuse des feuilles qui permet de résister au stress hydrique environnant, limitant ainsi le risque de dessèchement. Différents substrats de sevrage ont été testés, il s'avère que la terre franche désinfectée par autoclavage donne les meilleurs résultats sous réserve de placer le collet du vitroplant au-dessus du substrat. Après avoir finalisé la mise au point de la technique d'acclimatation des vitroplants de péjibaye, la société VitroRun a sous-traité le sevrage et la production de plants à un pépiniériste privé, déjà spécialisé dans le sevrage de vitroplants de bananiers et qui a optimisé le protocole.

Le schéma global de production de vitroplants de péjibaye est illustré ci-dessous.

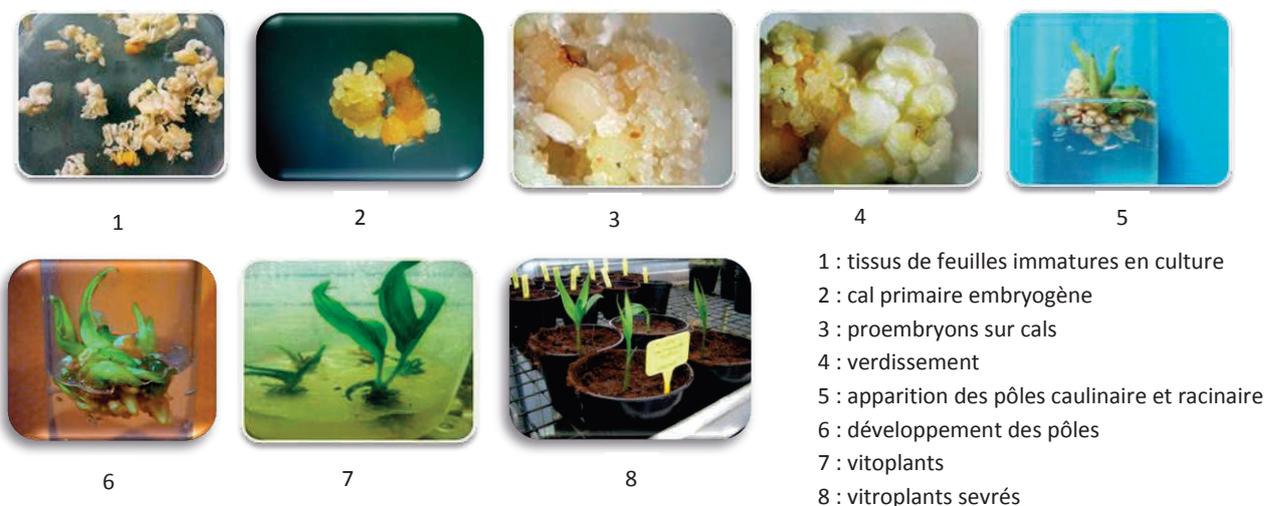


Figure 18 : illustration des différentes étapes du protocole d'embryogenèse somatique du péjibaye

2.3.9 - Discussion générale

Ce projet de recherche initié par le Cirad a conduit à la mise au point réussie d'un protocole de multiplication *in vitro* pour le péjibaye et à la création de la start-up VitroRun spécialisée dans la production de vitroplants qui peut répondre aujourd'hui à la demande du marché local de plants de péjibaye et d'autres espèces telles que la vanille. Elle fait partie des partenaires accueillis sur la plateforme IBISA du Pôle de Protection des Plantes.

Sur le plan de la méthode, des améliorations concernant le matériel de départ pourraient être testées pour optimiser le protocole :

- les tissus de feuilles immatures donnent de bons résultats mais la méthode de dissection des gaines foliaires doit être améliorée.
- l'utilisation de fleurs immatures suivant le protocole de Steinmacher (2007) ou d'apex caulinaires en diversifiant l'origine et l'âge des plants de départ afin d'étudier l'effet de ces facteurs sur la réponse à l'embryogenèse.
- l'utilisation de racines prélevées sur les plantules *in vitro* suivant le protocole développé sur le palmier à huile par Kerdsuwan et Te Chato (2016) pour obtenir une embryogenèse somatique directe.

Il faut noter que les meilleurs résultats d'induction d'embryogenèse sur péjibaye ont été obtenus avec des embryons zygotiques matures ou des plantules *in vitro* (Steinmacher et al. 2013). Cependant, le péjibaye étant une plante allogame, l'emploi d'embryons zygotiques issus d'intercroisements ne permet pas de connaître le phénotype des individus multipliés par embryogenèse somatique.

Un problème récurrent est la contamination des milieux par des bactéries endogènes qui peut entraîner des pertes d'explants. L'utilisation de PPM™ (Plant Preservative Mixture) biocide dont la composition fait l'objet d'un brevet (patent n° 5.750.402) pour contrôler de nombreux champignons et bactéries dans les milieux de culture pourraient être généralisée à toutes les phases du protocole.

De nouveaux essais utilisant le système de bioréacteur RITA® pourraient être conduits en s'appuyant sur le protocole et les résultats publiés par Heringer et al. (2014). De même, la technique TCL (Thin Cell Layer) pourrait être également testée.

Un des axes d'amélioration pourrait être le clonage par micropropagation d'écotypes inermes à fort potentiel agronomique. En effet, la présence d'épines en grand nombre sur le stipe sur la plupart des écotypes est un handicap important pour la gestion des parcelles en production. La multiplication par organogénèse telle que décrite par Abahmane, (2011) et Mazri et Meziani, (2013) pour le palmier dattier, espèce cespiteuse comme le péjibaye, pourrait servir de modèle. Ce type de multiplication présente l'avantage de limiter le risque de variation somaclonale que l'on rencontre couramment en embryogenèse somatique. L'organogénèse directe utilise les cellules méristématiques des bourgeons axillaires, les méristèmes racinaires ou les bourgeons floraux et des basses concentrations en hormones de croissance dans les milieux de culture.

Les marqueurs microsatellites ont permis de mettre en évidence la variabilité et la divergence génétique au sein de populations de péjibaye inerme et pourraient être développés comme outil de sélection combiné à une évaluation morpho – agronomique (Alves-Pereira et al., 2012).

Un contrôle de la conformité variétale permettant d'évaluer les dérives génétiques qui pourraient apparaître au cours de la phase *in vitro* devrait être mis en place. Des marqueurs

moléculaires de type AFLP, RFLP, SSR ou SNP ont déjà été utilisés sur de nombreuses espèces ligneuses (Teixeira Da Silva et al., 2007). L'utilisation de ces marqueurs est cependant discutable car ils ne permettent d'explorer qu'une petite partie du génome et sont inefficaces dans le cas de modifications épigénétiques (Neelakandan et Wang, 2012). Chez le palmier à huile, l'origine épigénétique de variations somaclonales a été mise en évidence et des différences dans les taux de méthylation de l'ADN pourraient être liées à l'apparition de l'instabilité épigénétique (Jaligot et al., 2000). De même, l'origine épigénétique du développement anormal de fleurs de palmier à huile issus de culture *in vitro* (« mantled » somaclonal variation) a été montrée (Jaligot et al., 2011)

A ce jour, la production de péjibaye à La Réunion s'est développée essentiellement à partir de l'introduction de semences de pays tiers suite à un assouplissement des règles sanitaires d'importation. Cependant, la multiplication *in vitro* de clones élites inermes et sélectionnés pour La Réunion pourrait être un atout pour améliorer la qualité de la production. Cela permettrait de limiter les importations de semences de pays tiers (Brésil, Nicaragua...) et pourrait contribuer au développement d'un marché à l'exportation pour des produits de qualité supérieure.

2.4 - Conservation des ressources génétiques végétales (RGV) : la sécurisation des collections *ex situ*

2.4.1 - Introduction

Au niveau mondial, la réduction de la biodiversité des plantes est aujourd'hui largement reconnue. Les listes de la CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) regroupent près de 30 000 espèces végétales menacées et protégées² (CITES, 2013). Si les plantes cultivées sont sans doute moins menacées que les plantes sauvages, le changement climatique et le modèle dominant d'agriculture intensive peuvent conduire à une perte de diversité génétique tant intraspécifique qu'interspécifique. S'appuyant sur les collections de RGV constituées par des décennies de collectes dans de très nombreux pays, la conservation *ex situ* reste encore aujourd'hui le dispositif le plus couramment employé pour préserver cette diversité agricole. Ce mode de conservation est largement utilisé par les organismes de recherche publics ou privés qui souhaitent disposer facilement de matériel végétal pour leurs travaux de recherche et pour l'amélioration variétale. Les centres du CGIAR (Consultative Group on International Agricultural Research) détiennent de très importantes collections dont bénéficient la communauté scientifique et l'ensemble des utilisateurs de RGV, notamment le secteur public des pays en développement (Galluzzi et al., 2016). Plus de 7 millions d'accessions sont conservées *ex situ* (FAO, 2010) et on peut citer l'initiative « Svalbard Global Seed Vault » qui héberge près de 840 000 accessions d'espèces à graines, déposées par 66 instituts de par le monde³.

Si le mode de conservation *ex situ* est largement pratiqué pour les espèces cultivées et leurs apparentées sauvages (Engelmann et Engels, 2002), il présente néanmoins des limitations plus ou moins importantes en fonction du type de ressources.

Espèces à multiplication végétative (notamment les plantes à racines et tubercules) : elles sont conservées au champ et régénérées en moyenne une fois par an par bouturage (manioc, patate douce...) ou replantation d'organes de réserve ou de fragments (taro, igname...), ce qui nécessite des moyens humains et matériels (parcelles, serres...) importants et coûteux. Les

² : <https://cites.org/eng/disc/species.php>

³ : Svalbard global seed vault. Annual report 2015

risques les plus importants sont la nature périssable de ces organes, les contaminations, essentiellement virales, liées au mode de multiplication, les vols au champ. La sécurisation des collections est réalisée par la duplication des collections au champ ou *in vitro*. Pour quelques espèces fertiles, des semences peuvent être conservées mais sans garantie de conformité génétique (FAO, 1997).

Espèces à multiplication sexuée : le stockage au froid des semences est certainement la méthode la plus efficace pour la conservation de RGV. On distingue selon leur comportement deux grands types de semences : i) les semences orthodoxes, dont la teneur en eau peut être abaissée jusqu'à 5 % environ et qui peuvent être conservées à des températures négatives pendant de longues périodes ii) les semences récalcitrantes, qui doivent garder une teneur en eau relativement élevée (le plus souvent de 20 à 50 % du poids frais) pour rester viables sur de courtes périodes (FAO, 1992). De nombreuses situations intermédiaires existent et la durée de vie des semences de ces différentes catégories est très variable suivant les espèces et les conditions de conservation (Chin et al., 2013). Le maintien de la longévité des semences orthodoxes est favorisé par la présence de téguments imperméables (cas des légumineuses) et par le stockage en atmosphère sèche et à basse température (Charrier et al., 1984). L'état physiologique et sanitaire des semences récoltées conditionnent également la réussite de la conservation. Il est recommandé d'utiliser des récipients fermés hermétiquement, une teneur en eau (sur la base du poids frais) de 3 à 7 % en fonction des espèces et une température de conservation de -18°C ou au-dessous (FAO, 2014). Pour des périodes de stockage plus courtes, de 3 ans ou moins, des températures de 0 à 5°C sont suffisantes (Bonner, 2008).

A la différence de la conservation *in situ*, la conservation *ex situ* a pour principal inconvénient d'isoler les RGV de leurs écosystèmes naturel ou cultivé (on farm) en les soustrayant aux forces évolutives et adaptatives locales. La conservation *ex situ* peut entraîner des dérives génétiques (accidents chromosomiques, mutations, bottlenecks) sous l'effet de pressions évolutives différentes du milieu d'origine pouvant aller jusqu'à la destruction des structures génétiques des populations naturelles initiales (Charrier et al., 1984).

De plus, le coût énergétique de la conservation au froid est élevé, en particulier dans les pays tropicaux.

2.4.2 - La cryoconservation pour préserver les ressources génétiques

La cryoconservation est la conservation d'échantillons biologiques à ultra basse température (-196°C) dans un milieu cryogénique tel que l'azote liquide. À cette température, toutes les divisions cellulaires et les processus métaboliques sont arrêtés, ce qui permet une conservation *ex situ* pour une durée théoriquement illimitée (Engelmann et Dussert, 2013). Cette technique aujourd'hui appliquée en routine offre aux gestionnaires de collection de nouvelles opportunités dans le but de sécuriser les collections de RGV (Engelmann 2004). Elle est parfaitement adaptée pour la conservation des ressources biologiques menacées d'érosion génétique et non stockables dans des conditions de conservation classique comme les matériels à multiplication végétative, les espèces à graines récalcitrantes ou les pollens (Keller et al., 2016). En fonction du type de matériel (graines orthodoxes ou récalcitrantes, pollen, embryon, apex ou méristème) et de l'aptitude des espèces à la cryoconservation, différentes techniques ont été développées (cf. annexe 11).

Le stockage des semences sans altération ou modification (Pritchard et Dickie, 2003), sur de très longues périodes, à un moindre coût et avec un entretien limité, est rendu possible grâce à la cryoconservation (Engelmann, 2004). Cette méthode permet aussi de conserver des

semences récalcitrantes ou intermédiaires comme celles des caféiers (Dussert et al., 1997 ; Dussert et Engelmann, 2006).

Au-delà de la sécurisation de la conservation de RGV, la cryoconservation présente d'autres atouts. Dès 1997, Brison et al. ont démontré l'impact de la cryoconservation sur l'état sanitaire d'un porte greffe de *Prunus* contaminé artificiellement par le *Plum Pox Potyvirus*. Helliott et al. (2002) ont obtenu par cryothérapie des taux d'assainissement supérieurs à la technique classique de culture de méristème pour le *Cucumber mosaic virus* et le *Banana streak virus* sur bananier. L'élimination de virus majeurs a ainsi été obtenue pour de nombreuses espèces (Wang et al., 2009) dont l'ail (Kim et al., 2012 ; Vieira et al., 2015), la patate douce (Wang et Valkonen, (2008) l'igname (Hee Shin et al. 2013) ou la pomme de terre (Yi et al. 2014).

Enfin, la cryoconservation présente l'avantage d'être le mode de conservation le plus économique à long terme. Dulloo et al. (2009) ont montré l'intérêt économique de la cryoconservation pour la collection de caféiers (*Coffea* spp.) conservée au CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). De même, une étude précise menée par l'IPK (Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung), où plus de 200 accessions d'aulx tempérés sont cryoconservées, démontre l'intérêt économique dès la 8^{ème} année de la cryoconservation comparée à la conservation au champ dans le cas de bulbilles (Keller et al., 2013).

A La Réunion, les collections de RGV à multiplication végétative du CRB VATEL sont soumises à des risques importants de pertes d'accessions, en particulier le risque cyclonique. Afin de sécuriser les accessions, des essais de cryoconservation sur la vanille, l'ail et les légumes lontan ont été réalisés dans le cadre du projet CRYOVEG (Cryopreservation of French plant genetic resources collections, 2009 - 2011) qui regroupait, l'IRD, l'INRA et Cirad et bénéficiait d'un financement du GIS IBISA. Des protocoles de cryoconservation de l'ail tempéré utilisés en routine (Keller et al., 2008 ; Kim et al., 2004, 2007 ; Baek et al., 2003) ont été testés avec succès sur du matériel tropical ; ces travaux ont fait l'objet d'un rapport de stage (Teyssède, 2009) et d'une publication (Panis et al., 2011) dans les comptes rendus de fin de projet COST action 871 «Cryoconservation of crop species in Europe ».

Dans le cadre de la mise en place de systèmes qualité pour la conservation des RGV (cas des CRB, norme AFNOR NFS 96-900) qui impose la sécurisation des accessions, la cryoconservation peut permettre de répondre à cette obligation.

Un essai d'application de la cryoconservation d'apex de vanille et de semences d'espèces diverses est présenté ci-après.

2.4.3 - Application de la cryoconservation aux accessions de vanilliers.

2.4.3.1 - Introduction

La mise en place et le maintien de collections *ex situ* de plantes à multiplication végétative telles que les vanilliers nécessite des moyens matériels et humains importants. Les collections sont maintenues sous ombrière « insect proof » et sont soumises à des risques importants de perte de matériel inhérents aux épisodes cycloniques et aux pathogènes. En effet l'introduction accidentelle sous ombrière de pathogènes tels que le virus CyMV (*Cymbidium Mosaic Virus*) ou *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis vanillae*, champignon du sol responsable de la fusariose, peut avoir des conséquences désastreuses. Afin de sécuriser la conservation de la collection, plusieurs dispositifs complémentaires ont été mis en œuvre : la duplication d'une « core » collection sous ombrière sur un site distant et la création d'une collection de plantules *in vitro*. Ce dispositif de laboratoire (vitrothèque) a un coût important et n'est pas sans risque sur le long terme notamment en raison des problèmes de variations somaclonales.

Pour maintenir l'intégrité génétique de la collection de vanilliers et limiter les coûts, des essais de cryoconservation d'apex ont été conduits en s'appuyant sur la seule publication existante (González-Arno et al., 2009). Ces travaux ont été réalisés dans le cadre du projet CRYOVEG, avec l'appui de l'IRD (UMR DIADE) et de l'équipe dirigée par Florent Engelmann.

2.4.3.2 - Présentation synthétique des travaux et résultats

Le protocole décrit par González-Arno et al. (2009) s'est avéré peu reproductible lors des premiers essais réalisés dans le cadre d'un stage de Master 1 (Atiama et Nourry, 2010). Des apex de 1 à 2 mm prélevés sur des vitroplants de vanilliers (*Vanilla planifolia*) et cryogénisés par trois techniques différentes (droplet-vitrification, vitrification PVS2 et 3 (cf. annexe 12), encapsulation-déshydratation) n'ont pas permis de régénérer du matériel après cryoconservation. Le développement *in vitro* de la vanille étant très lent, il est nécessaire de travailler sur des effectifs de départ importants permettant de contrôler la viabilité des bourgeons aux différentes étapes du protocole. Les très nombreuses contaminations bactériennes observées ont pu être contrôlées par l'adjonction de PPM™ (Plant Preservation Mixture).

Des modifications de protocole ont été expérimentées sur la vanille en s'appuyant sur les résultats de la technique de droplet-vitrification testée sur l'ail et le chrysanthème par Kim et al. (2009). Le protocole de base suivant a été appliqué sur un lot de 600 apex de *Vanilla planifolia* issus de vitroplants homogènes :

- Prétraitement des apex au MS(V)⁴ + 0.3M sucrose en milieu liquide durant 24 heures
- MS(V) + 0.7M sucrose liquide, 5-7 heures
- Traitement solution de charge C4 liquide (35% PVS3) pendant 30, 60 et 90 min
- Vitrification solutions A1/A7 et B1/B5 (cf. annexe 12)
- Traitement en droplet et mise en cryoconservation
- Réchauffement et détoxification dans une solution 0.8M sucrose à 40°C pendant 30 secondes, puis transfert sur milieu à 0.8M sucrose à température ambiante.
- Mise en culture sur MS(V)

Les traitements utilisés sont des dérivés des solutions classiques PVS2 et PVS3. Les variations portent essentiellement sur la concentration des constituants entrant dans la composition de ces deux solutions.

Les résultats obtenus sont synthétisés dans les figures 19 et 20.

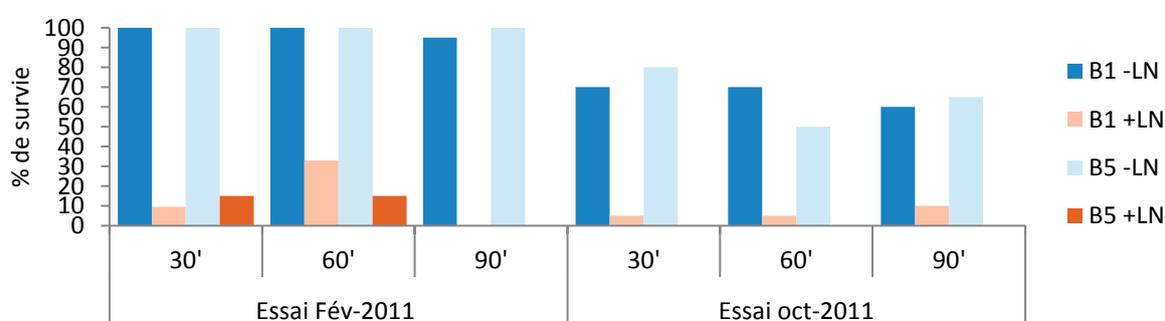


Figure 19 : effet de la durée des traitements B1 et B5 sur le % de survie des explants (LN : Liquid Nitrogen)

⁴ Milieu de culture MS (Murashige et Skoog, 1962) adapté vanille

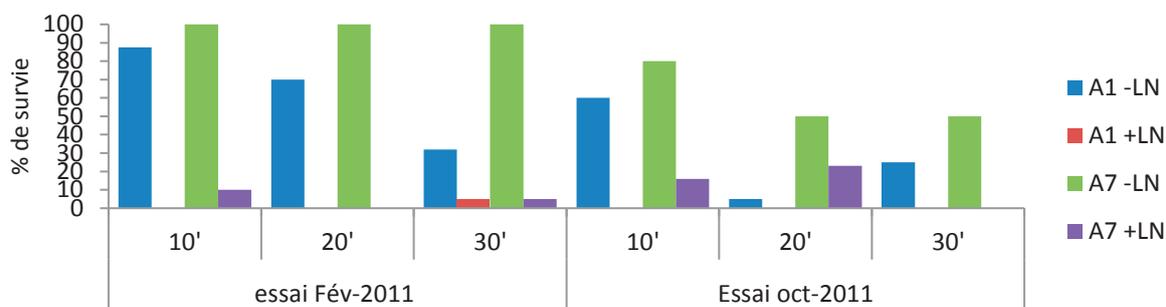


Figure 20 : effet de la durée des traitements A1 et A7 sur le % de survie des explants

Dans les deux tests réalisés et quels que soient les traitements appliqués, on constate que la survie des explants de vanillier après passage dans l'azote liquide (+LN) est très faible avec un maximum de 33 %. Même si les solutions de vitrification B1 et B5 permettent un meilleur taux de survie que A1 et A7, les résultats sont insuffisants pour poursuivre les travaux avec ces solutions.

Parmi les apex survivants, un seul a permis la régénération d'une plantule *in vitro* entière avec feuilles et racines (cf. fig. 21)

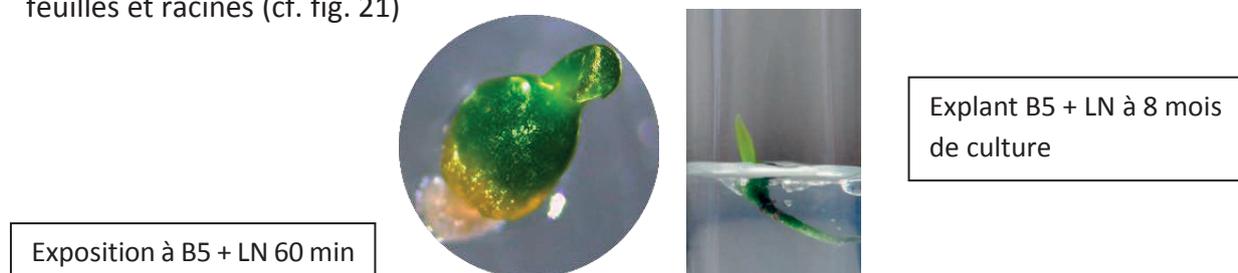


Figure 21 : explant survivant après cryoconservation et développement de plantule.

2.4.3.3 - Discussion

Les résultats obtenus montrent que la survie et le développement d'explants de vanillier après cryoconservation semble possible, de même que la régénération de plantules. La poursuite de travaux de mise au point est nécessaire. A ce stade, les taux de survivants et régénérants sont trop faibles pour utiliser cette technique en routine. La turgescence très importante des tissus de vanilliers semble induire une réponse atypique aux solutions de protection et vitrification (Engelmann, communication personnelle). A partir des améliorations apportées au protocole de droplet-vitrification par Gonzáles-Arno et al. (2009, 2010) et Hernandez-Ramirez et al. (2014) la cryoconservation d'apex de vanillier pourrait être une solution pour sécuriser les accessions de vanilliers en collection *ex situ*.

Avec la fin du projet CRYOVEG et les coûts prohibitifs d'approvisionnement en azote liquide par la société Air Liquide sur l'île de La Réunion (augmentation de 4 à 11 €/l), ces recherches ont été arrêtées et reportées. Leur reprise est conditionnée par l'acquisition, dans notre unité, d'un liquéfacteur pour la production d'azote liquide. Ces travaux pourraient bénéficier des améliorations du protocole de droplet-vitrification apportées par Hernandez-Ramirez et al. (2014) qui permettent d'obtenir jusqu'à 60 % d'explants survivants. Des travaux récents de cryoconservation appliqués à d'autres orchidées pourraient être exploités et appliqués à la vanille. Des protocormes d'hybrides de *Cymbidium* ont été cryoconservés avec succès avec la technique d'encapsulation – déshydratation puis vitrification (Teixeira da Silva, 2013). De même des protocormes d'*Ascocenda Wangsa* gold ont également pu être cryoconservés par déshydratation - vitrification (Rajasegar et al., 2015). Yamamoto et al. (2012) ont développé pour la cryoconservation d'apex de menthe, un protocole qui utilise un nouveau support

(aluminium cryo plate). Ce matériel peut être utilisé avec différents protocoles, V-Cryo plate et D-Cryo plate qui ont donné de très bons résultats sur pomme de terre avec des taux de régénération supérieur à 90 % (Yamamoto et al., 2015). La technique V-Cryo plate a été utilisée avec succès pour d'autres espèces dont la canne à sucre (Rafique et al., 2015).

La cryoconservation de pollen pourrait également être mise en œuvre pour conserver le patrimoine génétique haploïde des accessions et s'avèrerait très utile pour les travaux d'amélioration génétique de la vanille. Plusieurs essais de cryoconservation de pollen suivis de son utilisation dans des croisements interspécifiques avec des espèces de *Vanilla* présentant des floraisons asynchrones ont été réalisés avec succès (Minoo, 2002 ; Minoo et al., 2010, 2011).

2.4.4 - Cryoconservation de semences

2.4.4.1 - Introduction

A La Réunion, les RGV conservées sous forme de semences appartiennent à 24 espèces dont le comportement en conservation au froid n'est pas bien connu. Ces semences sont conservées sur de courtes périodes (4 ans maximum), en chambre froide à 8-12 °C, avec une hygrométrie contrôlée de 40-50 %. Un double de sauvegarde est conservé en sachet aluminium au congélateur à - 80°C. Malgré toutes les précautions prises (alarmes, groupe électrogène et groupe froid de secours) un risque subsiste notamment en cas de cyclone pouvant entraîner des coupures d'électricité sur plusieurs jours. De plus, ce mode de conservation est coûteux en énergie et en maintenance de matériel. Compte tenu de ces conditions, la cryoconservation pourrait être une alternative intéressante à mettre en œuvre. Dans cet objectif de rationalisation de la conservation, des tests ont été réalisés sur différentes espèces.

2.4.4.2 - Cryoconservation de semences d'accessions du CRB VATEL

Le protocole de départ utilisé est dérivé de celui mis au point par Dussert (1997) pour des semences intermédiaires de *Coffea arabica*. Plusieurs accessions de fabacées, cucurbitacées et solanacées ont été testées ainsi que des variétés de maïs (cf. annexe 13).

Dans le cas de semences de *Coffea*, le protocole initial prévoit une phase de pré-refroidissement progressive des semences avant cryoconservation (descente lente en température de 1°C/min jusqu'à - 50°C). Les essais réalisés sur nos semences de type orthodoxe en utilisant une descente en température à - 80°C non contrôlée (1 à 2°C/min) ne montrent aucun effet du traitement sur la germination. Cette phase initiale a donc été supprimée et le protocole suivant a été mis en place.

1. Equilibrage hydrique des semences à une teneur en eau de 9,5 % : les semences sont placées dans une atmosphère contrôlée et hermétique en présence indirecte d'une solution de K₂CO₃ à 82.2g/100 ml d'eau, pendant une durée de 10 jours minimum à 27°C à l'obscurité. Cette étape est nécessaire pour que les semences atteignent un état d'équilibre hydrique leur permettant d'avoir une meilleure stabilité vis-à-vis de la cryoconservation (Dussert et al., 1997 ; Reed, 2008)
2. Refroidissement : les semences sont transférées dans des cryotubes adaptés à leur taille qui sont plongés directement dans l'azote liquide (-196°C), durant 2 heures minimum.
3. Réchauffement : les cryotubes sont rapidement placés dans un bain-marie à 40°C pendant 1 minute. Les semences sont ensuite transférées sur un substrat neutre (papier filtre) pendant 45 minutes minimum à température ambiante.

4. Germination : à 27 °C en chambre climatique avec contrôle/ajustement de l'humidité si nécessaire.

2.4.4.3 - Discussion

Les résultats montrent que la cryoconservation de semences est possible pour les espèces de fabacées, solanacées et maïs testées, avec des réponses contrastées. Pour certaines accessions, on relève des taux de germination supérieurs après cryoconservation pouvant résulter d'un effet de la cryoconservation sur la dormance ou d'un effet assainissant. Pour les Fabacées, on constate globalement un effet négatif de la cryoconservation qui peut s'avérer très important dans le cas de contaminations des semences par des champignons appartenant aux *Fusarium* ou *Alternaria*. Sur *Lagenaria siceraria* (cucurbitacée), le passage dans l'azote liquide entraîne un effet négatif sur le taux de germination. Cela pourrait s'expliquer par des teneurs en lipides élevées dans les graines de cucurbitacées (entre 30 et 40 % selon les espèces). Habib et al., (2015) ont mesuré des teneurs de 36.7 % de lipides dans des graines de *Cucurbita maxima*. Les semences présentant des taux élevés en lipides (jusqu'à 60 % pour les graines oléagineuses) sont généralement tolérantes à la dessiccation mais très sensibles au refroidissement dans l'azote liquide (Stanwood, 1985).

Pour les graines orthodoxes qui représentent la majorité de nos espèces conservées, la teneur en eau minimale peut être fortement abaissée (jusqu'à 5 %) sans poser de problèmes (Roberts, 1973). Par contre, pour le cas particulier des semences de cucurbitacées riches en lipides, une phase de pré-refroidissement progressif analogue au protocole *Coffea* devrait être testée.

Les taux de germination ou régénération après cryoconservation doivent être pris en compte pour définir les effectifs des cryobanques. Dussert et al. (2003) ont développé une méthode, basée sur une distribution binomiale, qui permet, à partir de quatre paramètres, de calculer la probabilité d'obtenir au moins une ou plusieurs plantes régénérées.

2.5 - Cadre réglementaire pour l'utilisation des ressources phytogénétiques, le cas de La Réunion

2.5.1 - Introduction

Les ressources phytogénétiques (RPG), qui ont été définies dans le traité international de la FAO en 1983 comme « les variétés cultivées récentes, obsolètes ou primitives (variétés de pays), les espèces sauvages apparentées et les lignées issues de travaux de recherche ou de sélection », prennent une importance considérable face au défi de la sécurité alimentaire de la planète dans un contexte de changement climatique. Les trois projets de recherche présentés précédemment illustrent des enjeux liés à la conservation et à la valorisation des RPG pour l'agriculture.

En parallèle, deux thématiques, traitées au niveau international et national, sont étroitement liées aux ressources génétiques : d'une part, les questions d'accès aux ressources et leur utilisation dans un contexte réglementaire de plus en plus contraignant (application de la CDB 1992), d'autre part les questions liées à la propriété du vivant et plus particulièrement les Droits de Propriété Intellectuelle (DPI) sur les obtentions végétales et sur les constructions génétiques introduites dans les plantes et les gènes natifs. Ces deux thématiques ont un impact sur la valorisation des RPG qui, de plus, doit répondre des règles précises en matière de production et commercialisation des semences et plants.

L'île de La Réunion, département français d'outremer et région ultrapériphérique de l'UE, a l'obligation d'appliquer sur son territoire les réglementations et les normes en vigueur en France métropolitaine ainsi que des règles sanitaires spécifiques. Cela s'applique aux Ressources Génétiques (RG) à travers la constitution et la gestion de collections végétales ou microbiennes, mais aussi aux nombreux travaux de recherche conduits sur l'île et utilisant des RG. Les règles en matière de DPI et de production/diffusion de matériel végétal s'appliquent également en raison d'une activité de création variétale, mais aussi de valorisation de variétés locales et de commercialisation de semences et plants. La mise en œuvre de ces différentes réglementations, créées et appliquées essentiellement dans les pays tempérés (du Nord), soulève de nombreuses questions quant à leur applicabilité à La Réunion et plus globalement en milieu tropical.

2.5.2 - Constitution et maintien de collections de ressources génétiques vs réglementation

2.5.2.1 - Éléments de contexte

L'accès facilité aux RPG, éléments constitutifs de la biodiversité, est une base essentielle du développement de l'agriculture et du progrès technique. Jusqu'en 1983, les RG pouvaient circuler librement entre les différents pays. Elles étaient reconnues patrimoine commun de l'humanité et la réglementation ne concernait alors que les aspects sanitaires (CIPV - Convention Internationale pour la Protection des Végétaux, Rome 1951) et la protection des espèces menacées (CITES, Washington 1973, entrée en vigueur le 1/7/1975).

En 1983, la Conférence de la FAO adopte à Rome l'engagement international (EI) sur les RPG pour l'Agriculture et l'Alimentation. Cet accord sera suivi par près de vingt ans de négociations et son adaptation aux orientations de la CDB aboutira en 2004 au TIRPAA (Traité International sur les Ressources Phytogénétiques pour l'Agriculture et l'Alimentation) pour une liste restreinte d'espèces d'intérêt agricole. Dans le cadre de cet accord multilatéral, l'accès aux Ressources Phytogénétiques Agricoles (RPGA) pour la recherche scientifique, la sélection et la conservation s'accompagne d'un Accord Type de Transfert de Matériel (ATTM).

En parallèle, en 1988 et 1989, le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE) réunit des groupes d'experts pour préparer un instrument juridique international sur la conservation et l'utilisation durable de la diversité biologique globale (tous les organismes vivants) qui conduira à l'adoption du texte de la CDB lors de la Conférence des Nations Unies sur l'environnement et le développement à Rio de Janeiro (1992). La CDB a été complétée en 2000 par le Protocole de Cartagena sur la prévention des risques biotechnologiques. Enfin, le Protocole de Nagoya, signé en 2010, précise les conditions d'accès aux Ressources Génétiques (RG) et aux Connaissances Traditionnelles Associées aux ressources génétiques (CTA) ainsi que le partage des avantages (APA pour Accès et Partage des Avantages) tirés de l'utilisation de ces RG et des CTA. Les Etats membres doivent prendre en compte ces éléments dans leur législation nationale (août 2016 en France). Le premier effet de la mise en place de ce cadre réglementaire est une complexification, pour les pays tiers, de l'accès aux RG détenues par les pays.

Élément clé de cette évolution, la FAO et la Convention sur la Diversité Biologique (CDB) reconnaissent que les nations ont des droits souverains sur leurs RPG.

Le tableau 21 établit une comparaison entre les deux instruments internationaux, CDB et TIRPAA.

Tableau 21 : comparaison de deux instruments internationaux, CDB et TIRPAA pour l'accès aux ressources génétiques et le partage découlant de leur utilisation

Critères	CDB + Protocole de Nagoya	TIRPAA
Objectifs	Conservation de la diversité biologique Utilisation durable de ses éléments et Partage juste et équitable des avantages découlant de l'exploitation des RG	Conservation et utilisation durable des RPG pour l'Agriculture et l'Alimentation Partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation
Souveraineté	Droit souverain des États sur leurs RG	Dans l'exercice de leurs droits souverains, les États parties établissent un système d'APA multilatéral sur leurs RPAA
Champ d'application	Toutes les RG originaires de l'État partie ou acquises conformément à la CDB	Les RPAA des espèces de l'Annexe I appartenant au domaine public et gérées par les États parties ou d'autres détenteurs pour une utilisation agricole et alimentaire + collections des Centres internationaux de recherche agronomique
Approche	Bilatérale	Multilatérale
Accès	Législations nationales Accès facilité, conditions convenues d'un commun accord et consentement préalable donné en connaissance de cause de l'État partie Accès simplifié pour la recherche à des fins non commerciales	Système multilatéral Accès facilité pour la conservation, la recherche, la sélection conformément à un accord type de transfert de matériel
Partage des avantages	Législations nationales ou régionales (UE) Accent sur avantages non monétaires en faveur de la conservation des RG	Système multilatéral <i>Si un produit commercial est élaboré à partir des RPAA, une part équitable des avantages qui en découlent est versée à l'Organe Directeur, si ce produit ne peut pas être utilisé sans restriction par d'autres bénéficiaires pour la recherche et la sélection. Si d'autres bénéficiaires peuvent l'utiliser, le paiement est facultatif (cas du système UPOV)</i>
Conservation	Accent mis sur la conservation <i>in situ</i> et <i>ex-situ</i> dans le pays d'origine	<i>In situ et ex situ (collections des CIRA et réseaux internationaux de collections)</i>
CTA et droits des agriculteurs	Législations nationales	Législations nationales
Pays Parties au 20/02/2015	195 + UE 67 + UE pour Protocole de Nagoya	136 + UE

Il est à noter que les États-Unis, détenteurs de très importantes collections de RG, n'ont ratifié aucun des traités ou protocoles précédents et n'ont pas de législation sur l'APA. Ce n'est que le 28/09/2016 que le Sénat américain a donné son consentement pour la ratification du TIRPAA.

Au niveau européen, le règlement est entré en vigueur en même temps que le Protocole de Nagoya le 12 octobre 2014. Il s'applique aux ressources (RG) et connaissances (CTA) acquises après cette date, en provenance de pays ayant ratifié ce Protocole et disposant de règles nationales APA. Cependant, les RPG pour l'Agriculture et l'Alimentation sont régies par le TIRPAA (liste A), et bénéficient d'un accès facilité avec ATM.

En France, la loi sur la Biodiversité a été adoptée à l'Assemblée nationale le 8 août 2016. Le titre V (articles 37 à 46) porte sur l'accès aux ressources génétiques et aux connaissances traditionnelles associées, ainsi qu'au partage juste et équitable des avantages découlant de leur utilisation. L'article 37 met en place un dispositif réglementant l'accès aux ressources

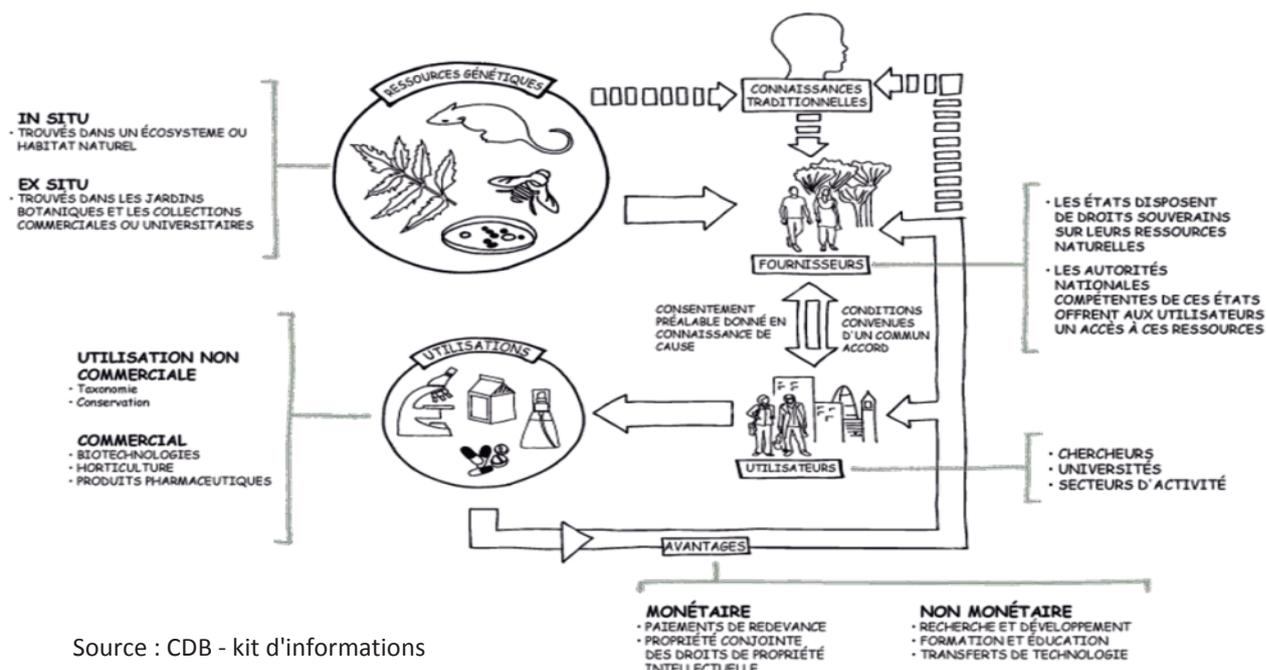
généétiques ainsi que le partage de leur utilisation ; l'article 42 insère un dispositif d'accès et de partage (APA) dans le code de la santé publique pour les ressources microbiologiques (pathogènes). Le texte ne s'applique pas aux RG prélevées en dehors du territoire sous juridiction française ou couvertes par des traités internationaux tel que le TIRPAA ou issues d'espèces modèles. La loi prévoit notamment le remboursement des sommes versées au titre de l'appui aux travaux de recherche utilisant des RG ou des CTA en cas de non-respect des obligations (Art. L. 412-16). Le texte autorise la France à ratifier le Protocole de Nagoya.

La spécificité des collectivités territoriales ultramarines est reconnue puisque les Conseils régionaux de Guadeloupe et de La Réunion, les assemblées de Guyane et Martinique et le Conseil départemental de Mayotte peuvent décider de décentraliser les fonctions de l'autorité administrative compétente. Dans ce cas, elles doivent instaurer un Comité territorial d'APA. Des règles locales s'appliquent déjà à la Collectivité d'outre-mer de Polynésie (loi du pays de janvier 2012) et à la Province Sud de Nouvelle Calédonie depuis 2009. Ainsi, la loi polynésienne s'applique aux RG conservées à l'extérieur de la collectivité. Les sanctions qu'encourent les contrevenants sont importantes.

Les conditions négociées d'un commun accord entre le fournisseur et le bénéficiaire des RG et CTA, notamment concernant l'APA, et le consentement préalable donné en connaissance de cause par le fournisseur sont de plus en plus formalisés dans des contrats appelés ATM (Accord de Transfert de Matériel) ou ATTM pour les transferts dans le cadre du TIRPAA. Dans les pays possédant une réglementation, ces conditions sont validées par une autorité compétente qui délivre le certificat de conformité internationalement reconnu ou son équivalent. Les échanges de RG sont donc devenus de plus en plus complexes. Un simple changement d'utilisation en cours de recherche oblige souvent à renouveler la procédure.

Pour les collections déjà constituées avec des RG acquises sans document spécifique avant l'entrée en vigueur de la CDB ou en l'absence de législation nationale, une incertitude juridique subsiste dès lors que le pays fournisseur adopte une législation APA.

Le schéma d'accès aux ressources et de partage des avantages est représenté figure 22.



Source : CDB - kit d'informations relatives à l'accès et au partage

Figure 22 : schéma d'accès aux ressources génétiques et de partage des avantages

2.5.2.2 - Aspects juridiques relatifs aux collections de ressources phylogénétiques de La Réunion

- Le Centre de Ressources Biologiques (CRB) VATEL

Le statut juridique des RG détenues et gérées par le CRB VATEL est différent selon les 3 groupes d'espèces : légumes lontan, aulx tropicaux et vanilliers. Seules les accessions dont le statut est connu et documenté peuvent désormais être rendues publiques et libres de diffusion dans le respect des législations internationales et nationales. Cette obligation fait partie des critères de certification des CRB selon la norme AFNOR 96.900. Ces trois collections ne font pas l'objet de documentations sur les connaissances (CTA). Toutefois, l'ouvrage « Fruits et légumes lontan » (Vincenot et Roux-Cuvelier, 2011) est une ébauche de CTA sur les espèces traditionnelles de fruits et légumes de La Réunion.

Le portail Inter-TROP regroupant les collections de RG végétales tropicales détenues par les CRB de l'INRA, du Cirad et de l'IRD est accessible en ligne sur le WEB.

(<http://www.crb-tropicaux.com/Portail>).

La collection de légumes lontan a été constituée exclusivement à partir de RG présentes sur l'île depuis de très nombreuses années (Vincenot et Roux-Cuvelier, 2011). On pense que beaucoup d'espèces ont été introduites par les différentes vagues de peuplement de l'île au XVII^{ème} et XVIII^{ème} siècle. De fait, ces RG sont considérées d'origine nationale et peuvent être conservées, utilisées et diffusées en toute légalité dans le respect des réglementations. Certaines espèces telles que le manioc ou la patate douce font partie de la liste du TIRPAA mais continuent d'être diffusées accompagnées d'un ATM Cirad. A terme, elles pourraient être versées au TIRPAA.

La collection d'aulx tropicaux est constituée essentiellement d'accessions collectées dans les années 1970-1980 par des chercheurs du Cirad. La majorité d'entre-elles est d'origine réunionnaise ou de la région Sud-Ouest de l'Océan Indien, mais ont été collectées avant l'entrée en vigueur des réglementations sur les RG. Certaines accessions dont le statut n'est pas réglementaire ne seront diffusables qu'après leur régularisation avec les fournisseurs des RG (demande d'ATM à posteriori pour des variétés d'aulx de l'île Maurice).

La collection de vanilliers présente la particularité d'avoir été mise en place après 1993 donc soumise à la réglementation CDB et d'être composée d'espèces inscrites à l'annexe 2 du CITES comme toute la famille des *Orchidaceae*. Cela implique la nécessité d'obtenir les autorisations CITES délivrées par les pays d'origine et une autorisation d'importation CITES de l'autorité française, mais également de respecter la réglementation CDB/Nagoya. Cette double exigence est une particularité car seules quelques espèces d'*Orchidaceae* dont *Vanilla planifolia* sont considérées comme agricoles. Cela implique des règles de transfert des RG spécifiques (Roux-Cuvelier et Grisoni, 2010). Un problème se pose lorsque les accessions sont obtenues à partir de fournisseurs tiers comme les jardins botaniques qui ne disposent pas toujours des autorisations des pays d'origine des ressources. Pour ces raisons, seules 24 accessions sur 70 sont disponibles pour diffusion. Un travail de régularisation du statut juridique des accessions est en cours. Sans cette information documentée les accessions ne sont pas diffusables.

- Les autres collections de RG

De nombreuses collections de travail sont détenues par le Cirad et d'autres organismes à La Réunion. Elles sont souvent essentielles à la réalisation de travaux de recherche et sont largement exploitées par la communauté scientifique de par le monde.

Parmi les ressources phylogénétiques, une des plus importantes est la collection "*Coffea*"

créée en 2004 et gérée par l'IRD et qui regroupe 31 espèces de *Coffea* représentées par 734 accessions. C'est un duplicata représentatif de la collection des caféiers africains mise en place en Côte d'Ivoire dans les années 80, en partenariat avec le CNRA (Centre National de Recherche Agronomique). Les accessions proviennent de nombreuses prospections réalisées dans différents pays africains avant la CDB, dans le cadre de la recherche internationale par l'IRD, le Cirad, et l'IBPGR (Bioversity International) avec l'accord des pays et le dépôt de duplicatas.

Le Cirad détient et gère également une importante collection microbienne composée de milliers de souches bactériennes, essentiellement des genres *Xanthomonas* et *Ralstonia*. Le statut juridique de cette collection est également complexe car les ressources proviennent de très nombreux pays et ne font l'objet d'ATM que récemment. Dans tous les cas, il conviendra de vérifier la date d'introduction dans la collection (post ou pré CDB) et la réglementation des pays d'origine avant tout usage ou fourniture de RG.

De très importantes collections d'insectes originaires de La Réunion et des pays voisins de l'océan Indien présentent les mêmes particularités. Des collections de RG sont détenues et gérées par d'autres organismes à La Réunion, notamment l'Université avec l'Herbier de La Réunion, le CBNM (Conservatoire Botanique National de Mascarin) qui détient des collections d'espèces représentant la biodiversité naturelle de l'île et en particulier les espèces endémiques. Le CHU (Centre Hospitalier Universitaire) de Saint Pierre gère une tumérothèque au sein d'un CRB récemment certifié AFNOR NF-S 96.900 qui intègre une DNathèque et un ensemble de collections biologiques d'origine humaine.

2.5.2.3 - Discussion

Sur le plan international, la mise en application des réglementations sur les RG reste à ce jour assez complexe, en particulier en l'absence de législations nationales dans de nombreux pays détenteurs ou utilisateurs de RG. La CDB, en reconnaissant la souveraineté des États sur leurs ressources génétiques, a transformé celles-ci en un bien appropriable (Thomas, 2006).

Le Protocole de Nagoya, bien qu'ayant clarifié de nombreux points, reste un document incomplet notamment en matière de définitions précises sur les connaissances traditionnelles et leur utilisation qui entrent pourtant, au même titre que les ressources génétiques, dans son champ d'application (Burelli, 2012). Les apports conceptuels sont peu nombreux et concernent surtout les ressources génétiques au détriment des connaissances traditionnelles. Le Protocole ne semble pas combler le déficit conceptuel récurrent de l'APA depuis 1992, notamment en ce qui concerne les notions de communautés autochtones et locales, de connaissances traditionnelles et d'utilisation de ces connaissances (Burelli, 2012).

Dans les faits, cela se traduit par un protectionnisme accru, d'une part des pays détenteurs de RG qui mettent en place, parfois de façon prématurée (cas de Madagascar), des systèmes juridiques contraignants pour protéger leurs ressources, d'autre part, des pays utilisateurs et firmes multinationales qui tentent de protéger les importantes collections de RG acquises depuis de nombreuses années. Cet état de fait s'avère fortement préjudiciable pour les travaux de recherche utilisant des RG en limitant les échanges et mouvements de RG entre pays. Plus globalement, l'arsenal réglementaire mis en œuvre à travers la CDB et le Protocole de Nagoya, destiné à protéger et valoriser la biodiversité des pays détenteurs de RG, pourrait avoir un effet limitant les progrès de la recherche et la mise à disposition d'innovations pour ces pays, même si la notion "d'accès facilité" pour la recherche non commerciale apparaît désormais à l'article 8 du protocole. Cette notion qui reste très imprécise (ex. distinction recherche commerciale et non commerciale alors que la recherche publique est de plus en plus liée au secteur privé) risque d'engendrer la démultiplication de régimes dérogatoires (Thomas et Filloche, 2015).

En France, depuis l'entrée en vigueur de la loi française, les collections de RG sont soumises à la réglementation internationale. Pour celles constituées avant la date d'entrée en vigueur de la loi, les procédures d'APA s'appliquent à tout accès ultérieur à cette date, mais également à toute nouvelle utilisation dans le cas d'un objectif direct de développement commercial, ce qui entraîne de facto une certaine rétroactivité mettant en péril l'utilisation ultérieure de ces RG. Par exemple, pour la création de variétés tolérantes aux stress mises à disposition des agriculteurs des pays du Sud, il faudra obtenir postérieurement la documentation pour des RG acquises parfois 50 ans auparavant, époque où celles-ci étaient libres d'accès et sans utilisation définie. Ces RG étaient le plus souvent acquises sans documentation (excepté un certificat phytosanitaire lorsqu'il était requis) auprès d'organismes qui n'existent quelquefois plus ou qui ont fortement changé (perte de documents de l'époque) et qui souvent ne répondent pas par méconnaissance des mécanismes d'APA. Sachant qu'un grand nombre de RG sont utilisées en recherche ou en sélection, l'acquisition et la diffusion de RG deviennent extrêmement compliquées.

La loi reprend les exigences européennes concernant la présentation du Certificat de conformité internationalement reconnu ou des documents et informations requis dans les cas de financement de travaux de recherche impliquant l'utilisation de RG ou CTA. À défaut, l'utilisateur devra rembourser les sommes versées. Le financement des recherches utilisant des RG acquises depuis longtemps est donc grandement remis en cause. Ces documents sont également à présenter lors du développement final d'un produit élaboré grâce à l'utilisation de RG ou CTA, auprès de l'institut National de la Propriété Industrielle (INPI) dans le cas d'une demande de brevet, ou auprès de l'autorité compétente concernée pour une demande d'autorisation de mise sur le marché. Les sanctions pour le non-respect de la loi sont très lourdes et mettent en première ligne les gestionnaires de collections.

Dès à présent, avec le règlement européen entré en vigueur le 12 octobre 2014, les utilisateurs de RG et CTA doivent négocier le partage des avantages avec le fournisseur et respecter les règles nationales APA. Un certificat de conformité internationalement reconnu doit être obtenu auprès de l'autorité compétente du pays fournisseur. A défaut, un certain nombre de documents et d'informations concernant ces RG et CTA doivent être fournis lors de contrôles, de leur transfert à des utilisateurs ultérieurs, du développement final d'un produit obtenu à partir de leur utilisation ou d'une demande de financement de travaux de recherche impliquant des RG ou CTA. En l'absence de ces documents et informations, ou si un doute subsiste sur la légalité de l'accès et de l'utilisation des RG et CTA, celle-ci doit cesser. Un registre européen des collections est établi et les parties de collections inscrites doivent respecter les règles précédentes. Les utilisateurs qui se fournissent auprès de ces collections sont réputés avoir satisfait aux exigences réglementaires et les documents sont à conserver 20 ans après la dernière utilisation. La responsabilité des gestionnaires de collection devient donc très importante.

2.5.3 - Protection des obtentions végétales et normes de production et commercialisation des semences et plants

2.5.3.1 - Éléments de contexte

Le droit de propriété intellectuelle (DPI) sur les inventions est une notion très ancienne dont les premières traces remontent au V^{ème} siècle avant J.C. dans la colonie grecque de Sybaris (UPOV, 1987 ; Feyt, 2003).

Dans le domaine du végétal, ce n'est qu'à la fin du XIX^{ème} siècle et surtout pendant le XX^{ème}

siècle, avec le développement de la génétique, que la création variétale se professionnalise avec le développement d'entreprises semencières nationales puis internationales. La création de nouvelles variétés nécessite alors des investissements de plus en plus importants que les entreprises souhaitent rentabiliser (Brady et Louafi, 2004).

L'Association Internationale des Sélectionneurs pour la Protection des Obtentions Végétales (Assinse) est créée en 1938 dans le but d'établir un système efficace de protection des nouvelles variétés végétales. Leur protection par brevet pratiquée aux USA s'avère mal adaptée à des objets qui ne sont pas aussi homogènes et stables que les produits industriels et qui peuvent être reproduits facilement (autoreproduction par graines et boutures). De plus, l'amélioration variétale est un processus continu incrémental. Les anciennes variétés permettent la création des variétés actuelles qui serviront pour obtenir les variétés futures.

En 1957 à Paris, s'est tenue la conférence diplomatique internationale pour la protection des obtentions végétales qui conduira, en 1961, à la mise en place de la Convention internationale pour la protection des obtentions végétales, par cinq pays et la création de l'Union internationale pour la Protection des Obtentions Végétales (UPOV). Les offices nationaux de l'UPOV sont alors habilités à délivrer aux obtenteurs de nouvelles variétés un droit de propriété intellectuelle, le droit d'obtenteur, qui se traduit par le Certificat d'Obtention Végétale (COV). Le droit d'obtenteur est octroyé lorsque la variété est i) nouvelle, ii) distincte, iii) homogène, iv) stable (DHS) et désignée par une dénomination appropriée. Le développement initial du système UPOV a été relativement lent (19 États membres en 1991 soit après 30 ans), mais va trouver un nouvel essor avec la création de l'OMC (Organisation Mondiale du Commerce) en 1995. Actuellement, l'UPOV regroupe 74 états membres et 2 organisations régionales, l'UE et l'OAPI.

L'obligation de développer la protection des variétés végétales dans le monde a résulté de l'accord de l'OMC sur les ADPIC (Aspects des Droits de Propriété Intellectuelle qui touchent au Commerce) entré en vigueur également en 1995. Cet accord précise notamment qu'un brevet doit pouvoir être obtenu pour toute invention de produit ou de procédé. Il précise également que les végétaux et les procédés essentiellement biologiques d'obtention de végétaux peuvent être exclus de la brevetabilité. Pour autant, les variétés végétales doivent pouvoir être protégées, soit par brevet, soit par un système sui generis efficace, soit par la combinaison des deux. Actuellement, le système sui generis le plus adopté est celui de l'UPOV alors que le brevet sur les obtentions végétales est appliqué dans certains pays tels que les USA (Plant Patent Act). La spécificité du COV par rapport au brevet provient essentiellement des exceptions au droit des obtenteurs permises par le COV. Ces exceptions permettent : i) au sélectionneur d'utiliser une variété protégée par un COV à des fins de création de nouvelles variétés, ii) l'utilisation des variétés protégées à titre expérimental iii) l'utilisation pour resemis de semences de ferme obtenues à partir de variétés protégées pour au moins 21 espèces (France) contre rémunération (loi française du 8/12/2011).

La valorisation du travail de création variétale passe inévitablement par la production et la commercialisation des semences et plants. Afin d'assurer à l'utilisateur final (agriculteur, particulier...) une qualité de produit minimale, les semences et les plants sont soumis à une certification obligatoire et officielle. Cette certification s'applique en France et sur le territoire européen. Elle garantit, pour les semences et plants, une identité et une pureté variétale, une qualité technologique (faculté germinative minimum, pureté spécifique...) et dans certains cas, une qualité sanitaire (ail, pomme de terre, fruitiers...).

En France, le Ministère de l'Agriculture a délégué la mission de contrôle officiel et de certification au service technique du Groupement National Interprofessionnel des Semences et plants (GNIS) qui porte le nom de Service officiel de contrôle et de certification (SOC). Le

cadre réglementaire français est issu de la transposition dans le droit national des directives européennes relatives à la commercialisation et à la certification des semences (Directive 2002/53/CE, Décret 81-605, Arrêté du 15 septembre 1982). Ces arrêtés définissent un règlement technique général pour la production, le contrôle et la certification des semences et des règlements techniques annexes établis par espèce ou groupe d'espèces. L'inscription au catalogue officiel est un préalable obligatoire pour la commercialisation des semences et plants. De fait, cette règle n'est pas applicable aux espèces hors catalogue.

2.5.3.2 - Mise en application des réglementations à La Réunion

A La Réunion comme en France métropolitaine, les différentes réglementations s'appliquent aux activités de création variétale, de production et de commercialisation de semences et plants. Toutefois, leur mise en œuvre dans un contexte géographique et climatique différent de celui de la métropole fait apparaître de nombreuses particularités mais aussi des difficultés et des contraintes.

- Protection des obtentions végétales

La protection des obtentions végétales à l'aide d'un COV est peu courante à La Réunion en raison d'une activité limitée en matière de création variétale et très souvent d'un marché trop restreint pour justifier les coûts de protection. Ces protections pourraient concerner des espèces tropicales telles que l'anthurium ou la canne à sucre pour lesquelles une activité de création variétale est réalisée par des pépiniéristes ou instituts techniques (eRcane).

Pour la canne à sucre, bien que l'espèce *Saccharum* L. soit éligible à la protection UPOV depuis 2006, les sélectionneurs préfèrent travailler sous contrat de production avec les utilisateurs des nouvelles variétés en raison des coûts de protection (en particulier la DHS) et de la portée géographique de la protection. En effet, les pays de l'océan Indien producteurs de sucre ne sont pas membres de l'UPOV à l'exception de l'Australie, du Kenya et de l'Afrique du Sud, rendant ainsi la protection inefficace à Madagascar ou à l'île Maurice. L'adhésion récente de la Tanzanie (11/2015) à l'UPOV et les demandes d'adhésion initiées par Maurice et l'African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) pourraient inciter l'établissement eRcane à protéger par COV les variétés exportées.

Le cas de la vanille à La Réunion est très particulier. Une activité de création et d'amélioration variétale est conduite depuis plusieurs années par le Cirad. Ces travaux utilisent largement la diversité génétique de la collection de vanilliers du CRB VATEL, permettant ainsi sa valorisation sur le plan scientifique mais aussi économique. Dans le cadre de ces travaux, une variété de *Vanilla planifolia*, dénommée "Handa" a été mise au point. Elle présente des caractéristiques intéressantes avec un fort niveau de résistance à *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis vanillae*, champignon responsable de la fusariose du vanillier (principale maladie de la vanille en culture traditionnelle) ainsi que des caractères d'indéhiscence (permettant une meilleure gestion de la récolte et évitant l'échaudage post récolte). Ce n'est que très récemment (sep.2009) que le genre *Vanilla* couvrant les 6 espèces aromatiques dont *Vanilla planifolia*, la plus importante, a été intégré à la liste des taxons de l'UPOV, à l'initiative du Mexique, pays d'origine de *Vanilla planifolia*. Le Cirad, à la demande du GEVES a largement contribué à la rédaction des principes directeurs pour la réalisation des tests de DHS. La variété Handa est la première variété au niveau mondial à faire l'objet d'une demande de COV. Les essais de DHS ont démarré début 2016. De plus, une demande de COV pour la variété d'ignon V6.17-E8 sera déposée prochainement par le Cirad.

- Production et commercialisation des semences et plants

Au début des années 2000, La Réunion était le seul département français d'outremer où une

activité de production et commercialisation de semences et plants était réalisée à partir de variétés locales ou introduites. Cette activité, à l'origine limitée et informelle et qui a pris de l'importance depuis, concerne plusieurs espèces potagères, de grandes cultures et fruitières. La Réunion se devait de rentrer dans un cadre légal et sous la supervision des autorités locales, DAAF et Préfecture, le Cirad a assuré la coordination de la mise en œuvre des réglementations européennes et françaises.

Pour répondre à la diversité des productions, différentes normes ont été mises en place (cf. partie 1 chap. 1.4.6). Toutes ont été confrontées à des particularités locales et des difficultés de mise en œuvre, principalement liées à l'inscription au catalogue officiel, préalable à l'application des normes de production et commercialisation.

Semences "standard" et plants maraîchers

Cette norme minimale concerne des espèces légumières qui ne sont pas certifiées. Elle impose le respect d'un règlement technique général et de règlements annexes qui définissent les critères et normes de production et commercialisation. La production de plants maraîchers répond à un règlement technique annexe spécifique. Elle impose également l'inscription des variétés au catalogue officiel, ce qui pose, à La Réunion des problèmes d'ordres différents.

L'éligibilité des espèces au catalogue français et européen est une des principales contraintes. En effet, on constate que de nombreuses espèces couramment cultivées en milieu tropical ne figurent pas sur la liste des espèces du catalogue officiel. Le cas des piments à La Réunion est révélateur. Trois espèces sont cultivées et font l'objet d'une production et commercialisation locale de semences, *Capsicum annuum* (piment aiguille), *Capsicum baccatum* (gros piment) et *Capsicum frutescens* (piment Martin). Or, seule l'espèce *Capsicum annuum*, qui est représentée en Europe principalement par des variétés de poivron, est éligible au catalogue. Deux espèces se trouvent donc hors catalogue et les semences ne devraient légalement pas pouvoir faire l'objet de commercialisation. Le cas de la citrouille "pays", *Cucurbita moschata* est identique. Dans le genre, seules *Cucurbita pepo* et *Cucurbita maxima* (et hybrides interspécifiques avec *moschata*) sont éligibles au catalogue.

Enfin, la quasi-totalité des espèces de légumes "lontan" à graines et tous celles à multiplication végétative (cf. annexe 14) ne sont pas éligibles au catalogue ce qui légalement, rend impossible la commercialisation des semences.

Plus généralement, ce problème se pose pour les semences d'espèces potagères introduites de pays tiers et commercialisées à La Réunion. Un certain nombre, provenant de semenciers français ou européens (Vilmorin, Clause, Nunhems BV, Enza zaden...) sont inscrites et commercialisées en toute légalité. Par contre, plusieurs espèces et variétés d'origine asiatique (Chin Long Seed, Takii, Know You Seed...) notamment des *Brassica* spp. largement utilisées comme "légumes feuilles" et faisant l'objet d'une production de plants importante (environ 10 millions/an), ne sont inscrites sur aucun catalogue. La commercialisation de ces variétés est donc interdite sur le territoire, ce qui entraîne régulièrement des contrôles chez les distributeurs de semences de la part de la DGCCRF (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes). Toutefois, de manière informelle et compte tenu de l'importance de ces espèces pour le consommateur réunionnais, une tolérance est accordée par les autorités pour la commercialisation sous réserve que les obligations sanitaires soient respectées.

En partenariat avec le GNIS-SOC, des démarches ont été entreprises auprès des firmes concernées pour demander la régularisation des variétés commercialisées à La Réunion et les autres DOM. Hormis la société Technisem, elles sont restées sans suite, principalement en raison de l'étroitesse du marché DOM français qui ne justifie pas les coûts d'inscription pour régulariser les variétés.

Un autre problème rencontré concerne les essais de DHS réalisés par le GEVES en métropole où le comportement de variétés "tropicales" peut largement différer de celui observé dans le milieu d'origine. Cela peut mettre en cause certains résultats d'essais, notamment pour la vérification de l'homogénéité des variétés. Ce problème a clairement été mis en évidence lors d'essais de DHS pour l'inscription de 2 variétés de haricot de La Réunion. Un décalage important de floraison entre plantes, supérieur à 10 jours, a été constaté sur la station du GEVES à Brion en Anjou alors qu'il n'était que de 5 jours dans les conditions de La Réunion. Les résultats d'un essai de contrôle réalisé à La Réunion, avec les témoins fournis par le GEVES, ont été retenus et ont permis l'inscription de ces 2 variétés (Marla Bourbon et Kerveguen) au catalogue. Pour la variété d'oignon V6.17 E8, le GEVES a également demandé la réalisation du second cycle de DHS à La Réunion.

Certification de semences

A La Réunion, la certification ne concerne que deux espèces faisant l'objet d'une production locale de semences, le maïs et l'ail.

A ce jour, seule la certification de semences d'ail est appliquée. Deux variétés locales ont été assainies, inscrites au catalogue officiel sur la liste "indemne OYDV" et une filière de production de semences commerciales certifiées, soumises au contrôle du SOC, est opérationnelle.

La certification de semences de maïs se heurte à plusieurs difficultés liées à l'inscription de variétés locales au catalogue officiel. Deux types de variétés sont utilisées par les agriculteurs, une variété population améliorée, Cirad 412, dans laquelle a été introgressée la résistance au MSV (*Maize streak virus*) et deux variétés hybrides 3 voies issues des programmes de sélection du Cirad. La variété Cirad 412 est utilisée par les petits paysans dans toutes les zones de l'île, les hybrides étant majoritairement utilisés pour la production d'ensilage pour l'élevage bovin. Il est aujourd'hui impossible d'inscrire Cirad 412 au catalogue officiel car les variétés population de maïs ne sont pas éligibles au catalogue (liste A), notamment en raison de leur hétérogénéité intrinsèque qui ne leur permet pas de répondre aux critères de DHS. L'ouverture de la liste C (variété de conservation) du catalogue devrait permettre d'inscrire ces populations locales. Par contre, les hybrides produits à La Réunion sont éligibles sur la liste A, mais il s'agit de matériel génétique tropical, inadapté aux conditions agro-climatiques de l'Europe, ce qui pose problème pour la réalisation des DHS même dans le sud de l'Europe. De plus, la réalisation des essais de VATE est compliquée à mettre en œuvre notamment pour le choix des témoins. Ces difficultés compromettent également l'obtention de COV sur nos variétés et la production de semences d'hybrides se fait toujours à titre expérimental sans commercialisation.

Norme CAC (*Conformitas Agraria Communitatis*)

La mise en place de la norme CAC agrumes à La Réunion résulte de la nécessité d'améliorer l'état sanitaire du matériel de départ qui affecte de manière importante la production d'agrumes. En effet, trois maladies majeures en milieu tropical sont présentes à La Réunion (cf. chap. 1.4.6.3). La certification appliquée sur les arbres fruitiers en métropole sous contrôle du CTIFL (Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes) aurait pu être mise en place à La Réunion, mais l'exigence d'inscription des variétés au catalogue rend son application impossible. Une majorité de variétés cultivées à La Réunion ne sont pas inscrites en raison de leur utilisation spécifique en milieu tropical et de coûts d'inscription trop élevés pour un marché restreint. De plus, le CTIFL, organisme certificateur en métropole ne souhaitait pas prendre en charge le contrôle dans les DOM. La norme CAC a été choisie car

elle n'impose pas l'inscription des variétés au catalogue, mais uniquement la tenue d'une liste des variétés avec leur description. Les autres règles, notamment les normes sanitaires, restent identiques à la certification et sont définies dans un règlement technique annexe « Agrumes » élaboré par le Cirad et le GNIS-SOC. Ce dernier assure le contrôle de la production de plants d'agrumes et du matériel de départ dans le respect de la norme CAC à La Réunion.

2.5.3.3 - Discussion

Concernant les normes de production et commercialisation des semences et plants, les différents exemples présentés ci-dessus soulignent l'inadéquation que peut présenter un système normatif développé par des pays du Nord, majoritairement tempérés, pour une mise en œuvre dans des pays tropicaux.

Au plan national, pour l'inscription des variétés d'espèces maraîchères et de grande culture, plusieurs contraintes pourraient être levées par l'ouverture récente, au catalogue officiel, des listes C et c "variétés de conservation" (directive 2008/62/CE et décret n81-605 article 3.1). L'inscription de variétés locales menacées d'érosion génétique sur cette liste ne nécessite pas d'examen officiel des variétés, permettant ainsi de réduire les coûts d'inscription. Cela pourrait permettre de régulariser quelques variétés de faible importance économique. Cependant, les critères de production de semences définis dans le règlement technique du contrôle des semences standard de légumes pour les variétés de conservation sont très restrictifs (cf. Arrêté du 20 décembre 2010 et « Règlement technique du contrôle des semences standard de légumes pour les variétés de conservation et les variétés sans valeur intrinsèque pour la production commerciale et destinées à des cultures particulières ») : respect de la liste des espèces éligibles au catalogue officiel ; surfaces limitées et productions maximales autorisées à l'échelle de l'État ; poids maximum de semences par unité de conditionnement. Pour exemple, la production d'oignon est limitée à 40 ha par état membre et 5 gr de semences par unité de conditionnement. La production d'aubergine est limitée à 20 ha par état et 2.5 g de semences par unité de conditionnement. Ces fortes contraintes limitent grandement l'intérêt de ces listes et seules 11 variétés sont inscrites à ce jour : sept de pomme de terre et une population de maïs sur liste C, 3 cultivars de chicorée, poireau et haricot sur liste c sont inscrites à ce jour. La variété population de maïs Cirad 412 pourrait être proposée à l'inscription sur la liste C afin de régulariser la commercialisation de la production de semences sur La Réunion.

Les systèmes de certification de semences sont très variables d'un pays à l'autre. L'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economique) recense ces systèmes de certification reconnus aujourd'hui par 58 pays⁵. Afin d'uniformiser la qualité des semences, l'ISTA regroupant 218 laboratoires dans 80 pays, a défini des règles permettant d'avoir des procédures standards d'échantillonnage et de tests de qualité de semences.

Au niveau européen, dans le cadre du processus général de révision de la réglementation européenne, un règlement semences unique (Seed Law), commun aux pays de l'UE, devait remplacer les douze directives existantes. Mais en 2014, après sept années de discussions, le Parlement européen a rejeté le règlement unique proposé par la Commission Européenne en raison de l'absence de consensus politique.

La FAO de son côté, a développé le système de Semences de Qualité Déclarée (SQD). L'objectif est de permettre aux communautés agricoles d'avoir accès à des semences de qualité à un coût moindre. Des principes directeurs ont été publiés en 1993 pour différentes espèces cultivées. En 2007, une révision des textes a permis de porter à 92 le nombre d'espèces

⁵ <https://www.oecd.org/fr/tad/code/internationalregulatoryaspectsseedtradeFR.pdf>

concernées, notamment en augmentant le nombre d'espèces tropicales. Ce système permet à des « semenciers » aux ressources limitées comme les coopératives, les groupements de paysans, les ONG, de pénétrer le marché en offrant des semences possédant une qualité contrôlée.

Sur le continent africain, diverses communautés économiques régionales, parmi lesquelles la SADC (Southern African Development Community) et la CEDEAO (Communauté Economique Des États de l'Afrique de l'Ouest) ont entrepris une harmonisation régionale des règles et réglementations relatives aux semences (OCDE, 2012).

On peut noter que certains pays, comme le Maroc, ont introduit dans leurs règlements techniques, sensiblement identiques aux règlements français, la possibilité de produire et commercialiser des semences standard sans inscription au catalogue, sous réserve de respecter certaines règles comme la déclaration et le dépôt, auprès des autorités, des variétés utilisées⁶.

Pour les espèces fruitières, des évolutions au niveau européen sont en cours et devraient permettre de clarifier et combler de nombreux vides juridiques. A partir du 1^{er} janvier 2017, l'harmonisation européenne des matériels de multiplication de plants fruitiers et des plants fruitiers destinés à la production de fruits sera effective. Dans les 27 pays membres, ils seront soumis aux mêmes critères pomologiques et sanitaires permettant une clause de libre circulation en Europe. Les travaux de cette harmonisation sont la suite logique de la directive 92/34/CEE, un premier pas vers l'harmonisation européenne. Deux types de matériel seront différenciés : le matériel CAC et le matériel certifié (CTIFL, 2014⁷).

Concernant la protection des obtentions végétales, sur le plan international et en particulier dans les PED, on constate ces dernières années que de nombreux pays ont mis en place des réglementations sur les DPI. Cela peut s'expliquer par l'adhésion des pays à la CDB et à l'OMC dont l'annexe C relative aux accords ADPIC (Aspects des Droits de Propriété Intellectuelle relatifs au Commerce) engage les parties à développer un cadre national de protection de la PI (Thomas et Filloche, 2015). L'article 27 de cette annexe qui définit l'objet brevetable et en particulier le paragraphe 3.b, reste très ambigu en permettant l'exclusion des végétaux et des animaux du champ des brevets et à l'opposé en permettant que les variétés végétales puissent être protégées par brevet !!! L'interprétation de ces articles peut conduire à la mise en place de systèmes diamétralement opposés comme illustré par Thomas et Filloche, 2015 avec les cas du Brésil, peu favorable au brevet et le Mexique qui autorise largement la brevet sur le vivant ou le Vietnam où tout est brevetable sauf ce qui rentre dans le système UPOV. On comprend alors que le système le mieux adapté à la protection des variétés végétales soit l'UPOV mais l'articulation entre brevet et COV reste très floue. Deux exemples illustrent cette ambiguïté. En 2002, un brevet est accordé à la société Plant Biosciences pour une variété de brocoli contenant des niveaux élevés de certains glucosinolates (vertus anti-cancer !). En 2003, l'Etat d'Israël obtient un brevet pour une variété de tomate à teneur réduite en eau. Ces brevets ont été attaqués par plusieurs sociétés (Unilever, Syngenta...) et, après des années de procédure, la Grande Chambre des Recours de l'OEB (Office Européen des Brevets) maintient ces brevets. Le Buanec (2016) souligne le paradoxe de cette situation : d'une part il n'est pas possible de breveter un procédé essentiellement biologique tel qu'un croisement classique en amélioration des plantes ; d'autre part, il est possible de protéger par brevet le résultat de ce croisement s'il n'est pas limité à une seule variété. Avec cette décision de la Grande Chambre de Recours de l'OEB, le brevet empiète de plus en plus sur ce qui était le champ du COV et

⁶ http://www.onssa.gov.ma/fr/images/controle_semences/certif-semenc/reglement_semences_standard.pdf

⁷ <http://www.ctifl.fr/DocPdf/Activites/Programmes/943.pdf>

cela remet gravement en cause le principe d'exemption pour les sélectionneurs défini par l'UPOV.

Une autre raison de l'accélération de la mise en place des DPI dans de nombreux pays est l'attitude des États-Unis et de l'Europe qui, ne voyant pas d'avancée significative sur l'adoption des DPI via le cadre multilatéral de l'OMC, ont décidé d'imposer ces droits par des accords bilatéraux de libres échanges (Boy, 2008). Cela a conduit à une augmentation du nombre de pays demandant leur adhésion à l'UPOV, y compris en Afrique avec l'OAPI (Organisation Africaine de la Propriété Intellectuelle) qui regroupe 17 pays essentiellement francophones et son équivalent anglophone, l'ARIPO (African Regional Intellectual Property Organization), regroupant 19 États membres. Ces pays ont ainsi renoncé à développer une loi nationale originale pour finalement adopter le système UPOV. On peut toutefois s'interroger sur la capacité de certains d'entre eux à mettre en œuvre et faire appliquer les réglementations du système UPOV.

Pour répondre à la limitation de l'accès aux RG liée au développement des DPI et des systèmes internationaux, Deibel et Kloppenburg, (2015) ont développé un concept original et novateur à l'image des logiciels libres. Il s'agirait de concevoir l'innovation variétale sous licence « Open Source ». Transposées à l'amélioration des plantes, les licences ouvertes permettraient la construction de « communs » définis comme des espaces de droits collectifs dans lesquels le matériel végétal serait disponible à ceux qui s'engagent à ne pas en limiter l'accès mais inaccessible pour ceux qui refuseraient cet engagement.

En France, directement lié aux DPI et aux réglementations, les défenseurs des semences paysannes représentés par le Réseau Semences Paysannes⁸ s'opposent à un cadre réglementaire strict et au système officiel, soutenu par l'industrie semencière et le GNIS. Ainsi, la campagne de communication « Aux graines Citoyen » lancée par la fondation « Léa Nature » en 2014 a généré des échanges virulents entre le GNIS⁹ et le Réseau semences paysannes¹⁰.

Ce chapitre fait l'objet d'une publication à soumettre.

⁸ : <http://www.semencespaysannes.org/index.php>

⁹ : <http://gnis.fr/index/action/page/id/67/cat/2/ref/1376>

¹⁰: http://semencespaysannes.org/reponses_detaillee_rsp_informati_erronees_dif_115-actu_214.php

III - PROJET PROFESSIONNEL

Dans le cadre du développement des activités du Cirad Réunion en Afrique australe et de l'Est j'envisage à court terme une mobilité dans un des pays de cette zone. Je suis intéressé en particulier par un projet porté par l'IITA (International Institute for Tropical Agriculture) en Tanzanie, ciblé sur les ressources génétiques du manioc. Ce projet a pour objectif de collecter, documenter, évaluer et préserver les variétés locales de manioc en Afrique du Sud, de l'Est et Centrale. Il s'inscrit dans un cadre global d'amélioration de la sécurité alimentaire dans les pays du Sud de l'Afrique où le manioc est une culture vivrière essentielle. Plus globalement, ce projet entre dans les thématiques couvertes par le CRP-RTB (CGIAR Research Program for Roots, Tubers and Bananas) et dans l'initiative GCP 21 (Global Cassava Partnership for the 21st Century). Il mobilise une trentaine de chercheurs titulaires de PhD et spécialistes du manioc. Dans ce cadre, la VAE « doctorat » me permettrait d'occuper un poste de responsable d'un réseau de recherche international des ressources génétiques du manioc positionné à l'IITA à Dar Es Salam (Tanzanie).

3.1 - Contexte

En Afrique sub-saharienne, le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est l'aliment de base le plus important (FAOSTAT 2014)¹¹. C'est une plante vivrière qui permet d'assurer une récolte même dans des sols peu fertiles et des conditions climatiques difficiles. Sa teneur élevée en amidon (20-40 %) en fait une source d'énergie importante en alimentation humaine et animale et présente un grand intérêt pour l'industrie (biocarburants, amidon industriel...). Cependant, en Afrique, de l'Est, centrale et australe, 90 % du manioc produit est consommé par les paysans ou vendu sur les marchés locaux. De plus, les rendements du manioc en Afrique restent faibles, de l'ordre de 8.4 t/ha en moyenne, comparativement à l'Asie où le rendement moyen en 2014 était de 21.8 t/ha (FAOSTAT 2016). Ces faibles rendements résultent de l'utilisation limitée d'intrants, mais aussi de la sensibilité des variétés clonales couramment cultivées aux principales maladies et parasites du manioc et notamment deux maladies à virus : Cassava mosaic disease (CMD) et Cassava brown streak disease (CBSD) responsables de pertes de rendement importantes. Ces deux maladies, transmises par les boutures et un homoptère, l'aleurode (*Bemisia Tabaci*), ne sont présentes qu'en Afrique, à Madagascar et dans l'archipel des Comores.

Le manioc a été introduit en Afrique au XVI^{ème} siècle par les portugais, depuis les Amériques, zone d'origine et de diversification où il est cultivé depuis plus de 7 000 ans et où la diversité génétique de l'espèce est très importante. Elias et al., 2000 ont montré que la diversité des maniocs au sein d'un seul village amérindien était comparable à celle de la core collection mondiale *ex situ* du CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Les pratiques paysannes des ethnies amérindiennes, basées sur l'utilisation combinée et raisonnée de la reproduction végétative et sexuée, contribuent à développer cette diversité. Le manioc étant une plante à reproduction végétative, l'usage de graines issues d'allofécondation est le moyen le plus efficace pour éviter l'érosion génétique et conserver le potentiel adaptatif de l'espèce. De plus, les semences de manioc peuvent rester dormantes durant plusieurs années, constituant ainsi une « banque de semences » pouvant être sollicité à tout moment et générer de la diversité génétique (Pujol et al., 2007). Les mécanismes de diversification et de sélection des variétés paysannes exploitant la biologie et la gestion des variétés par les paysans ont fait

¹¹ <http://www.fao.org/faostat/fr/#search/2014>

l'objet de nombreuses études en Amérique latine (Elias et al., 2001 ; Gillman et Erenler, 2009 ; Duputié et al., 2009 ; McKey et al., 2012).

En Afrique, les maniocs cultivés dans les pays de la zone tropicale se sont adaptés à une large gamme de sols et de conditions climatiques. L'introduction relativement récente d'un nombre limité de génotypes d'Amérique latine a néanmoins généré une diversité de variétés provenant de sélections paysannes dans des descendance issues de fécondation croisée chez cette espèce allogame (Marmey et al., 1994), pouvant impliquer des croisements interspécifiques avec *Manihot glaziovii* (Lefèvre et Charrier, 1993).

Peu d'études ont été conduites en Afrique pour comprendre l'impact des pratiques paysannes sur la diversité génétique du manioc. Des travaux menés au Gabon mettent en évidence l'effet des pratiques paysannes sur le niveau de diversité génétique en soulignant l'importance de l'usage de semences botaniques pour contrebalancer les effets négatifs de la propagation clonale sur la diversité génétique (Delêtre, 2010 ; Delêtre et al., 2016). En effet, si la propagation clonale est très efficace pour maintenir les caractéristiques des variétés sous une forme homogène et stable, les multiplications successives peuvent entraîner la perte de clones et de la sexualité contribuant à une réduction de la diversité génétique et du potentiel adaptatif de l'espèce (Balloux et al., 2003). De plus, les boutures de manioc peuvent aussi accumuler des mutations délétères au fil du temps (Delêtre, 2010). L'introduction régulière de matériel végétal issu de multiplication sexuée est un moyen efficace pour limiter la perte de diversité génétique. Elias et al. (2001) ont montré que dans les populations de manioc cultivées par les Amérindiens en Amazonie, des niveaux élevés de diversité génétique sont entretenus par l'incorporation régulière de plants de semis comme nouveaux cultivars traditionnels.

Cependant, dans une étude conduite au Ghana, Manu-Aduening et al. (2005) soulignent que la majorité des paysans ignore le rôle des graines de manioc et élimine systématiquement les pousses issues de semis. Au Bénin, Agre et al. (2016), constatent que seuls 30 % des paysans savent que les graines peuvent produire des plants et la quasi-totalité ne les utilise pas.

La diversité génétique des maniocs de la région concernée par le projet (7 pays africains) a été analysée à l'aide de 26 marqueurs SSR (Kawuki et al., 2013) sur 1401 génotypes représentant 848 landraces et 553 cultivars issus de programmes de sélection. Dans les pays concernés par l'étude, l'indice de Shannon calculé donne des valeurs comprises entre 0.95 et 1.25 alors que sur un seul site regroupant des landraces au Guyana on relève un indice de 4.293 et un indice de 4.289 dans la core collection du CIAT en Colombie (Kawuki et al., 2013). Ces résultats montrent une diversité génétique modérée et un goulot d'étranglement (bottleneck) dans la région par rapport aux zones d'origine du manioc.

Bredeson et al. (2016) considèrent que cette réduction de la diversité génétique en Afrique pourrait résulter de l'usage récurrent d'un petit nombre de génotypes comme parents des croisements dans les programmes d'amélioration variétale, en partie à cause du faible nombre de variétés paysannes ayant conservé la reproduction sexuée.

3.2 - Problématique

La Cassava brown streak disease provoque une pourriture nécrotique liégeuse des racines les rendant impropres à la consommation et à la transformation. Elle est causée par deux virus appartenant au genre *Ipomovirus* et à la famille des *Potyviridae*, le *Cassava brown streak virus* (CBSV) et l'Ugandan *cassava brown streak virus* (UCBSV) (Winter et al., 2010). Depuis 2003

cette maladie atteint des proportions pandémiques, en particulier autour de la région des grands lacs en Afrique orientale (Legg et al., 2011).

Les symptômes de la Cassava mosaic disease se caractérisent par une mosaïque jaune chlorotique avec déformation des feuilles et un retard de croissance des plants. Cette maladie est causée par au moins huit espèces de virus du genre *Begomovirus* (famille Geminiviridae). Les virus causaux de CBSD et CMD sont propagés par la mouche blanche *Bemisia tabaci* et l'utilisation des boutures de tiges infectées comme matériel de plantation.

Au fil du temps, les variétés africaines ont été sélectionnées par les agriculteurs selon des préférences locales et certaines d'entre elles ont pu évoluer aux côtés de ravageurs et de maladies locales ou introduites comme les CMD et CBSD. Ces variétés paysannes sont connues pour être souvent sensibles à ces maladies, mais elles abritent probablement des sources précieuses de résistance ainsi que des complexes de gènes adaptatifs permettant de répondre aux conditions environnementales et aux préférences des agriculteurs.

Actuellement, les programmes d'amélioration variétale intègrent une résistance à la CMD de type monogénique « CMD2 » qui a été identifiée dans les variétés locales de manioc en Afrique de l'Ouest (Rabbi et al., 2014). Des programmes d'amélioration variétale conduits par l'IITA ont permis de diffuser des variétés résistantes à la CMD, mais la résistance à la CBSD n'est pas parfaitement connue et seules quelques variétés permettent de limiter les attaques. Aucune variété ne combine efficacement la résistance aux deux virus. L'objectif le plus important des programmes d'amélioration variétale est donc de cumuler ces deux résistances dans du matériel accepté par les agriculteurs et les consommateurs.

En raison de la présence de ces 2 virus majeurs du manioc en Afrique et compte tenu des enjeux en termes de sécurité alimentaire, les mouvements de matériel végétal sont de plus en plus contrôlés, même à l'intérieur d'un même pays. En Tanzanie, les boutures de manioc, principales sources de dissémination de la CBSD sur de longues distances, ne peuvent être transportées de la zone côtière à la zone du lac Victoria sans un certificat phytosanitaire attestant leur statut exempt de virus. Au Nigéria, premier pays producteur mondial de manioc, la CBSD n'est pas présente, mais le pays reste sous la menace d'une introduction fortuite. Des mesures draconiennes de contrôles aux frontières ont été établies, interdisant l'introduction de boutures en provenance des pays situés au Sud du Nigéria où la maladie est présente ou susceptible de se développer. Ces risques de disséminations de maladies virales par le matériel végétal posent un problème majeur pour la mise en place et la gestion de collections régionales de ressources génétiques *ex situ*.

Le Centre de ressources génétiques de l'IITA, basé à Ibadan (Nigéria), détient 3 500 accessions de manioc, représentées en grande majorité par des variétés locales d'Afrique de l'Ouest. Celles-ci sont conservées au champ et aussi sous forme de vitroplants. A ce jour, seul un nombre limité (moins de 2 %) de variétés locales issues de la zone Sud et Est africaine, potentiellement contaminées par la CBSD sont conservées dans cette collection. Ces variétés sont aujourd'hui gravement menacées de disparition en raison de la pandémie des maladies à virus, mais aussi de remplacement par des variétés améliorées. Pour toutes ces raisons, il était urgent que la communauté scientifique travaillant sur le manioc puisse agir pour collecter, évaluer, identifier et préserver ce précieux matériel génétique, ainsi que les savoirs autochtones liés, permettant ainsi d'améliorer, au profit des agriculteurs, la productivité de manioc dans la région Sud, Est et Centrale de l'Afrique.

3.3 - Un projet pour la conservation des variétés locales de manioc en Afrique du Sud, de l'Est et Centrale

Un groupe de travail s'est réuni à Dar-es-Salaam (Tanzanie) en juin 2013, dans le but d'établir un programme pour la collecte, l'évaluation, la documentation et la conservation des variétés de manioc de la région Sud, Est et Centrale de l'Afrique. Cet atelier s'est tenu sous les auspices du Global Cassava Partnership for the 21st Century (GCP21) et de l'IITA, Institut membre du GCRAI, mandaté pour l'amélioration du manioc en Afrique. Il regroupait des chercheurs des dix pays participant à cette initiative (République Démocratique du Congo, Ouganda, Kenya, Tanzanie, Rwanda, Burundi, Mozambique, Madagascar, Angola et Zambie) mais aussi des spécialistes des différentes disciplines concernées par ce projet.

Le programme prévoit la mise en collection complète de ces variétés et de leurs données de caractérisation ainsi que des connaissances traditionnelles des agriculteurs. Ces variétés devront être assainies si nécessaire et reconnues exemptes de micro-organismes pathogènes pour être conservées en toute sécurité dans des banques de gènes dupliquées. Elles seront évaluées pour une utilisation dans les programmes de recherche.

Le projet est basé sur le développement de deux dispositifs de conservation de matériel génétique *in vitro*, un au National Crop Resources Research Institute (NaCRRI) en Ouganda et l'autre à l'IITA-Tanzanie, basé à Dar-es-Salaam. Ces deux centres adopteront des méthodes de travail communes en matière de méthodologies.

3.3.1 - Présentation du projet

Le projet est articulé autour de 9 actions organisées selon le schéma ci-dessous:

- Mise en place de la documentation pour l'acquisition et les échanges de matériel génétique dans le respect des règles d'échange des RG et de partage des avantages découlant de leur utilisation.
- Collecte des variétés locales et des connaissances traditionnelles associées dans les différents pays de la zone : organisation des missions de collecte de matériel génétique dans dix pays, formation à la collecte des chercheurs locaux participants. Réalisation d'enquêtes sur les connaissances traditionnelles locales et mise en place d'une base de données.
- Assainissement des variétés après indexage par NGS : contrôle sanitaire puis culture de méristèmes et thérapie du matériel collecté (appui du laboratoire de CIV d'Ibadan)
- Typage moléculaire par GBS : Etude de la diversité génétique en relation avec les généticiens de l'IITA (génotypage de toutes les accessions entrantes en collection, identification des doublons,...)
- Conservation *in vitro* et cryoconservation : création de la banque régionale de gènes à Dar Es Salam
- Caractérisation et évaluation du matériel végétal
- Partage des ressources documentaires et des connaissances associées
- Echange de matériel végétal : développement des relations avec les autorités sanitaires de Tanzanie pour faciliter l'application des procédures d'introduction et de distribution de matériel végétal.
- Analyse des connaissances traditionnelles et intégration dans les programmes d'amélioration du manioc

L'architecture du projet est synthétisée dans la figure 23.

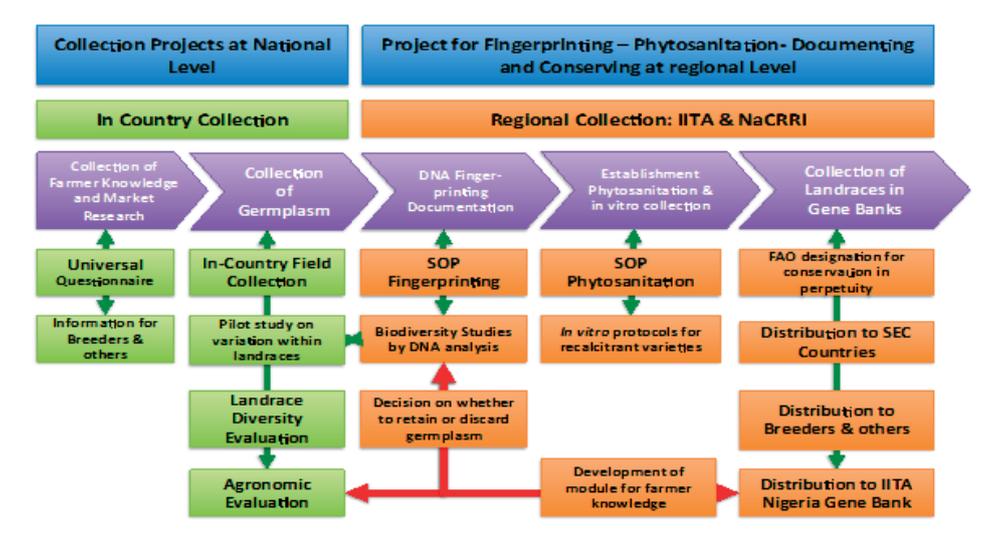


Figure 23 : représentation des différentes actions à mettre en œuvre pour la collecte, la documentation, l'évaluation et la préservation des variétés locales de manioc en Afrique du Sud, de l'Est et Centrale (Ferguson et al., 2013, non publié).

Ce projet présente un intérêt particulier en raison de sa transversalité et son approche pluridisciplinaire (génétique, physiologie, ethno-botanique, anthropologie, droit) Actuellement le projet est toujours en attente des financements nécessaires pour l'équipement du laboratoire de CIV à l'IITA Tanzanie et du démarrage des travaux de collecte. Le coût est estimé à environ 100 000 US\$. Les bailleurs visés sont le FIDA (Fonds International de Développement Agricole) et le Global Crop Diversity Trust.

3.3.2 - Apport des nouvelles technologies pour le génotypage, la détection de pathogènes et la conservation des RG

La généralisation et la réduction des coûts de génotypage à haut débit (GBS) permettent aujourd'hui d'envisager la mise en œuvre de ces techniques pour de nombreuses plantes (Elshire et al., 2011) et notamment des plantes non modèles (Peterson et al., 2014). Pour le manioc on peut citer les travaux de Bredeson et al., (2016) qui, en séquençant le génome complet de 53 accessions de manioc originaires de 4 continents ont montré une hybridation interspécifique importante entre le manioc cultivé et les espèces apparentées. Dans cette étude, la variabilité génétique des 286 cultivars africains a également été étudiée par GBS. Ces travaux confirment les résultats de Lefèvre et Charrier, (1993) qui montraient déjà, à l'aide de marqueurs isozymes, l'introgression naturelle observée entre *M.esculenta* and *M.glaziovii*. Prochnick et al, (2012) décrivent les progrès dans la connaissance du génome du manioc permise par le GBS.

L'étude de la diversité génétique des variétés paysannes en Afrique de l'Est, Centrale et Australe est un élément essentiel du projet. Deux méthodes permettant de générer des marqueurs SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) en grande quantité sont applicables : le GBS (Elshire et al., 2011) et le séquençage par RAD (Restriction-Associated DNA) (Davey et Blaxter, 2011). Il est proposé d'utiliser le GBS pour génotyper tous les clones de manioc entrant dans la banque de gènes afin d'évaluer les niveaux de variation au sein des variétés locales mais aussi d'identifier et d'éliminer les doublons. Une question se pose quant à la détermination du niveau de variation permettant de vérifier s'il existe des clones différents au sein d'une même landrace. Pour le manioc, Rabbi et al. (2015) ont montré, sur un échantillon de 917 accessions collectées dans 495 fermes au Ghana, que l'utilisation de marqueurs SNPs identifiés sur tout le génome grâce au GBS, comparée à des bibliothèques de

références existantes puis couplée à une analyse typologique complémentaire pouvait être une méthode puissante pour l'identification de la structure fine des populations et l'identification variétale.

Sur la vigne, une étude des polymorphismes SNPs a permis de distinguer cinq clones de Pinot (Carrier, 2011). Les nouvelles méthodes de séquençage de l'ADN à très haut débit permettent maintenant d'envisager le reséquençage du génome de différents individus. Cette approche a été choisie pour essayer de détecter les différences génétiques pouvant exister entre clones de vigne.¹²

Pour le projet, une réponse plus précise pourra être apportée lorsque des données sur les niveaux actuels de variation au sein des variétés locales seront réunies et analysées. Les capacités et compétences de l'IITA à Ibadan devront être mises en œuvre pour la réalisation de ces travaux de génomique.

Comme pour la diversité génétique des plantes, les NGS sont aujourd'hui de plus en plus utilisées pour explorer la diversité des agents pathogènes présents dans les plantes, en particulier pour les virus. En effet les techniques classiques de détection (ELISA, PCR, qPCR) ne permettent pas le diagnostic de virus inconnus ou de souches virales divergentes peu ou mal caractérisées (Massart et al., 2014). Cette technologie repose sur 3 étapes clefs : la préparation des échantillons en vue du séquençage (création des librairies), la multiplication clonale des librairies préparées et le séquençage massif des librairies amplifiées. Elle permet d'établir une carte d'identité sanitaire des accessions à travers un inventaire complet des virus présents dans la plante, mais nécessite une analyse fine des données pour établir la pathogénicité des séquences virales détectées (appartenance à des virus connus ou pas). Cette technique a aussi permis de mettre en évidence plusieurs nouveaux virus avec la question de savoir quels impacts (négatifs ou positifs ?) pourraient avoir ces virus sur la santé des plantes (Roossinck et al., 2015).

En parallèle, le développement de nouveaux outils de diagnostic rapide au champ tels que les Immunostrip, les LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) ou RT-LAMP pour les virus à ARN tels que les CBSVs (Tomlinson et al., 2013), devra être mise en œuvre dans le projet. Cette dernière technique présente un réel intérêt, même par rapport à des techniques récentes comme la RT-PCR (Reverse Transcriptase – PCR) (Jeong et al., 2015 ; Budziszewska et al., 2016). Une autre technique pourra être envisagée, la RPA (Recombinase Polymerase Amplification), qui permet d'obtenir un résultat avec des temps de réponse très courts, inférieurs à 30 min (Boonham et al., 2014).

L'utilisation de techniques de génotypage à haut débit génère des quantités très importantes de données qui nécessitent la gestion des bases de données et des analyses bio-informatique et statistique qui sont essentielles pour la fiabilité et la pertinence des résultats. Les équipements de l'IITA à Ibadan (cluster de calculs) doivent permettre de répondre à cette demande. A cela s'ajoutent les données de caractérisation morphologique et de phénotypage classiques. Une réflexion devra être rapidement engagée avec des bio-informaticiens pour la gestion et la sécurisation de ces données (utilisation de sauvegardes délocalisées, iCloud...).

Au niveau de la conservation et de la sécurisation des accessions collectées, la cryoconservation pourrait être généralisée. Dumet et al., (2013) ont déjà montré l'efficacité de la technique de droplet-vitrification avec des taux de reprise de méristèmes issus de

¹² <https://www.vignevin-sudouest.com/publications/fiches-pratiques/ampelographie-moleculaire.php>

vitroplants de 79 % après cryoconservation. De nouvelles méthodes utilisant les techniques de V-Cryo et D-Cryo plates, utilisées avec succès sur la pomme de terre, la canne à sucre et la menthe (Yamamoto et al., 2012, 2015 ; Rafique et al., 2015), pourraient être testées et optimisées pour le manioc. Ces travaux pourront s'appuyer sur l'expérience de la banque de gènes de l'IITA à Ibadan qui a testé avec succès la méthode V-cryo plate sur manioc (Gueye et al., 2016). La cryoconservation pourrait également être appliquée dans le processus d'assainissement des variétés paysannes.

Au niveau du projet, il apparaît essentiel de mieux comprendre l'impact des pratiques paysannes sur la diversité des maniocs et la dynamique des maladies épidémiques. Si quelques études réalisées montrent que la multiplication sexuée est prise en compte dans la gestion des variétés paysannes en Amérique, aucune donnée publiée n'est disponible pour les pays africains concernés par le projet. Les campagnes de collectes qui seront organisées doivent associer les sciences sociales pour des enquêtes permettant d'améliorer ces connaissances. Les méthodologies employées pourront s'appuyer sur les nombreux travaux conduits avec les ethnies amérindiennes (cf. chap. 3.1). Les travaux de Delêtre (2010), Delêtre et al. (2016) réalisés au Gabon et de Manu-Aduening et al. (2005) au Ghana peuvent servir de base méthodologique de travail. Une meilleure compréhension des facteurs sociaux et connaissances traditionnelles qui guident les pratiques paysannes et leur prise en compte dans les programmes de sélection participative devraient améliorer l'acceptabilité de variétés sélectionnées avec les paysans.

3.3.3 - Mise en place de règles de transfert et de partage des ressources génétiques et des connaissances traditionnelles associées.

Les questions relatives aux règles d'APA doivent impérativement être prises en compte dans ce projet. De nombreux échanges de RG doivent avoir lieu entre les pays participants et l'IITA en Tanzanie, mais aussi avec le NaCRRI (National Crops Resources Research Institute) en Ouganda. Tous les pays étant membres du TIRPAA et le manioc étant inscrit sur l'annexe 1, l'usage de l'ATTM paraît le plus approprié pour normaliser les échanges de RG. En cas de valorisation commerciale, l'ATTM intègre dans les accords de partage des avantages un versement monétaire au mécanisme établi par l'Organe Directeur. Concernant ce projet, cette question ne devrait pas se poser compte tenu qu'il n'est pas prévu, à priori, d'exploitation commerciale du manioc et que l'on reste dans le cadre d'activités de recherche.

La question des APA est plus complexe avec la prise en compte des connaissances (CTA) qui sont essentielles dans ce projet. L'ATTM ne fait pas référence aux CTA. Il reviendra donc aux partenaires du projet de s'imposer une déontologie et de définir les conditions de l'utilisation des CTA en s'appuyant sur les législations nationales. Au niveau des pays membres du projet, seuls deux pays, le Kenya, et l'Ouganda ont mis en place des textes législatifs relatifs au protocole de Nagoya, incluant les CTA¹³. Un troisième pays, le Burundi a également élaboré une stratégie nationale et un plan d'action, mais sans législation. Pour garantir un juste retour des bénéfiques aux communautés autochtones, le partage d'avantages non monétaires devrait être privilégié.

Une autre question qui pourrait se poser est le statut juridique des composants non connus inclus dans les RG tels que des séquences virales ou virus qui pourraient être révélées à posteriori par les analyses NGS. Ces éléments, qui pourraient faire l'objet de valorisation commerciale (par ex. kits de détection de viroses) devraient être clairement spécifiés comme des éléments constitutifs des RG et soumis aux mêmes règles d'APA.

¹³ <https://absch.cbd.int/search/nationalRecords?schema=measure>

IV - CONCLUSION GÉNÉRALE

Les différents projets présentés dans ce dossier de VAE reflètent une partie des activités de recherche que j'ai exercées au Cirad à La Réunion. Au fil du temps et compte tenu de l'évolution continue de mon poste, j'ai acquis de nombreuses compétences en génétique – amélioration des plantes et pathologie qui ont renforcé ma position de chercheur « généraliste » dans le domaine de la conservation et de la valorisation des RGV. Ces compétences sont aujourd'hui appliquées à un nombre important d'espèces tropicales, essentiellement maraîchères et vivrières.

En termes de productions scientifiques, mon positionnement à l'interface entre la recherche amont et le développement m'a conduit à mener des recherches finalisées, directement utilisables et valorisables telles que la sélection de nouvelles variétés, la mise en place d'un CRB ou la mise en œuvre de la certification de matériel végétal. Ces travaux n'ont pas favorisé une production scientifique classique, évaluée sur des critères de publication dans des revues de rang A à facteur d'impact le plus élevé possible. Cependant, ces activités ont été encouragées et reconnues comme essentielles lors des différentes évaluations de notre unité par le HCERES.

En raison de ma formation, de mon parcours professionnel et conforté par mon appartenance à une UMR axée sur la santé végétale, je suis très attaché et sensible aux questions de qualité et de statut sanitaire des RGV. Cela se traduit par un positionnement de mon poste au sein de notre unité à l'interface entre la génétique et la pathologie végétale. J'ai pu ainsi renforcer mes connaissances en protection des plantes, notamment en étant associé à des travaux de recherche, principalement en virologie et bactériologie.

A ce sujet et considérant le microbiote et en particulier le virome comme des éléments constitutifs des RGV, je m'intéresse à l'utilisation des outils de métagénomique et aux perspectives offertes par les NGS pour une analyse globale de l'état sanitaire du matériel végétal. L'intégration de matériel génétique vivant, potentiellement pathogène, aux RGV, doit poser la question de la connaissance du statut sanitaire de ces ressources. En effet, la diffusion d'accessions non contrôlées pourrait avoir de lourdes conséquences en termes d'invasion biologique en cas d'introduction de nouveaux pathogènes dans un milieu indemne. La prise en compte de cette question va entraîner également une augmentation sensible des coûts de conservation alors que le financement des collections de RGV est déjà un problème récurrent pour tous les organismes en charge de la conservation. De plus, cette question risque de complexifier les règles d'échanges et de diffusion des RGV déjà très contraignantes.

Enfin, concernant les PMA (Pays les Moins Avancés) qui restent mon centre d'intérêt, un long chemin reste encore à parcourir pour reconnaître aux paysans leur rôle dans la gestion des variétés paysannes locales et garantir aux agriculteurs un accès facilité à des semences et des plants de qualité, répondant spécifiquement à leurs attentes. Pour ce faire, il est nécessaire d'explorer plus largement la diversité génétique des plantes alimentaires, cultivées ou non, avec un objectif de valorisation durable des ressources dans un contexte de développement de l'agro-écologie. Cette approche est parfaitement intégrée aux axes du Plan d'action « semences et agriculture durable 2015 – 2019¹⁴ » du Ministère Français de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt. Parmi les 6 axes du plan, l'axe 1 « Structurer la conservation des ressources phytogénétiques », et l'axe 2 « Favoriser une innovation au service de l'agro-écologie dans le secteur des semences et plants » soulignent l'intérêt stratégique de la

¹⁴ : <http://agriculture.gouv.fr/plan-semences-et-plants-pour-une-agriculture-durable>

préservation des RGVA et leur valorisation découlant d'activités de recherche associées. Ce concept doit être dès à présent appliqué aux PMA les plus sensibles aux risques liés aux changements globaux.

A travers la formation et l'encadrement de jeunes chercheurs, notamment des PMA, j'espère pouvoir encore, durant quelques années, transmettre mon expérience et mes connaissances, contribuant ainsi à développer de nouvelles activités et mieux valoriser l'extraordinaire diversité de nos plantes alimentaires dans le respect de nos environnements fragiles et menacés.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abahmane L. (2011). Date Palm Micropropagation via Organogenesis. In Date Palm Biotechnology. Eds Shri Mohan Jain, Jameel M. Al-Khayri and Dennis V. Johnson, Springer Netherlands, pp. 69-90.
- Agre A.P., Badara G., Adjatin A., Dansi A., Bathacharjee R., Rabbi Y., Dansi M., Gedil M. (2016). Folk taxonomy and traditional management of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) diversity in southern and central Benin. International Journal of Innovation and Scientific Research 20 (2): 500-515.
- Alan A.R., Wansang L., Mutschler M.A., Earle E.D. (2007) Complementary strategies for ploidy manipulations in gynogenic onion (*Allium cepa* L.). Plant Science 173 (1): 25-31.
- Alves-Pereira A., Clement C.R., Picanço-Rodrigues D. (2012). Genetic divergence among populations and accessions of the spineless peach palm from Pampa Hermosa landrace used in the heart-of-palm agribusiness in Brazil. Genetics and Molecular Biology 35 (2): 474-479.
- Arias O., Huete F. (1983). Vegetative propagation in vitro of pejobaye (*Bactris gasipaes* HBK). Turrialba 33: 103-108
- Atiama M., Nourry J. (2010). Mise au point de protocoles de cryoconservation pour les espèces de la collection du CRB VATEL de La Réunion. Mémoire Master 1 BEST, Université de La Réunion, Mention Biodiversité & Ecosystèmes cultivés, 40 p.
- Baek H.J., Kim H.H., Cho E.G., Chae Y.A., Engelmann F. (2003). Importance of Explant Size and Origin and of Preconditioning Treatments for Cryopreservation of Garlic Shoot Apices by Vitrification. Cryoletters 24(6): 381-388.
- Balloux F., Lehmann L., de Meeûs T. (2003). The Population Genetics of Clonal and Partially Clonal Diploids. Genetics 164: 1635-1644.
- Bohanec B. (2002). Doubled-haploids Onions. In *Allium Crop Science: recent advances*. (H.D. Rabinovitch & L. Currah, eds). CAB International, Wallingford, U.K. pp. 145-157
- Bonnel E., Demarly Y., Essad S. (1983). Evolution anatomique des tissus foliaires de canne à sucre (*Saccharum* spp.) cultivés in vitro. Canadian Journal of Botany 61: 830-836.
- Bonner F.T. (2008). Storage of seeds, The Woody Plant Seed Manual chap 4. Government Printing Office – 1 223 p.
- Boonham N., Kreuze J., Winter S., van der Vlugt R., Bergervoet J., Tomlinson J., Mumford R. (2014). Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. Virus Research 186 (24): 20-31
- Boulineau F., Brand R., Chauvet M., Chesnel A., Foury C., Kahane R., Messiaen C-M., Schweisguth B., Seisson G. (2006). L'oignon. In : Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. C. Doré et F. Varoquaux, coord., INRA éditions, collection Savoir-faire, Paris, pp. 481-493
- Boungnong C. (2007). Mise au point d'une méthode de multiplication in vitro du péjobaye (*Bactris gasipaes* Kunth) par embryogenèse somatique. Mémoire de Master 2 Bioressources en régions tropicales et méditerranéennes. Université Paris XII. 60 p.
- Bowman M. (2014). Onion variety Dulciana. Patent application number N°:US 2014/0007274 A1

- Boy L. (2008). L'évolution de la réglementation internationale : vers une remise en cause des semences paysannes ou du privilège de l'agriculteur. *Revue internationale de droit économique* 2008/3 (t. XXII, 3), 293-313. DOI 10.3917/ride.223.0293
- Brady N., Louafi S. (2004). La Convention sur la diversité biologique à la croisée de quatre discours. *Idées pour le débat (Les rapports de l'Iddri n°3)*. Ressources Naturelles 14/2004. 32 p.
- Bredeson J.V., Lyons J.B., Prochnik S.E., Wu G.A., Ha C.M. and al. (2016). Sequencing wild and cultivated cassava and related species reveals extensive interspecific hybridization and genetic diversity. *Nature biotechnology* 34 (5): 562-571. DOI:10.1038/nbt.3535
- Brison M., de Boucaud M.T., Pierronnet A., Dosba F. (1997). Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. of *Prunus* rootstock experimentally infected with Plum Pox Potyvirus. *Plant Science* 123: 189-196.
- Broschat T.K. (2013). Palm Morphology and Anatomy. Document ENH1212, Environmental Horticulture Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Budziszewska M., Wieczorek P., Obrepalska-Stepłowska A. (2016). One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of tomato torrado virus. *Arch Virol*. 161: 1359-1364. DOI 10.1007/s00705-016-2774-2
- Buffard-Morel J., Verdeil J-L., Pannetier C. (1992). Embryogenèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir d'explants foliaires : étude histologique. *Canadian Journal of Botany* 70: 735-741.
- Burelli T. (2012). Faut-il se réjouir de la conclusion du protocole de Nagoya ? *Revue juridique de l'environnement* 37: 45-61.
- Cardoso A.I.I., da Costa C.P. (2003). Selection for bulb maturity in onion. *Scientia Agricola* 60 (1): 59-63.
- Carrier G. (2011). Bases moléculaires de la variation clonale chez la vigne (*Vitis vinifera* L.), approche pangénomique. Thèse de Doctorat. Ecole doctorale SIBAGHE, Montpellier SupAgro, 138 p.
- Charrier A., Lourd M., Pernes J. (1984). La conservation des ressources génétiques. In *Gestion des ressources génétiques des plantes*. Tome 2 : Manuel. J. Pernes. CTA – Technique et documentation – LAVOISIER, pp. 193-233.
- Chin H.F., Quek P., Sinniah U.R. (2013). Seed Banks for Future Generation. In *Conservation of Tropical Plant Species*: Normah, M.N., Chin, H.F., Reed, Barbara M. (Eds.), pp. 43-63.
- Clement C.R., Manshardt R.M. (2000). A review of the importance of spines for pejibaye heart-of-palm production. *Scientia Horticulturae* 83: 11-23.
- Clement C.R., de Cristo-Araújo M., d'Eeckenbrugge G.C., Alves Pereira A., Picanço-Rodrigues D. (2010). Origin and Domestication of Native Amazonian Crops. *Diversity* 72-106. DOI:10.3390/d2010072
- Cramer C.S. (2015). "NuMex Allure" onion. *HortScience* 11: 1735-1738.
- Currah L. (2002). Onions in the tropics: Cultivars and country reports. In *Allium crop science: recent advances* (H.D. Rabinovitch & L. Currah, eds). CAB International, Wallingford, UK. pp. 379-407.
- Davey J.W., Blaxter M.L. (2011). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in functional genomics* 9 (5): 416-423.

- Dhatt A.S., Thakur P. (2014). Production of doubled haploids in onion: A review. *Journal of Horticultural Science* 9 (2): 107-112.
- Deibel E., Kloppenburg J. (2015). L'innovation variétale sous licence Open Source. Comment maintenir des « communs » en amélioration des plantes. In *Le pouvoir de la biodiversité. Néolibéralisation de la nature dans les pays émergents*. 292 p. Editions Quae, pp. 179-192.
- Delêtre M. (2010). The ins and outs of manioc diversity in Gabon, Central Africa: A pluridisciplinary approach to the dynamics of genetic diversity of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). Trinity College Dublin, Thèse PhD, 364 p.
- Delêtre M., Hodkinson T.R., McKey D. (2016). Perceptual selection and the unconscious selection of 'volunteer' seedlings in clonally propagated crops: an example with African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) using ethnobotany and population genetics. *Genetic Resources and Crop Evolution* 1-16. DOI 10.1007/s10722-016-0390-3
- Dulloo M.E., Ebert A.W., Dussert S., Gotor E., Astorga C., Vasquez N., Rakotomalala J.J., Rabemiasara A., Eira M., Bellachew B., Omondi C., Engelmann F., Anthony F., Watts J., Qamar Z., Snook L. (2009). Cost Efficiency of Cryopreservation as a Long-Term Conservation Method for Coffee Genetic Resources. *Crop Science* 49: 2123-2138.
- Dumet D., Diebiru E., Adeyemi A., Akinyemi O., Gueye B., Franco J. (2013). Cryopreservation for the 'in perpetuity' conservation of yam and cassava genetic resources. *CryoLetters* 34 (2): 107-118.
- Duputié A., Massol F., David P., Haxaire C., McKey D. (2009). Traditional Amerindian cultivators combine directional and ideotypic selection for sustainable management of cassava genetic diversity. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 1317-1325. DOI:10.1111/j.1420-9101.2009.01749.x
- Dussert S., Chabrillange N., Engelmann F., Anthony F., Hamon S. (1997) Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: Importance of the precooling temperature. *CryoLetters* 18: 269-276.
- Dussert S., Engelmann F., Noirot M. (2003). Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters* 24: 149-160.
- Dussert S., Engelmann F. (2006). New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. *CryoLetters* 23: 169-178.
- Duval Y., Engelmann F., Durand-Gasselin T. (1995). Somatic Embryogenesis in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). In *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*. Volume 30 of the series *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Ed. Professor Dr. Y. P. S. Bajaj. Springer Berlin Heidelberg, pp. 335-352.
- Elias M., Panaud O., Robert T. (2000). Assessment of genetic variability in a traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) farming system, using AFLP markers. *Heredity* 85: 219-230.
- Elias M., Penet I., Vindry P., Mckey D., Panaud O., Robert T. (2001). Unmanaged sexual reproduction and the dynamics of genetic diversity of a vegetatively propagated crop plant, cassava (*Manihot esculenta* Crantz), in a traditional farming system. *Molecular Ecology* 10: 1895-1907.
- El-Shafie M.W., Davis J.N. (1967). Inheritance of bulb color in the Onion (*Allium cepa* L.). *Hilgardia* 38 (17): 607-622.

- Elshire R.J., Glaubitz J.C., Sun Q., Poland J.A., Kawamoto K., Buckler E.S., Mitchell S.E. (2011). A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE* 6(5): e19379. DOI:10.1371/journal.pone.0019379
- Engelmann F., Engels J. M. M. (2002). Managing plant genetic diversity. Wallingford and Rome, CAB International and IPGRI, pp. 89-104.
- Engelmann F. (2004). Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 40 (5): 427-433.
- Engelmann F., Dussert D. (2013). Cryopreservation. In M.N. Normah & al (eds), *Conservation of Tropical Plant Species*. Springer science, New York, pp. 107-119.
- Esser R.P., Meredith J.A. (1987). Red ring nematode. *Nematology Circular of the Florida Department of Agriculture and Consumer Services* 141, Division of Plant Industry, Gainesville.
- Falque M. (2011). Evolution des méthodes de génotypage. *Le Sélectionneur Français* 62: 3-16.
- FAO. (1992). Guide de manipulation des semences forestières dans le cas particulier des régions tropicales, 444 p.
- FAO. (1994). Neglected Crops 1492 from a different perspective. *FAO Plant Production and Protection* No.26, 348 p.
- FAO. (1997). Report on the Inter-Centre Review of Root and Tuber Crops Research in the CGIAR. TAC secretariat Food and Agriculture Organization of the United Nations, 56p.
- FAO. (2010). The Second Report on the state of the world's - Plant Genetic Resources for Food and Agriculture, 370 p.
- FAO. (2014). Normes applicables aux banques de gènes pour les ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture. Edition révisée. Rome, 167 p.
- Fayos O., Vallés M.P., Garcés-Claver A., Mallor C., Castillo AM. (2015). Doubled haploid production from Spanish onion (*Allium cepa* L.) germplasm: embryogenesis induction, plant regeneration and chromosome doubling. *Frontier Plant Science* 6: 384. DOI: 10.3389/fpls.2015.00384
- Feyt H. (2003). Intellectual Property Rights on varieties and access to plant genetic resources: towards a coherent and an ethically based approach. *Plant Genetic Resources* 1(2-3): 97-102. DOI: 10.1079/PGR200316
- Fki L., Masmoudi R., Kriaâ W., Mahjoub A., Sghaier B., Mzid R., Mliki A., Rival A., Drira N. (2011). Date Palm Micropropagation via Somatic Embryogenesis. In book: *Date Palm Biotechnology*, S.M. Jain et al. (eds.), pp. 47-68.
- Foury C., Schweisguth B. (1992). L'oignon. In : Gallais A. et Bannerot H., (éds). *Amélioration des espèces végétales cultivées*, INRA Edition, Paris, pp. 406-419.
- Gallais A. (2011). *Méthodes de création des variétés en amélioration des plantes*. Editions Quæ, Versailles, 280 p.
- Galluzzi G., Halewood M., Noriega I.L., Vernooy R. (2016). Twenty-five years of international exchanges of plant genetic resources facilitated by the CGIAR genebanks: a case study on global interdependence. *Biodiversity and Conservation* 25: 1421.
- Gashua I.B., Simon S.Y., Bashir L.U., Kadams A.M. (2013). Inheritance studies of some quantitative traits in onion (*Allium cepa* L.). *International Journal of Biosciences* 3 (4): 135-141.

- Gillman M., Erenler H. (2009). The genetic diversity and cultural importance of cassava and its contribution to tropical forest sustainability. *Journal of Integrative Environmental Sciences* 6 (3): 189-200. DOI: 10.1080/19438150903090509
- González A.M.I., Herrera V.P. (2012). Valinia inia, a new early storage onion variety for central south Chile. *Chilean journal of agricultural research* 72(1).
- González-Arno M.T., Lazaro-Vallejo C.E., Engelmann F., Gamez-Pastrana R., Martinez-Ocampo Y.M., Pastelin-Solano M.C., Diaz-Ramos C. (2009). Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 45 (5): 574-582.
- González-Arno M.T., Lazaro-Vallejo C.E., Valencia M.G., Ortiz Patraca N.M., Tex-cahua Martinez H. (2010). Adjustment of cryoprotective conditions for vanilla (*Vanilla planifolia*) shoot-tips subjected to a droplet-vitrification protocol. *Cryobiology* 61, 362-408.
- Gourc D., Monnier D., Payet J-D. (2007). OIGNON Guide pratique Ile de La Réunion. ARMEFLHOR, 92 p.
- Gueye B., Akinyemi O. A., Olagunju M., Adeyemi A., Abberton M. (2016). On the forefront of the yam (*Dioscorea* spp.) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cryopreservation long journey. Conférence prononcée au World Congress on Root and Tuber Crops (WCRTC). Jan 18-23, 2016, Nanning, Guangxi, China.
- Haydar A., Sharker N., Ahmed M.B., Hannan M.M., Razvy M.A., Hossain M., Hoque A., Karim R. (2007). Genetic Variability and Interrelationship in Onion (*Allium cepa* L.). *Middle-East Journal of Scientific Research* 2 (3-4): 132-134.
- Habib A., Biswas S., Siddique A.H., Manirujjaman M., Uddin B. et al. (2015). Nutritional and Lipid Composition Analysis of Pumpkin Seed (*Cucurbita maxima* L.). *Journal of Nutrition and Food Science* 5: 374.
- Hee Shin J., Kyoong Kang D., Keun Sohn J. (2013) Production of Yam Mosaic Virus (YMV)-Free *Dioscorea Opposita* Plants by Cryotherapy of Shoot-Tips. *Cryoletters* 34 (2): 149-157(9).
- Helliot B., Panis B., Poumay Y., Swennen R., Lepoivre P., Frison E. (2002) Cryopreservation for the elimination of Cucumber Mosaic and Banana Streak Viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Reports* 20: 1117-1122.
- Heringer A.S., Steinmacher D.A., Fraga H.P.F., Vieiraa L.N., Montagna T., Quinga L.A.P., Quoirin M.G.G., Jiménez V.M., Guerra M.P. (2014). Improved high-efficiency protocol for somatic embryogenesis in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth) using RITA (R) temporary immersion system. *Scientia Horticulturæ* 179: 284-292.
- Hernandez-Ramirez F., González-Arno M.T., Cruz-Cruz C.A., Pastelin-Solano M.C., Engelmann F. (2014). Comparison of different preconditioning and loading treatments with vanilla (*Vanilla planifolia* jack.) apices cryopreserved using the droplet-vitrification procedure. *Acta Hort.* 1039: 22.
- Hoarau J., Boyer C., Vital K., Chesneau T., Vernière C., Roux-Cuvelier M., Pruvost O., Moreau A., Hostachy B., Yahaya N., Abdoul-Karime A.L. (2013). First Report of *Xanthomonas citri* pv. citri-A Causing Asiatic *Citrus* Canker in Mayotte. *Plant disease* 97 (7): 989.
- Hyde P. T., Earle E. D., Mutschler M.A. (2012) Doubled Haploid Onion (*Allium cepa* L.). lines and their impact on hybrid performance. *HortScience* 47(12): 1690-1695.

- Jaligot E., Rival A., Beulé T., Dussert S., Verdeil J.L. (2000). Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports* 19: 684-690. doi:10.1007/s002999900177
- Jaligot E., Adler S., Debladis E., Beulé T., Richaud F., Ilbert P., Finnegan E.J., Rival A. (2011). Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany* 108: 1453-1462. doi:10.1093/aob/mcq266
- Jeong J., Cho S-Y., Lee W-H., Lee K-J., Ju H-J. (2015). Development of a Rapid Detection Method for Potato virus X by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Plant Pathology Journal* 31(3): 219–225. DOI: 10.5423/PPJ.OA.03.2015.0044
- Kamenetsky R., Rabinovitch H.D. (2002). Florogenesis. In *Allium* crop science: recent advances (H.D Rabinovitch & L. Currah, eds). CAB International, Wallingford, U.K. pp 31 - 58.
- Karun A., Siril E.A., Radha E., Parthasarathy V.A. (2004). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaf and inflorescence explants of arecanut (*Areca catechu* L.). *Current Science* 86 (12): 1623-1628.
- Kawuki R.S, Herselman L., Labuschagne M.T., Nzuki I., Ralimanana I., Bidiaka M., Kanyange M.C., Gashaka G., Masumba E., Mkamilo G., Gethi J., Wanjala B., Zacarias A., Madabula F., Ferguson M.E. (2013). Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces and cultivars from southern, eastern and central Africa. *Plant genetic resources: Characterization and utilization* 11 (2): 170-181
- Keller E.R.J., Korzum L. (1996). Haploidy in onion (*Allium cepa* L.) and other *Allium* species. In: *In vitro* haploid production in higher plants. Vol 3. Jain S.M., Sopory S.K. and Veilleux R.E. (eds.). Springer Science and Business Media, B.V. Netherlands, pp. 51-75
- Keller E.R.J., Kaczmarczyk A., Senula A. (2008). Cryopreservation for plant genebanks - a matter between high expectations and cautious reservation. *Cryoletters* 29 (1): 53-62(10)
- Keller E.R.J., Zanke C.D., Senula A., Breuing A., Hardeweg B., Winkelmann T. (2013). Comparing costs for different conservation strategies of garlic (*Allium sativum* L.) germplasm in genebanks. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60: 913-926
- Keller E. R. J., Grübe M., Hajirezaei M.R., Melzer M., Mock H.P., Rolletschek H., Senula A., Subbarayan K. (2016). Experience in large-scale cryopreservation and links to applied research for safe storage of plant germplasm. In: Lambardi M, Hamill S (Eds.): *Proceedings of the XXIX IHC - Int. Symp. on Micropropagation and In vitro Techniques*, Brisbane, Australia, August 17-22, 2014. *Acta Horticulturae* 1113: 239-249
- Kerdsuwan S., Te-chato S. (2016). Direct Somatic Embryo Formation from Roots of In vitro-Seedlings of Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.). *Walailak Journal of Science & Technology* 13(1): 45-53.
- Kerr W.E., Clement C.R. (1980). Práticas agrícolas de consequências genéticas que possibilitaram aos índios da amazonia um melhor adaptação às condições ecológicas da região. *Acta Amazonica* 10: 251-266.
- Kim H.H, Cho E.G., Baek H.J., Kim C.Y., Keller E.R.J., Engelmann F. (2004). Cryopreservation of garlic shoot tips by vitrification: Effects of dehydration, rewarming, unloading and regrowth conditions. *Cryo letters* 25(1): 59-70.
- Kim H.H., Lee J.K., Hwang H.S., Engelmann F. (2007). Cryopreservation of garlic germplasm collections using the droplet-vitrification technique. *Cryo Letters* 28(6): 471-82.

- Kim H.H., Lee Y.G., Park S.U., Lee S.H., Baek H.J., Cho E.G., Engelmann F. (2009). Development of alternative loading solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters* 30 (3): 291-299
- Kim H.H., Lee Y.G., Shin D.J., Ko H.C., Gwag J.G., Cho E.G. & Engelmann F. (2009). Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures. *CryoLetters* 30 (5): 320-334.
- Kim H.H., Popova E., Shin D.J., Yi J.Y., Kim C.H., Lee J.S., Yoon M.K., Engelmann F. (2012) Cryobanking of korean allium germplasm collections: results from a 10 years experience. *CryoLetters* 33 (1): 45-57.
- Le Buanec B. (2016). Les cas Tomate et Brocoli : un tournant dans la législation de l'innovation variétale. *La revue de l'Académie d'agriculture* 9: 24-29.
- Lefèvre F., Charrier A. (1993). Isozyme diversity within African *Manihot* germplasm. *Euphytica*, 66: 73-80.
- Legg J.P., Jeremiah S.C., Obiero H.M., Maruthi M.N., Ndyetabula I., Okao-Okuja G. et al. (2011). Comparing the regional epidemiology of the Cassava Mosaic and Cassava Brown Streak Virus pandemics in Africa. *Virus Research* 159: 161-170. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.04.018.
- Listabarth C. (1996). Pollination of *Bactris* by *Phyllotrox* and *Epurea*. Implications of the Palm Breeding Beetles on Pollination at the Community Level. *Biotropica* 28 (1): 69-81.
- Luthar Z., Bohanec B. (1999). Induction of direct somatic organogenesis in onion (*Allium cepa* L.) using a two-step flower or ovary culture. *Plant Cell Reports* 18: 797-802
- Manu-Aduening J.A., Lamboll R.I., Dankyi A.A., Gibson R.W. (2005). Cassava diversity in Ghanaian farming systems. *Euphytica* 144: 331. DOI: 10.1007/s10681-005-8004-8
- Marmey P., Beeching J.R., Hamon S., Charrier A. (1994). Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collections using RAPD markers. *Euphytica* 74: 203-209
- Massart S., Antonio O., Jijakli H., Candresse T. (2014). Diagnostic des viroses et séquençage haut débit : vers un changement de paradigme ? *Virologie* 18(5): 247-50. DOI:10.1684/vir.2014.0576
- Maunder M., Page, W., Mauremootoo J., Payendee R., Mungroo Y., Maljkovic A., Vericel C., Lyte B. (2002). The decline and conservation management of the threatened endemic palms of the Mascarene Islands. *Oryx* 36 (1): 56-65. DOI: 10.1017/S0030605302000091
- Mazri M.A., Meziani R. (2013). An improved method for micropropagation and regeneration of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22(2): 176-184.
- McKey D., Elias M., Pujol B., Duputié A., Delêtre M., Renard D. (2012). Maintien du potentiel adaptatif chez les plantes domestiquées à propagation clonale. *Revue d'ethnoécologie* 1 | 2012, numéro inaugural. DOI : 10.4000/ethnoecologie.741
- Messiaen C.M., Foury C. (2003). *Allium* (oignons, échalotes, poireaux, aulx, ciboules et ciboulettes). Dans *Histoires des légumes. Des origines à l'orée du XXI^{ème} siècle*. M. Pitrat et C. Foury, coord., INRA éditions, Paris, pp. 106-125.
- Messiaen C.M., Rouamba A. (2004). *Allium cepa* L. In Grubben G.J.H. & Denton O.A (éditeurs) *Ressources végétales de l'Afrique tropicale 2. Légumes*. Fondation PROTA, Wageningen, Pays Bas / Backhuis Publishers, Leiden, Pays Bas/ CTA, Wageningen, Pays Bas. pp. 44-52.

- Michels T. (2003). Développement de la filière palmiste à la Réunion : le segment de la transformation. Rapport d'opération AD 102 : mise au point d'itinéraires techniques pour des cultures de diversification pérennes nouvelles. Cirad 29 p.
- Minoo D. (2002). Seedling and somaclonal variation and their characterization in *Vanilla*. Ph.D. Thesis, Calicut University, Kerala, India.
- Minoo D., Nirmal Babu K., Grisoni M. (2010). Biotechnological applications in *Vanilla*. In Eric Odoux and Michel Grisoni (eds) *Vanilla*, CRC Press, Boca Raton, USA. pp. 51-73.
- Minoo D., Nirmal Babu K., Peter K. V. (2011). Cryopreservation of pollen and inter specific hybridization in important orchid species *V. planifolia* and *V. aphylla*. National Consultation for Production and Utilisation of Orchids 19-21 February, National Research Center for Orchids, Pakyong- 737106, Sikkim, pp. 98-99.
- Mora-Urpi J., Weber J.C., Clement C.R. (1997). Peach palm : BGK. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops, n°20. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic resources Institute, Rome, Italy, 83 p.
- Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Neelakandan A. K., Wang K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Report* 31: 597-620. DOI 10.1007/s00299-011-1202-z
- Normand F. (2001). Diversification fruitière dans les hauts humides : rapport technique 2000. Saint Denis de la Réunion : CIRAD, 18 p.
- OCDE. (2012). Systèmes de semences de l'OCDE. Synthèse des aspects réglementaires internationaux concernant le commerce des semences. 16 p.
- Overbeek J.H.I. (1990). Tree species for tropical agroforestry systems. Department of Forestry, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands.
- Panis B., André E., Swennen R. (2011). Development of droplet-vitrification protocols for tropical vegetatively propagated crops. In COST Action 871: Cryopreservation of crop species in Europe. Proceedings of the final meeting 243 p., 104-109.
- Pavlovic N., Zečević B., Zdravković M., Ivanović M., Damjanović M. (2003). Variability and heritability of average yield of onion bulb (*Allium cepa* L.). *Genetika* 35 (3): 149-154.
- Peterson G.W., Dong Y., Horbach C., Fu Y. (2014). Genotyping-By-Sequencing for Plant Genetic Diversity Analysis: A Lab Guide for SNP Genotyping. *Diversity* 6: 665-680. DOI: 10.3390/d6040665
- Porta B., Rivas M., Gutiérrez L., Galván G.A. (2014). Variability, heritability, and correlations of agronomic traits in an onion landrace and derived S1 lines. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14: 29-35.
- Pritchard H.W., Dickie J.B. (2003). Predicting seed longevity: the use and abuse of seed viability equations. In Smith R.D., Dickie J.B., Linington S.H., Pritchard H.W. & Probert R.J. (eds) *Seed conservation: turning science into practice*. Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 653-721.
- Prochnik S., Marri P.R., Desany B., Rabinowicz P.D., Kodira C., Mohiuddin M., Rodriguez F., Fauquet C., Tohme J., Harkins T., Rokhsar D.S., Rounsley S. (2012). The Cassava Genome: Current Progress, Future Directions. *Tropical Plant Biol.* 5: 88-94. DOI 10.1007/s12042-011-9088-z

- Pujol B., Renoux F., Elias M., Rivale L., McKey D. (2007). The unappreciated ecology of landrace populations: Conservation consequences of soil seed banks in cassava. *Biological Conservation* 136: 541-551
- Rabbi I.Y., Hamblin M.T, Kumar P.L., Gedil M.A., Ikpan A.S, Jannink J-L., Kulakow P.A. (2014). High-resolution mapping of resistance to cassava mosaic geminiviruses in cassava using genotyping-by-sequencing and its implications for breeding. *Virus Research* 186: 87-96
- Rabbi I.Y., Kulakow P.A., Manu-Aduening J.A., Dankyi A.A., Asibuo J.Y., Parkes E.Y., Abdoulaye T., Girma G., Gedil M.A., Ramu P., Reyes B., Maredia M.K. (2015). Tracking crop varieties using genotyping by-sequencing markers: a case study using cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *BMC Genetics*, 16:115. DOI 10.1186/s12863-015-0273-1
- Rafique T., Yamamoto S., Fukui K., Mahmood Z., Niino T. (2015). Cryopreservation of sugarcane using the V cryo-plate technique. *Cryo Letters* 36(1): 51-9.
- Rajasegar A., Mansor A., Poobathy R., Sivalingam E., Sinniah U.R, Subramaniam S. (2015). An improved PVS2 cryopreservation technique for Ascocenda Wangsa Gold orchid using protocorm-like bodies. *Turkish Journal of Biology* 39: 202-209.
- Reed B.M. (2008). Cryopreservation - Practical Considerations. In book *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, B.M. Reed (ed.). pp. 3-13. DOI: 10.1007/978-0-387-72276-4
- Robène-Soustrade I., Hostachy B., Roux-Cuvelier M., Minatchy J., Hedont M., Pallas R., Couteau A., Cassam N., Wuster G. (2006). First report of *Iris Yellow Spot Virus* in onion bulb and seed-production fields in Reunion Island. *Plant Pathology*., 55: 288.
- Roberts E.H. (1973). Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1: 499-514.
- Roossinck M.G., Martin D.P., Roumagnac P. (2015). Plant Viruses Metagenomics: Advances in virus discovery. *The American Phytopathological Society* 105 (6): 716-727. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW>
- Roux-Cuvelier M., Grisoni M. (2010). Conservation and movement of Vanilla germplasm. In: *Vanilla*. Odoux Eric (ed.), Grisoni Michel (ed.). Boca Raton: CRC Press, (Medicinal and aromatic plants 47), pp. 31-41.
- Roux-Cuvelier M., Teyssède D., Chesneau T., Jeffray C., Massé D., Jade K., Abdoul Karime A.L., Hostachy B., Reynaud B., Legg J.P., Lett J.M. (2014). First report of cassava brown streak disease and associated Ugandan *Cassava Brown Streak Virus* in Mayotte Island. *New Disease Reports* 30: 28. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.030.028>
- Sané D., Aberlenc-Bertossi F., Gassama-Dia Y.K., Sagna M., Duval Y., Borgel A. (2006). Histocytological analysis of callogenesis and somatic embryogenesis from cell suspensions of date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Annals of Botany* 98: 301-308.
- Sinclair P.J., Blakeney A.B., Barlowt E.W.R. (1995). Relationships Between Bulb Dry Matter Content, Soluble Solids Concentration and Non-Structural Carbohydrate Composition in the Onion (*Allium cepa*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 69: 203-209.
- Schwendiman J., Pannetier C., Michaux-Ferrière N. (1988). Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany* 62: 43-52.

- Stanwood P.C. (1985). Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In Cryopreservation of Plant Cells and Organs (ed. K.K. Kartha), CRC Press, Boca Raton Florida, pp. 199-226.
- Steinmacher D.A., Clement C.R., Guerra M.P. (2007). Somatic embryogenesis from immature peach palm inflorescence explants: towards development of an efficient protocol. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 89: 15-22.
- Steinmacher D.A., Jimenez V.M., Guerra M.P. (2013). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Peach Palm (*Bactris gasipaes* Kunth). In: Somatic Embryogenesis and Genetic Transformation in Plants Editors: Junaid Aslam, P.S. Srivastava and M.P. Sharma. Narosa Publishing House, New-Delhi. pp. 75-94.
- Stein M., Stephens C. (1991). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and activated charcoal on somatic embryogenesis of *Bactris gasipaes* HBK. *Turrialba* 41: 196-201.
- Teixeira J.B., Söndahl M.R., Kirby E.G. (1994). Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. *Plant Cell Reports* 13: 247-250.
- Teixeira da Silva J.A., Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M. (2007). Molecular markers in micropropagation, tissue culture and in vitro plant research. *Genes, genomes and genomics* 1 (1): 66-72.
- Teixeira da Silva J.A. (2013). Cryopreservation of hybrid *Cymbidium* protocorm-like bodies by encapsulation-dehydration and vitrification. *In vitro Cellular Developmental Biology.Plant* 49: 690. DOI:10.1007/s11627-013-9550-8
- Teysse re D. (2009). Cryopreservation of garlic. Rapport de mission de formation   l'IPK, 12p.
- Thomas F. (2006). « Biodiversité, biotechnologies et savoirs traditionnels. Du patrimoine commun de l'humanité aux ABS (access to genetic resources and benefit-sharing) ». *Revue Tiers Monde* (188): 825-842. DOI 10.3917/rtm.188.0825
- Thomas F., Filoche G. (2015). La propriété intellectuelle sur le vivant dans les pays en développement. In *le pouvoir de la biodiversité. Néolibéralisation de la nature dans les pays émergents*. 292 p. Editions Quae, pp. 65-91
- Tomlinson J.A., Ostoja-Starzewska S., Adams I.P., Miano D.W., Abidrabo P., Kinyua Z., Alicai T., Dickinson M.J., Peters D., Boonham N., Smith J. (2013). Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of the causal agents of cassava brown streak disease. *Journal of virological methods*, 191: 148-154
- Tragoonrog S., Apichart V., Thuzar M. (2013). Method for developing somatic embryos from young inflorescences for future somatic seed production of oil palm elite genotypes. Plant patent n  EP2757873. OMPI N  WO 2013/043136.
- Tr n Thanh Van M., Dien N.T., Chlyah A. (1974). Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 119: 149.
- Tr n Thanh V n K., L  B.V. (2000). Current status of thin cell layer method for the induction of organogenesis or somatic embryogenesis. In : *Somatic embryogenesis in woody plants*, Gupta P.K. and Nexton R.J. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 6: pp. 51-92.
- UPOV. (1987). The first twenty-five years of the international convention for the protection of new varieties of plants. December 2, 1961 - December 2, 1986. Publication of the International Union for the Protection of New Varieties of Plants, Geneva, 134 p.
- UPOV. (2008). Principes directeurs pour la conduite de l'examen des caractères distinctifs, de l'homog nit  et de la stabilité. Oignon,  chalion,  chalote,  chalote grise. 41 p.

- Valverde R., Arias O., Thorpe T.A. (1987). Picloram induced somatic embryogenesis in pejibaye palm (*Bactris gasipaes* HBK). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 10: 149-156. DOI:10.1007/BF00035913
- Van der Burg W.J. (2004). *Acanthophoenix rubra* (Boey) H. Wendl. In Grubben, G.J.H. & Denton, O.A. (Editeurs). *Ressources végétales de l'Afrique tropicale 2. Légumes*. Fondation PROTA, Wageningen, Pays-Bas / Blackhuys publishers, Leiden, Pays-Bas / CTA, Wageningen, Pays-Bas, pp. 33-35.
- Vandermeer J. (1977). Observations on the root system of the pejibaye palm (*Bactris gasipaes* HBK) in Costa Rica. *Turrialba (Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas)* 3 (27): 239-242.
- Verdeil J.-L., Huet C., Grosdemange F., Buffard-Morel J. (1994). Plant regeneration from cultured immature inflorescences of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* 13 (3): 218-221.
- Verdeil J.L., Buffard-Morel J. (1995). Somatic embryogenesis in Coconut (*Cocos nucifera* L.). In *somatic embryogenesis and synthetic seed I*. Volume 30 of the series *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Ed. Professor Dr. Y. P. S. Bajaj. Springer Berlin Heidelberg. pp. 299-217.
- Verdeil J.L., Rillo E., Hornung R., Sangare A., Jacobsen H., Oropeza C., Hocher V., Hamon S. (1999). Report on the progress of the current STD3 project on coconut micropropagation through somatic embryogenesis. In: *Current Advances in Coconut Biotechnology*, Oropeza C., Ashburner R., Verdeil J.-L. and Zizumbo D. (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 391-406.
- Vieira R.L., da Silva A.L., Zaffari G.R., Steinmacher D.A., Pacheco de Freitas Fraga H., Guerra M.P. (2015). Efficient elimination of virus complex from garlic (*Allium sativum* L.) by cryotherapy of shoot tips. *Acta Physiologiae Plantarum* 37: 1733. DOI:10.1007/s11738-014-1733-3
- Vincenot D., Roux-Cuvelier M. (2011). *Le grand livre des fruits et légumes lontan : fruits et légumes d'antan*. Chevagny-sur-Guye : Ed. Orphie, Le grand livre, 159 p.
- Wall M.M., Mohammad A., Corgan J.N. (1996). Heritability estimates and response to selection for the pungency and single-center traits in onion. *Euphytica* 87(2): 133-139.
- Wang Q. C., Valkonen J. P. T. (2008). Efficient elimination of sweetpotato little leaf phytoplasma from sweetpotato by cryotherapy of shoot tips. *Plant Pathology* 57: 338-347.
- Wang Q.C., Panis B., Engelmann F., Lambardi M., Valkonen J.P.T. (2009). Cryotherapy of shoot tips: a technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation. *Annals of Applied Biology* 154: 351-363. DOI:10.1111/j.1744-7348.2008.00308.x
- Watson R. (2016). Onions with high storage ability, high soluble solids content and/or low pungency. Patent application number: 20160128290.
- Winter S., Koerbler M., Stein B., Pietruszka A., Paape M., Butgereitt A. (2010). Analysis of cassava brown streak viruses reveals the presence of distinct virus species causing cassava brown streak disease in East Africa. *Journal of General Virology* 91: 1365-1372. DOI: 10.1099/vir.0.014688-0.
- Yamamoto S., Rafique T., Fukui K., Sekizawa K., Niino T. (2012). V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: case study of mint cryopreservation. *Cryo Letters*, 33(1): 12-23.

- Yamamoto S., Wunna, Rafique T., Valle Arizaga M., Fukui K., Cruz Gutierrez E.J., Castillo Martinez C.R., Watanabe K., Niino T. (2015). The Aluminum Cryo-plate Increases Efficiency of Cryopreservation Protocols for Potato Shoot Tips. *American Journal of Potato Research* 92 (2): 250-257. DOI 10.1007/s12230-014-9425-5.
- Yi J-Y., Lee G-A., Jeong J-W., Lee S-Y., Lee Y-G. (2014). Eliminating *Potato Virus Y* (PVY) and *Potato Leaf Roll Virus* (PLRV) Using Cryotherapy of in vitro-grown Potato Shoot Tips. *The Korean Journal of Crop Science* 59 (4): 498-504.

LISTE DES PRODUCTIONS

Variétés créées inscrites au catalogue officiel

Aubergines : Gros Bringelle et Bringelle Saucisse
Piment : Aiguille
Aulx : Vacoa et Ti Rouge
Oignon : Ernestine (V6.17 E8) (en cours)
Concombre : Lambert (en cours, catalogue variétés de conservation)

Publications dans des revues

Chesneau T., Maignien G., Boyer C., Chéron J.J., **Roux-Cuvelier M.**, Vanhuffel L., Stéphane Poussier S. and Prior P. (2017). Sequevar diversity and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* Species Complex in Mayotte Island (Indian Ocean). *Frontiers* (soumis)

Joffre G., Le Moal M., Minier J., Grosse O., Descroix F., **Roux-Cuvelier M.**, Peres C., Danflous J-P., Séraphin C., Gourlay J., and Porphyre V. (2017). Développer la filière ti piment de l'île Rodrigues : Contraintes et opportunités d'une valorisation par la qualité liée à l'origine dans l'océan Indien. *Les Cahiers d'Outre-Mer* (soumis)

Richard D., Tribot N., Boyer C., Terville M., Boyer K., Javegny S., **Roux-Cuvelier M.**, Pruvost O., Moreau A., Chabirand A., and Vernière C. (2016). First Report of Copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* Pathotype a causing Asiatic Citrus Canker in Réunion, France. *Plant Disease*, Plant Disease 0 0:0, PDIS-09-16-1387-PDN

Roux-Cuvelier M., Teyssedre D., Chesneau T., Jeffray C., Massé D., Jade K., Abdoul Karime A.L., Hostachy B., Reynaud B., Legg J., Lett J.M. (2014). First report of cassava brown streak disease and associated *Ugandan cassava brown streak virus* in Mayotte Island. *New Disease Reports*, **30**: 28. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.030.028>

Hoarau J., Boyer C., Vital K., Chesneau T., Vernière C., **Roux-Cuvelier M.**, Pruvost O., Moreau A., Hostachy B., Yahaya N., Abdoul-Karime A.L. (2013). First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri*-A causing asiatic *citrus* canker in Mayotte. *Plant Disease*, **97** (7): p. 989-989. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0128-PDN>

Engelmann F., Balsemin E., Barreneche T., Chatelet P., Chauvin J.E., Couturon E., Curk F., Dantec M.A., Dantec J.P., Decourcelles T., Dussert S., Feugey L., Froelicher Y., Fouilhaux L., Gamiette F., Grapin A., Grisoni M., Guérif P., Guyarder A., Label A., Luro F., Moulin B., Muller M., Peyrière A., Prigent Y., Renard M., **Roux-Cuvelier M.**, Roques D., Rubens S., Sapotille J., Souchet C., Sylvestre I., Teyssedre D. (2009). Cryopreservation of French plant genetic resource collections (CRYOVEG). *Cryobiology*, **59** (3): p. 411. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2009.10.160>

Soustrade I., Hostachy B., **Roux-Cuvelier M.**, Minatchy M.J., Hedont M., Pallas R., Couteau A., Cassam N., Wuster G. (2006). First report of Iris yellow spot virus in onion bulb- and seed-

production fields in Reunion Island. *Plant Pathology*, 55: p. 288-288.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01261.x>

Notteghem J.L., **Roux-Cuvelier M.**, André F., Roumen E. (1997). Rice diseases in the Camargue, France. In: Chataigner J. (ed.). *Maladies du riz en région méditerranéenne et les possibilités d'amélioration de sa résistance*. Montpellier: CIHEAM, Cahiers Options Méditerranéennes; 15(3) 41-44. <http://om.ciheam.org/om/pdf/c15-3/CI011013.pdf>

Roux-Cuvelier M. (1995). Les maladies des tiges: Les champignons à sclérotés en cause. Perspectives agricoles ITCF, numéro spécial p. 44 – 47

Ouvrages et chapitres ouvrages

Vincenot D., **Roux-Cuvelier M.** (2011). Le grand livre des fruits et légumes lontan : fruits et légumes d'antan. Chevagny-sur-Guye : Ed. Orphie, 159 p. (Le grand livre).

Roux-Cuvelier M., Grisoni M. (2010). Conservation and movement of Vanilla germplasm. In: Odoux Eric (ed.), Grisoni Michel (ed.). *Vanilla*. Boca Raton: CRC Press, p. 31-41. (Medicinal and aromatic plants, 47).

Communications publiées dans des colloques internationaux et nationaux

Roux-Cuvelier M., Teyssedre D. (2010). Conservation et valorisation de la diversité des légumes sous-utilisés à l'île de la Réunion. In : *AUF - BIOVEG Réseau de chercheurs en biotechnologie, amélioration des plantes et sécurité alimentaire. XII^{èmes} Journées scientifiques des chercheurs du réseau. 27-29 septembre 2010. Livret des résumés*, p. 47-47. Journées scientifiques du Réseau AUF BIOVEG. Cluj-Napoca Romania <http://www.bioveg.auf.org/IMG/pdf/AUF-BIOVEG-2010-Cluj-Resumes.pdf>

Engelmann F,..., **Roux-Cuvelier M.**,..., Teyssedre D. (2011). Integration of cryopreservation in French plant genetic resource collections: the CRYOVEG project. In : European Cooperation in Science and Technology (COST). *Proceedings of the final meeting "Cryopreservation of crop species", Agrocampus Ouest INHP, Angers, France*. Luxembourg : Grapin, p. 139-141. <http://dx.doi.org/10.2831/10956>

Roux-Cuvelier M., Hedont M. (2008). Les légumes "lontan" de l'île de la Réunion. In : *Les légumes, un patrimoine à transmettre et à valoriser : actes du colloque d'Angers, 7-9 septembre 2005*. Lusignan : AFCEV, p. 101-106. Colloque sur les légumes, un patrimoine à transmettre et à valoriser, 2005-09-07/2005-09-09, Angers (France).

Puard M., Clément G., Mouret J.C., **Roux-Cuvelier M.** (1999). Strategies for rice salinity tolerance in Mediterranean France. In: *Future of water management for rice in Mediterranean climate areas: Proceedings of the Workshop, 5-6 septembre 1998, Sakha, Egypte*. Montpellier: CIHEAM-IAMM, p. 81-96. (Cahiers Options Méditerranéennes, 1022-1379, 40). Sakha Workshops on Future of Water Management for Rice in Mediterranean Climate Areas, 1998-09-05/1998-09-06, Sakha (Egypte).

Principaux rapports

Roux Cuvelier M. (2015). Formation aux risques phytosanitaires. Formation à la maintenance des variétés et production de matériel végétal : intégration de l'ONG Dahari au projet Germination 2. Rapport de mission Anjouan (Comores) Cirad-UMR PVBMT, 17 p.

Roux-Cuvelier M. (2015). Rapport final du projet Germination, Cirad – UMR PVBMT, 455 p.

Roux-Cuvelier M. (2011). Caractérisation agronomique du Ti piment Rodrigues : Rapport de mission à l'île de Rodrigues 20 au 25 juin 2011. Chili project of Baladirou. Montpellier : CIRAD, 13 p.

Roux-Cuvelier M. (2008). Evaluation des problèmes sanitaires sur culture de pomme de terre en Grande Comore : Rapport de mission Grande Comore (Union des Comores) 3 au 8 janvier 2008 - Mission réalisée dans le cadre de la mise en oeuvre du Projet de Renforcement et diversification des filières agricoles aux Comores (PREDIVAC). Sous projet "Diversification des filières agricoles et appui au SNAC". Saint-Pierre : UMR PVBMT - CIRAD-BIOS, 20 p.

Roux-Cuvelier M. (1995). Analyse épidémiologique des maladies du riz causées par *Sclerotium oryzae* Catt. et *sclerotium hydrophilum* Sacc. en Camargue. Montpellier : CNEARC, 79 p. Mémoire d'ingénieur. Protection intégrée des cultures.

Principales communications orales et posters

Roux-Cuvelier M., Teysedre D., Chesneau T., Jeffray C., Massé D, Jade K, Abdoul Karime A.L., Hostachy B., Reynaud B., Legg J. and Lett J.M. (2016). Occurrence of CBSD and associated *Ugandan cassava brown streak virus* in Mayotte Island. World Congress on Root & Tuber Crops – WCRTC Guangxi. Jan 18-22, 2016 Nanning- China.

Lett J.M., **Roux-Cuvelier M.**, Azali H.A., Atta-Diallo H., Beach L., Brouchoud H et al. (2016). Surveillance and control of cassava diseases in Africa. World Congress on Root & Tuber Crops – WCRTC Guangxi. Jan 18-22, 2016 Nanning-China.

Roux-Cuvelier M., Teysedre D. (2014). 3P: Expertise in Plant Genetic Resources management and tissue culture. International Workshop "Surveillance and control of Cassava diseases in Africa". June 10-13, 2014 Saint Pierre-La Réunion

Roux-Cuvelier M., Teysedre D. (2010). Conservation of underutilized vegetables diversity in Reunion Island. XII^{èmes} Journées Scientifiques du Réseau AUF BIOVEG. 27 - 29 septembre 2010 Cluj-Napoca - Romania

Roux-Cuvelier M., Agrapart J. (2008). Underutilized plants in Reunion Island: a new challenge for the diversification of agriculture. International Symposium "Underutilized Plant Species for Food, Nutrition, Income and Sustainable Development" 3-7 March 2008 Arusha-Tanzania

Roux-Cuvelier M., Hédont M. (2005). Les légumes traditionnels de l'île de la Réunion. Colloque AFCEV : Les légumes : un patrimoine à transmettre et à valoriser. 7 - 9 sept 2005 Angers-France

Humeau L., **Roux-Cuvelier M.**, Robène-Soustrade I., Couteau A., Chiroleu F., Roumagnac P., Pruvost O. (2005). Epidemiology of bacterial blight of onion and seed contamination in production fields. 5th ISTA - SHC Seed Health Symposium, 10-13 May 2005 Angers-France

Robène-Soustrade I., Legrand D., Couteau A., Humeau L., **Roux-Cuvelier M.**, Roumagnac P., Pruvost O. (2005). A Nested-PCR Multiplex to detect *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* in onion seeds. 5th ISTA - SHC Seed Health Symposium, 10-13 May 2005 Angers-France

**CONTRIBUTION A LA CONSERVATION
ET LA VALORISATION DE
L'AGROBIODIVERSITE A L'ILE DE LA
REUNION**

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 - Curriculum vitae

Annexe 2 - Organigrammes

Annexe 3 - Lettres de mission

Annexe 4 - Encadrement de stagiaires

Annexe 5 - Documents de référence et autres rapports

Annexe 6 - Liste et origine des variétés introduites à La Réunion en 1999 pour le programme de création variétale oignon

Annexe 7 - Nombre de bulbes récoltés par lignée (année n + 1 après croisement) et sélectionnés pour autofécondation

Annexe 8 - Résultat de la première série d'autofécondation

Annexe 9 - Résultat de la production de semences en fécondation libre sous structures insect-proof

Annexe 10 - Composition des milieux de culture utilisés pour la mise au point d'un protocole d'embryogénèse somatique du péjibaye

Annexe 11 - Méthodes de cryoconservation

Annexe 12 - Composition des milieux PVS2 et PVS 3 pour la cryoconservation et solutions de vitrification A1/A7 et B1/B5

Annexe 13 - Liste des accessions testées et résultat des contrôles de taux de germination des semences avant et après cryoconservation

Annexe 14 - Liste des espèces en collection CRB VATEL

ANNEXE 1 : Curriculum vitae

Michel ROUX-CUVELIER
Né le 9 juillet 1957

CIRAD Pôle de Protection des Plantes
97410 Saint Pierre – La Réunion

EXPERIENCE
PROFESSIONNELLE

Février 2001 à 2013: CIRAD Réunion. Responsable du programme REGENDA (Valorisation des ressources génétiques pour la diversification agricole) UMR PVBMT – CIRAD / Université de la Réunion)

Depuis 2013 : responsable de l'action « Conservation et Valorisation des Ressources Génétiques Végétales » de l'équipe 2

Coordinateur du projet régional de coopération « GERMINATION » (Genetic Resources Management in Actions Towards an Indian Ocean Network (2013 - 2015) et du projet InterReg V, GERMINATION II (2015 – 2017) (Montant 465 000 €, financement UE-FEDER, Région Réunion, Cirad)



↻ Gestion de ressources génétiques. Responsable du Centre de Ressources Biologiques VATEL de 2008 à 2011

- ◆ Gestion de collections aux tropicaux, Racines et Tubercules, espèces légumières à graines.
 - Caractérisation, conservation in vivo, in vitro, cryoconservation, assainissement.
- ◆ Valorisation de ressources génétiques locales. Conduite de programmes d'amélioration des plantes
 - Mise au point d'une méthode de multiplication pour *Bactris gasipaes* par embryogenèse somatique
 - Alliées : création variétale oignon, assainissement et sélection de variétés d'aulx de la Réunion
 - Sélection de variétés locales d'espèces potagères (aubergine, piment, concombre, citrouille), racines et tubercules
 - Inscriptions au catalogue officiel
- ◆ Mise en œuvre de la réglementation internationale (Traité FAO, Convention sur la Diversité Biologique, protocole de Nagoya)

↻ Mise en œuvre de schéma de certification pour les espèces végétales multipliées à la Réunion pour répondre à la réglementation européenne en matière de production et commercialisation de semences et plants.

- ◆ Norme CE Standard pour les semences et plants d'espèces potagères
- ◆ Certification pour l'ail et le maïs
- ◆ Norme CAC pour les agrumes
- ◆ Certification sanitaire pour la vanille

↻ Autres activités

- ◆ Responsable du projet CIOM Maraîchage 2012 – 2013 et 2014 à Mayotte
- ◆ Coordination des programmes sectoriels Fruits et Légumes ODEADOM de 2002 à 2013 (Ressources génétiques et santé des plantes)
- ◆ Montage et animation de trois programmes sectoriels pluri-annuels ODEADOM fruits et légumes (génétique, amélioration des plantes)

Animation du Comité de pilotage ODEADOM « Amélioration du matériel végétal de base » (ArmeFlhor, Cirad et divers partenaires).

- ◆ Responsable pour La Réunion des projet InterTrop et Cryoveg (GIS IBISA)
- ◆ Participation au montage de divers projets (IBISA , ARCAD, Care-Gen, Net Biome, MOM, InterReg Mayotte ...)
- ◆ Encadrement de stagiaires (niveau BAC à Master 2) et de VSC (VCAT) BAC+5
- ◆ Enseignement niveau Master 1 et 2 à l'Université de La Réunion
- ◆ Activités administratives et d'animation : intérim de la Direction du Pôle de Protection des Plantes (1 à 2 mois/an jusqu'en 2014). Responsable technique de la Plateforme IBISA 3P (2009-2011)

Fév. 99 à fév. 2001 : Directeur de la station agronomique de Dembeni - Mayotte. Direction de l'Agriculture et de la Forêt, Service du Développement Agricole.

Elaboration et mise en œuvre d'un programme de recherche-développement (maraichage et plantes vivrières).

- ◆ Mise en œuvre d'un programme de production de semences et matériel végétal (manioc, maïs, arachide, plantes de couvertures, banane, patate douce, ...). Gestion de collections de RG (manioc, taro, patate douce...)
- ◆ Expérimentation en station et en milieu paysan (création d'un réseau d'expérimentation multilocal) en relation avec les services de développement dans les domaines suivants :
 - Maraîchage (essais variétaux et itinéraires techniques en saison des pluies et saison sèche)
 - Cultures vivrières (banane, manioc, maïs, plantes à tubercules...)
 - Gestion agrobiologique des sols et des systèmes de culture.

Gestion administrative et financière de la station (10 à 15 personnes) et relations avec les instituts nationaux et internationaux de recherche.

Appui technique aux laboratoires de culture *in vitro* et phytopathologie (DAF-SPV)

Fev. 1997 à Fev. 1999 : DIRECTEUR TECHNIQUE Centre Français du Riz, Arles, France.

Responsabilité du service technique

- ◆ Réalisation des essais CTPS d'inscription de nouvelles variétés de riz au catalogue officiel (collaboration CIRAD, Coopérative Semences de Provence)
- ◆ Élaboration, mise en place et suivi d'expérimentations sur le riz irrigué (agronomie, fertilisation, protection intégrée des cultures...).
- ◆ Formation de techniciens et d'agriculteurs, animation scientifique

Responsabilité administrative

- ◆ Montage budget
- ◆ Rédaction rapport d'exécution
- ◆ Organisation Conseil Scientifique

Mars à oct.1995 : CONSULTANT en phytopathologie Riz Centre Français du Riz, Arles, France, CIRAD

- ◆ Mise en place et suivi d'expérimentations en milieu paysan (essais CTPS, protection des cultures)



- ◆ Formation du personnel technique du CFR (problèmes phytosanitaires du riz, qualité du grain...)
- ◆ Organisation et animation de réunions d'information, rédaction d'articles de vulgarisation

Avril 94 à fév. 95 : INGENIEUR STAGIAIRE

CIRAD (centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement) Montpellier, France.

Etude des maladies des tiges de riz causées par les champignons à sclérotés (*Sclerotium oryzae* et *S.hydrophylum*) en Camargue :

- Identification, caractérisation et épidémiologie
- Sensibilisation des riziculteurs aux problèmes phytosanitaires
- Proposition et mise au point de méthodes de lutte intégrée

Sept. 1988 à juil. 1992 : CONSULTANT pour la NORAD

Assistant technique au département recherche-vulgarisation.

NORAD (Agence Norvégienne de coopération pour le Développement), projet recherche / développement FIFAMANOR, Antsirabe - MADAGASCAR.

- ◆ Mise en place et suivi d'un programme de production de semences de pomme de terre et plantes à tubercules (manioc, taro, patate douce)
- ◆ Installation d'un laboratoire de culture *in vitro* et phytopathologie
- ◆ Production de semence de prébase en serre et semences de base en station. Contrôle sanitaire de la production (tests ELISA et bactériologiques)
- ◆ Formation et encadrement des organisations paysannes de production de semences commerciales
- ◆ Gestion du programme (rapports techniques et financiers, budgets, étude socio-économique)
 - Expérimentation et vulgarisation d'itinéraires techniques (plantes à tubercules) dans un système rizicole
 - Rédaction d'un projet de réglementation en matière de production de semences de pomme de terre à Madagascar.

- ◆ Formation et encadrement du personnel du projet

Mission de formation : Ruhengeri - RWANDA : intervention dans la formation d'agents du développement pour les pays d'Afrique centrale aux techniques de productions de semences de qualité dans le cadre des cours de formation internationaux du C.I.P. (Centre International de la Pomme de terre - LIMA PEROU)

1986 - 1987: ASSISTANT DE RECHERCHE

G.R.F.P. (Groupement de Recherche Français sur le Palmier-dattier) Conservatoire botanique, Porquerolles, Hyères, FRANCE.

Contribution au programme de recherche sur la multiplication *in vitro* du palmier dattier dans le cadre de la lutte contre le Bayoud (*Fusarium oxysporum*) dans les pays producteurs de dattes, gestion du laboratoire (commande, stocks...)

1985 -1986: ASSISTANT DE RECHERCHE

Cirad, station de Roujol, Petit-bourg, GUADELOUPE.

- I.R.A.T. (Institut de Recherche Agronomique Tropicale) :

Participation aux différents travaux de recherche (CIV riz, canne à sucre, anthuriums, orchidées)

- I.R.C.A. (Institut de Recherche sur le CAoutchouc) :



Participation au programme de recherche sur le microbouturage *in vitro* de l'hévéa

Participation à la mise au point d'une méthode d'inoculation *in vitro* de *Sporisorium scitamineum*, charbon de la canne à sucre

1976 à 1983 : TECHNICO-COMMERCIAL dans divers établissements (coopérative agricole d'approvisionnement et matériels agricoles, matériels électriques industriels et domestiques)

FORMATION

En cours : préparation d'un doctorat par la VAE (Validation des Acquis de l'Expérience). Ecole doctorale Gaïa, Université de Montpellier 2 / Montpellier SupAgro

1992-1994 : DIPLOME D'INGENIEUR du Centre National d'Etudes Agronomique des Régions Chaudes. Agropolis - Montpellier
Option : phytopathologie - protection intégrée des cultures

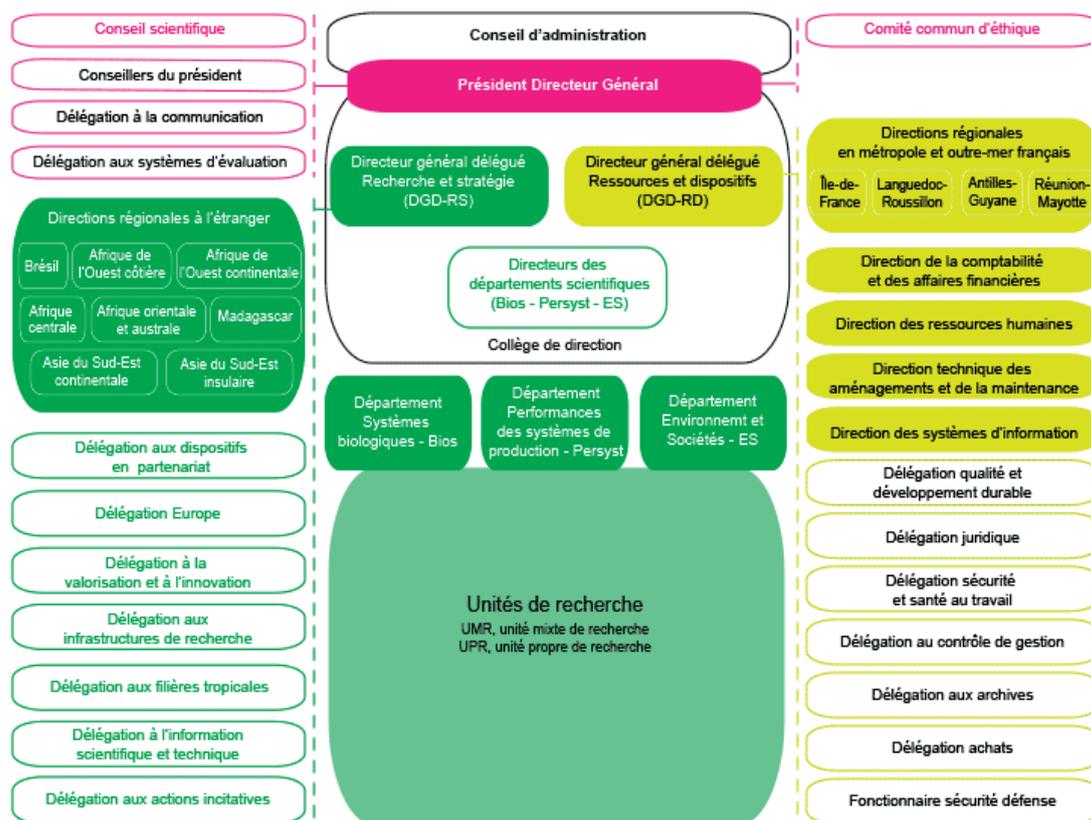
1984-1985 : BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR AGRICOLE
Option : productions végétales

FORMATIONS CONTINUES

- Mise en œuvre des dispositifs contractuels d'accès et de partage des avantages liés à l'utilisation de ressources génétiques
- Le contrat client dans un système qualité ISO 9001
- Référentiels normatifs ISO 9001 et IQuaRe et application sur plateforme IBiSA
- Circulation des ressources génétiques : pratiques et conseils
- Les risques psychosociaux au travail (RPS)
- Anglais collectif en externe
- Formation Achat Sensibilisation
- Anglais mini-groupe avancé
- Gérer sa bibliographie avec Endnote
- Formation à la technique de construction de banques génomiques enrichies en locus microsatellites
- Apprentissage accéléré anglais
- Propriété Intellectuelle
- Rédaction scientifique en anglais
- Densité et épidémiologie moléculaire des virus de plantes
- Initiation langage R
- Stratégie de communication scientifique en anglais
- Formation à l'entretien annuel
- Formation management d'équipe
- Formation en anglais
- Méthode de détection et prévention des maladies ICRO

ANNEXE 2 – Organigrammes

Organigramme du CIRAD



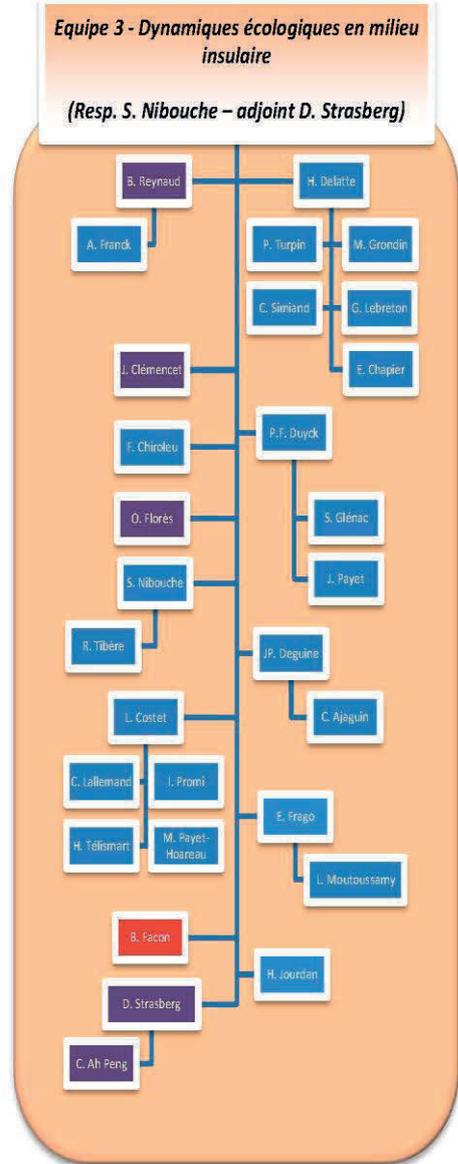
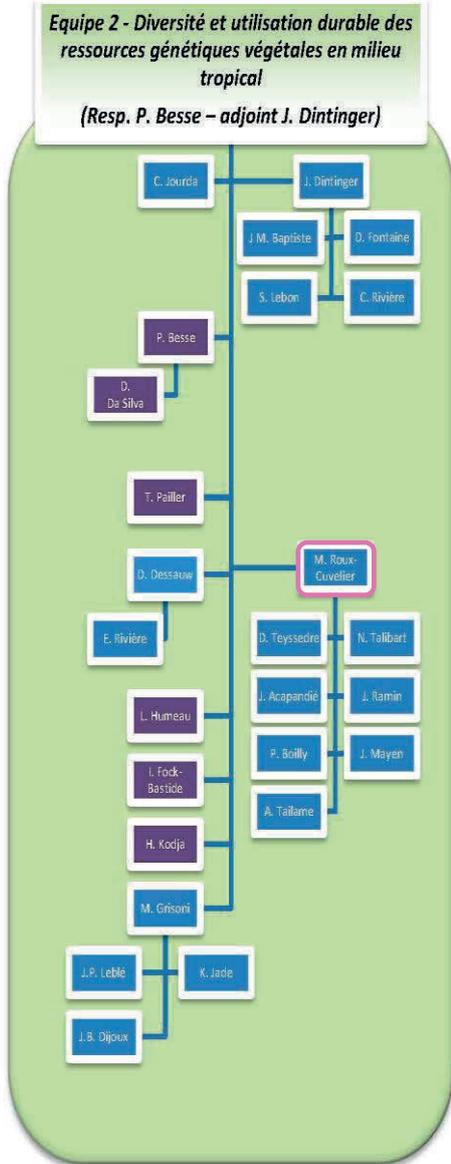
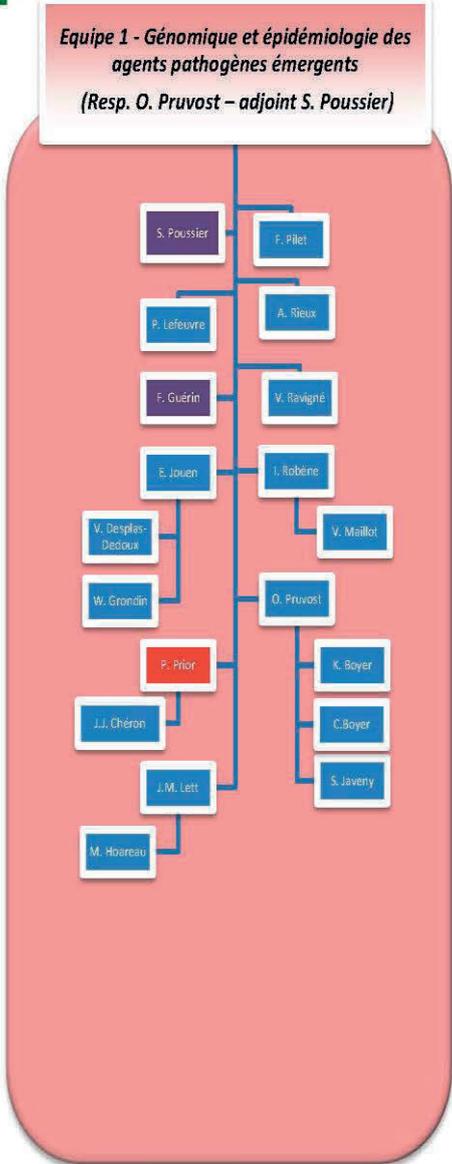
Organigramme de l'UMR PVBMT Période 2015 – 2019



R. Reynaud (DU)
S. Poussier (DU adjoint), S. Nibouche (adjoint au DU)

Cellule administrative : M. Ledaïr de Bellevue, C. Terrentroy,
O. Desiré, V. Gache, M. Baptiste (Documentation)

Cellule qualité, sécurité, environnement :
E. Jouen (resp. plate-forme et qualité), V. Maillot (com. Sécu)



■ personnel du Cirad ■ personnel de l'Univ. Réunion ■ personnel de l'Inra

ANNEXE 3 : Lettres de mission

Lettre de mission initiale (01/02/2001)

Intitulé du poste : CHERCHEUR

Les missions de Michel Roux-Cuvelier sont fixées comme suit :

L'agent est affecté à l'UMR 53 « Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical » (PVBMT) au Pôle de Protection des Plantes (3P) sur le site Cirad de Ligne Paradis, à Saint-Pierre (La Réunion). Les activités de l'agent s'inscrivent dans le champ thématique 2 de l'UMR-PVBMT intitulé « Complexes d'espèces et gènes d'intérêt », dans l'équipe 2 « Diversité du génome et de son fonctionnement ».

Elles se déroulent au sein du programme REGENDA (Ressources génétiques pour la diversification agricole) de la programmation pluriannuelle Cirad - Etat - Région Réunion.

A ce titre, l'agent apportera une attention particulière (soutien logistique, encadrement) aux différents agents relevant de ces opérations : techniciens, VCAT, stagiaires, ...

Activités de recherche – développement

Les activités de recherche sont axées sur la mise en place de la réglementation européenne en matière de production et commercialisation de semences et plants pour l'ensemble des espèces produites à la Réunion ainsi que sur la gestion des ressources génétiques locales d'espèces potagères. Elles concernent :

- L'identification, la caractérisation, l'amélioration de variétés locales d'espèces potagères en préalable à leur inscription au catalogue officiel.
- L'appui à la filière de production de semences et plants maraîchers et fruitiers
- La création de nouvelles variétés d'oignon
- La collecte, la caractérisation et la conservation de variétés locales d'espèces sous utilisées (légumes lontan)
- La production de matériel végétal de base (semences, greffons d'agrumes et porte greffe) et la maintenance de variétés
- La mise au point de méthodes de multiplication et de conservation pour des espèces d'intérêt économique et/ou patrimonial pour la diversification de la production agricole
- La responsabilité du Centre de Ressource Biologique « VATEL »

Activités d'expertise, de formation et de coopération

- Coordination du comité de pilotage « Amélioration du matériel végétal de base » qui regroupe l'ensemble des partenaires impliqués dans la filière semence à la Réunion.
- Coordination scientifique des activités de la station expérimentale agronomique de Dembeni – Mayotte, responsabilité de l'Action 4 de la convention tripartite Cirad - Etat - Collectivité Départementale.
- Participation aux activités d'enseignement dans le cadre du Master Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux (BEST) de l'Université de La Réunion.
- Encadrement de stagiaires étudiants et de formation professionnelle.
- Réalisation de missions d'expertise
-

Gestion administrative

- Contrôle des activités des unités de culture *in vitro*, cryoconservation et analyse des semences du Pôle de Protection des Plantes
- Gestion du programme sectoriel pluriannuel fruits et légumes : montage projet, réalisation et suivi technique des programmes, gestion des budgets ODEADOM.
- Gestion financière du budget d'opération du programme Regenda et conventions particulières
- Par délégation du directeur d'unité : suivi des agents sous responsabilité, réalisation des entretiens annuels
- Appui à la direction du Pôle de Protection des Plantes : intérim du directeur
- Responsabilité technique de la plateforme 3P IBISA

Démarche Qualité

- Il sera demandé à l'agent en cours d'année de s'impliquer en binôme avec son supérieur hiérarchique direct à la rédaction de documents liés à la mise en place d'un système de management qualité de la plate-forme. De plus, il est demandé dans le cadre de la mise en place d'un système qualité dans l'UMR de signaler les dysfonctionnements observés et de remplir tous les formulaires qualité liés à la plate-forme.
- L'agent ayant le statut de pilote de processus qualité devra réaliser, pour le CRB VATEL, les revues de processus qui permettent :
 - d'évaluer les performances et les résultats des processus par rapport à un référentiel reconnu au sein de la plateforme : l'ISO 9001,
 - de dynamiser des plans d'amélioration,
- Le pilote de processus à plusieurs rôles, il doit :
 - intégrer l'évolution des exigences,
 - mesurer l'atteinte des objectifs via le suivi des indicateurs associés,
 - s'assurer du traitement des dysfonctionnements du processus,
 - engager les actions correctives associées,
 - mettre en œuvre des plans d'améliorations,
 - rendre compte des résultats lors des revues de direction.
- Du fait de son implication et de sa responsabilité dans la démarche qualité, ce dernier devra également communiquer et sensibiliser le personnel sur le système qualité.

Lettre de mission réactualisée au 01/10/2013

Intitulé du poste : CHERCHEUR

Les missions de Michel Roux-Cuvelier sont fixées comme suit :

L'agent est affecté à l'UMR C53 « Peuplements Végétaux et Bio-agresseurs en Milieu Tropical » (PVBMT) au Pôle de Protection des Plantes (3P) sur le site CIRAD de Ligne Paradis, à Saint-Pierre (La Réunion). Le partenariat entre le CIRAD et l'Université de La Réunion a été formalisé en mars 2003 par un avenant au contrat quadriennal de l'Université portant création de l'UMR PVBMT et une convention signée par le Directeur Général du CIRAD et le Président de l'Université de La Réunion en précise les modalités de fonctionnement. L'UMR PVBMT a été évaluée par l'AERES en 2009 puis 2013 et reconduite jusqu'au 31 décembre 2019.

Les activités de l'agent s'inscrivent dans le nouveau champ thématique 2 de l'UMR-PVBMT intitulé « Diversité et utilisation durable des ressources génétiques végétales en milieu tropical », dans l'équipe 2 « Conservation et valorisation des ressources génétiques». Elles se déroulent au sein du programme BSV 2-2 intégré à la programmation pluriannuelle Cirad - Etat - Région Réunion (2014 - 2020). A ce titre, l'agent apportera une attention particulière (soutien logistique, encadrement) aux différents agents relevant de ces opérations : techniciens, VSC, stagiaires, ...

Activités de recherche – développement

Les activités de recherche sont axées sur la mise en place de la réglementation européenne en matière de production et commercialisation de semences et plants pour l'ensemble des espèces produites à la Réunion ainsi que sur la conservation et la gestion des ressources génétiques d'espèces potagères et vivrières. Elles concernent :

- L'identification, la caractérisation, l'amélioration de variétés locales d'espèces potagères en préalable à leur inscription au catalogue officiel.
- L'appui à la filière de production de semences et plants maraîchers et fruitiers.
- La création de nouvelles variétés d'oignon
- La collecte, la caractérisation et la conservation de variétés locales d'espèces sous utilisées (légumes lontan).
- La production de matériel végétal de départ et la maintenance de variétés.
- La mise au point de méthodes de multiplication et de conservation pour des espèces d'intérêt économique et / ou patrimonial pour la diversification de la production agricole.
- La gestion et la valorisation des collections d'aulx tropicaux et de légumes sous utilisés dans le cadre du CRB VATEL

Activités d'expertise, de formation et de coopération

- Coordination du projet POCT 2013-2014 « Germination (Genetic Resources Management in Action Toward an Indian Ocean Network) ».
- Coordination scientifique des activités en expérimentation végétale à Mayotte dans le cadre des projets CIOM (RITA)
- Participation aux activités d'enseignement dans le cadre du Master Biodiversité et Ecosystèmes Tropicaux (BEST) et Génie Urbain et Environnement (GUE) de l'Université de La Réunion.
- Encadrement de stagiaires étudiants et de formation professionnelle.
- Réalisation de missions d'expertise et formation

Gestion administrative

- Supervision des activités des unités de culture *in vitro*, cryoconservation et analyse des semences du Pôle de Protection des Plantes
- Gestion du programme sectoriel pluriannuel fruits et légumes : montage projet, réalisation et suivi technique des programmes, gestion des budgets CIOM.
- Gestion financière du budget d'opération du programme BSV 2.2 et conventions particulières
- Par délégation du directeur d'unité : suivi des agents sous responsabilité, réalisation des entretiens annuels
- Appui à la direction du Pôle de Protection des Plantes : intérim du directeur

Participation aux activités transversales de l'unité

L'agent participe aux activités transversales de la plateforme telles que définies dans le système de management qualité (SMQ) et notamment pour les procédures "Gestion des espaces de travail" et "Equipements".

"Equipements": Référent 1 espace serres NS2, référent 3 serres NS1 Bassin plat et référent 2 espace analyse des semences. Référent 2 famille d'équipement 19 : équipements d'analyse des semences et 25 : lyophilisateurs. La mission (partagée entre référents) consiste principalement à représenter le contact client pour cet espace (réflexion accueil nouvel utilisateur), à former les nouveaux utilisateurs, à organiser/réaliser la résolution ou le signalement des incidents aux référents concernés (équipements, achats, infrastructures...) (fiches de dysfonctionnement), à gérer les enregistrements de cet espace, à rédiger les tutoriaux et règles en vigueur dans cet espace, à organiser le maintien du rangement et à gérer les stocks suivis par le SMQ.

L'agent participera avec les autres référents à la production d'un bilan annuel de l'activité et des incidents sur les espaces et équipements dont il est référent et participera aux revues de processus "gestion des espaces de travail" et "Equipements".

ANNEXE 4 - Encadrement de stagiaires

Année	Niveau	Etablissement	Sujet
2002	BTS	Lycée Agricole de St Paul	Evaluation de 6 variétés population d'oignons au champ
2003	BTS	Ecole supérieure La Raque Castelnaudary	Caractérisation et analyse de la population de lentilles de Cilaos
2003	Licence	Université de la Réunion	Analyse sanitaire de lots de semences de variétés locales d'espèces potagères.
2004	M1	Université de La Réunion	Contribution à la mise au point de méthodes de multiplication <i>in vitro</i> des fougères arborescentes (Cyatheacées).
2006	M1	Université de La Réunion	Analyse et caractérisation de la diversité génétique d'une collection d'aulx tropicaux du genre <i>Allium</i> sp. (2 étudiants)
2007	M2	Université Paris XII	Mise au point d'une méthode de multiplication <i>in vitro</i> du péjibaye, (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth) par embryogenèse somatique
2009	BTS	Lycée Agricole du Rheu-35650	Optimisation de la qualité et de la quantité des semences dans le cadre d'un programme d'amélioration variétal d'oignon.
2009	Classe prépa Bio	Lycée Rolland Garros Le Tampon	Etude histologique de la liaison porte greffe / greffons chez les agrumes. (TEP 4 étudiants)
2010	M1	Université de La Réunion	Développement de la filière palmiste à la Réunion Multiplication <i>in vitro</i> de <i>Bactris gasipaes</i> par embryogenèse somatique (2 étudiants)
2011	DUT	Université de la Réunion (IUT St Pierre)	Traitement des données du Centre de Ressources Biologiques VATEL en vue de l'implémentation de l'Outil Local de Gestion des Accessions (OLGA)
2013	Ingénieur	Agrocampus Ouest (INHP)	Stage de césure – « Appui à la gestion d'une collection de ressources génétiques de légumes sous-utilisés, animation d'un réseau d'agriculteurs-multiplicateurs, caractérisation variétale de légumes tropicaux
2015	Ingénieur	CESI Angoulême	Mise en place d'un dispositif expérimental pour tester la technologie d'éclairage par LEDs sur les cultures <i>in vitro</i> de vanille et manioc
2016	DUT	Université de la Réunion (IUT St Pierre)	Caractérisation morphologique et sanitaire de ressources génétiques végétales et agricole.

ANNEXE 5 - Documents de référence et autres rapports

DOCUMENTS DE REFERENCE

Rapport d'exécution ODEADOM 2002 : convention n°2002 - 025/32. Amélioration du matériel végétal de base. 22 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2003 : convention n°2003 - 015/47. Amélioration du matériel végétal de base. 30 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2004 : convention n°2004 - 015/54. Amélioration du matériel végétal de base. 29 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2005 : convention n° 2005 - 018/62. Amélioration du matériel végétal de base. 16 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2006 : convention n° 2006 - 013/39. Amélioration du matériel végétal de base. 16 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2007 : convention n° 2007 - 014/23. 14 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2008 : convention n° 2008 - 031/1. 20 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2009 : convention n° 2009 - 003/16. 29 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2010 : convention n° 2010 - 003/14. 17 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2011 : convention n° 2011 - 005/12. 33 p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2012 : convention n° 2012 - 005/22. 43p.

Rapport d'exécution ODEADOM 2013 : convention n° 2013 - 015/22. 37 p.

AUTRES RAPPORTS ET DOCUMENTS

Cazin F., Vincenot D., **Roux-Cuvelier M.** (2006). Le papayer *Carica papaya* (famille des Caricaceae) : Fiche technico-économique papayer. Saint-Denis : Chambre d'Agriculture de la Réunion, 4 p.

Raboin L.M., Dintinger J., Grisoni M., Bory S., **Roux-Cuvelier M.** (2006). Protection des plantes

Génétique et caractérisation de la résistance aux bioagresseurs. In : Gay Jean-Pierre (ed.). Rapport annuel 2005 CIRAD Réunion. Saint-Denis : CIRAD, p. 70-74.

Nibouche S., Raboin L.M., Dintinger J., Delatte H., Reynaud B., Grisoni M., **Roux-Cuvelier M.** (2005). Protection des plantes - Génétique et caractérisation de la résistance aux bioagresseurs. In : De Taffin Gabriel (ed.). Rapport annuel 2004 CIRAD Réunion. Saint-Denis : CIRAD, p. 71-75.

Raboin L.M., Dintinger J., Delatte H., Reynaud B., Carmeille A., Grisoni M., **Roux-Cuvelier M.** (2004). Protection des plantes - Résistance des plantes aux bioagresseurs. In: De Taffin Gabriel (ed.). Rapport annuel 2003 CIRAD Réunion. Saint-Denis : CIRAD, p. 63-67.

Raboin L.M., Dintinger J., Carmeille A., **Roux-Cuvelier M.** (2003). Protection des plantes. Résistance des plantes aux bioagresseurs. In: De Taffin Gabriel (ed.). Rapport annuel 2002 CIRAD Réunion. Saint-Denis : CIRAD, p. 64-66.

Raboin L.M., Dintinger J., **Roux-Cuvelier M.**, Luisetti J. (2002). Protection des plantes. Résistance des plantes aux bioagresseurs : In: Trébel Michel (ed.). Rapport annuel 2001 CIRAD Réunion. Saint-Denis : CIRAD, p. 62-66.

Roux-Cuvelier M., Féougier G., Bénézet L., Pons V. (1998). Compte-rendu de campagne 1997. Arles : CIRAD-CA, 218-229.

ANNEXE 6 - Liste et origine des variétés introduites à La Réunion en 1999 pour le programme de création variétale oignon.

Code	variétés	Origine	Code	Variétés	Origine
1	Orient F1	Bejo Zaden Pays bas	42	XP 6995	Asgrow USA
2	Domingo		43	XP 6777	
3	White Hawk		44	Dessex-1	Hygrotech South Africa
4	Solist		45	Gold Rush	
5	Liberty		46	Hojem	
6	Capri F1			47	Jaguar
7	Aldobo	Novartis Pays bas	48	AG 558	Agroceres - Brésil
8	Alix		49	Red Créole Tech	Technisem - FRA
9	Rojo	Sunseeds USA	50	Z 516	Yates Australie
10	Red Créole 37037		51	Z 512	
11	Red Granex 38017		52	Gladalan	
12	Caraibe	Technisem FRANCE	53	E 515	AVRDC Taiwan
13	Rouge Espagnol		54	Granex AVRDC	
14	Texas Grano		55	AC 45-I	
15	F1 Goldor		56	AC 11-I	
16	Princesse		57	AC 47-I	
17	Rouge Tana		58	AC 2-I	
18	King		59	Véronique	Grondin - Réunion
19	Noflaye		60	Globe yellow Denver	Royal Sluis - Pays Bas
20	RCS 3404	Rio Colorado USA	61	Composto IPA6	Pernambuco Brésil
21	RCS 1006		62	Vale Ouro IPA11	
22	RCS 1069		63	Franciscana IPA10	
23	RCS 1027		64	IPA4	
24	Mr Max		65	Roxa IPA3	
25	Rio Raji	Hazera Israel			
26	Sweet				
27	Ram 735				
28	Ram 710				
29	Shahar - HA944				
30	HA870				
31	H950				
32	Haz-Grano F1				
33	HA9				
34	H95				
35	Sivan - HA202	Asgrow USA			
36	Ram763				
37	HA675				
38	Red Kano				
39	ASG Granex				
40	XP 6781				
41	SPF 329				

ANNEXE 7 – Nombre de bulbes récoltés par lignée (année n + 1 après croisement) et sélectionnés pour autofécondation

Crois. V6	Nb bulbes récoltés	Nb bulbes sélection n+1	Crois. 6V	Nb bulbes récoltés	Nb bulbes sélection n+1	Crois. 3V	Nb bulbes récoltés	Nb bulbes sélection n+1	Crois. V3	Nb bulbes récoltés	Nb bulbes sélection N+1
V6.1	14	2	6V.1	4	1	3V.1	9	0	V3.1	5	3
V6.2	1	0	6V.2	5	1	3V.2	0	0	V3.2	6	2
V6.3	4	3	6V.3	1	0	3V.3	18	1	V3.3	5	0
V6.4	26	5	6V.4	3	0	3V.4	3	0	V3.4	4	2
V6.5	7	2	6V.5	3	0	3V.5	5	0	V3.5	3	1
V6.6	6	3	6V.6	9	0	3V.6	6	0	Total	23	8
V6.7	1	0	6V.7	9	1	3V.7	6	0			
V6.8	2	0	6V.8	5	0	3V.8	8	0			
V6.9	1	0	6V.9	4	0	Total	55	1			
V6.10	2	2	6V.10	1	0						
V6.11	21	3	6V.11	5	0						
V6.12	9	2	6V.12	3	0						
V6.13	15	2	6V.13	4	0						
V6.14	36	11	6V.14	8	0						
V6.15	6	1	6V.15	6	1						
V6.16	4	2	6V.16	8	0						
V6.17	54	18	6V.17	16	2						
V6.18	5	2	Total	94	6						
V6.19	4	1									
V6.20	16	3									
V6.21	6	1									
V6.22	10	1									
V6.23	2	2									
V6.24	0	0									
V6.25	2	0									
V6.26	4	0									
V6.27	5	1									
V6.28	4	1									
V6.29	5	2									
V6.30	14	5									
V6.31	2	0									
V6.32	8	2									
V6.33	1	0									
V6.34	12	3									
V6.35	6	0									
V6.36	13	2									
V6.37	3	2									
V6.38	3	0									
Total	334	84									

ANNEXE 8 – Résultat de la première série d'autofécondations

Croisement V6	Nb autofec réalisées	Nb semences récoltées	Croisement 6V	Nb autofec réalisées	Nb semences récoltées
V6.1	2	224	6V.1	1	348
V6.3	1	3	6V.2	1	4
V6.4	5	1436	6V.7	1	545
V6.5	3	189	6V.15	1	64
V6.6	3	25	6V.17	2	68
V6.10	2	381	Total	6	1029
V6.11	3	1115			
V6.12	2	270	Croisement V3	Nb autofec réalisées	Nb semences rec
V6.13	2	291	V3.1	3	510
V6.14	11	2123	V3.2	2	1138
V6.15	1	177	V3.4	2	214
V6.16	2	530	V3.5	1	530
V6.17	18	7927	Total	8	2392
V6.18	2	432			
V6.19	1	512	Croisement 3V	Nb autofec réalisées	Nb semences rec
V6.20	3	195	3V.3	1	455
V6.21	1	29	Total	1	455
V6.22	1	87			
V6.23	2	117			
V6.27	1	29			
V6.28	1	111			
V6.29	2	459			
V6.30	5	1119			
V6.32	2	183			
V6.34	3	851			
V6.36	3	1339			
V6.37	2	611			
Total	84	20765			

ANNEXE 9 - Résultat de la production de semences en fécondation libre sous structures insect-proof

Familles	Structure IP	Type apport abeille	Nb fleurs récoltées	PMG moyen	Nb graines récoltées	Nb graines/fleur
V6.14e5 blanc	40 m ²	essaim	37	3,11	31 865	861
V6. 17a21		ruche	219	2,727	23 509	107
V6.14E3 blanc*		Témoin	39	2,620	1 985	51
V6.17q9		ruche	57	3,637	11 934	209
LOT 6		ruche	145	3,543	33 358	230
V6.17q10		ruche	27	2,127	13 918	515
LOT MFP 37		ruche	179	2,417	62 979	352
V6.14e6 blanc		ruche	194	3,280	70 732	365
LOT 1		ruche	391	3,720	75 465	193
LOT 2		ruche	259	2,577	96 714	373
LOT 3		ruche	100	3,007	16 297	163
V3.2a18		essaim	58	2,850	8 351	144
LOTMFP16		ruche	85	3,17	67 192	790
LOT 5		20 m ²	ruche	110	3,577	53 402
V6.17b3	ruche		93	3,957	14 684	158
V6.17o3	ruche		157	3,300	52 455	334
V6.17e8	ruche		87	3,950	24 329	280
V3.2a14	5 m ²	essaim	19	1,737	1 785	94
V6.19j9		essaim	40	2,913	20 252	506
V6.17a17		essaim	88	3,320	49 819	566
LOT MFR 12-4		essaim	67	1,600	12 563	188
V6.17a63		ruche	103	3,990	21 905	213
LOT 4		ruche	131	3,930	54 529	416
LOT MFR 9	1 m ²	essaim	15	3,753	1 705	114
V6.17a64		essaim	56	3,397	31 207	557
V6. 17a20		essaim	29	3,640	9 533	329
LOT MFR 7		essaim	63	3,483	33 876	538
V6.17e1		essaim	14	4,037	4 261	304

* : témoin sans abeille pollinisatrice

ANNEXE 10 - Composition des milieux de culture utilisés pour la mise au point d'un protocole d'embryogénèse somatique du péjibaye.

Milieu	Base MS	2,4-D 5 mg/L	2,4-D 10 mg/L	Picloram 2 mg/L	Picloram 4 mg/L	2-iP (2-isopentenyl) adenine 2mg/L
1	X	X				
2	X	X				X
3	X		X			
4	X		X			X
5	X			X		
6	X			X		X
7	X				X	
8	X				X	X
9	X					

Milieux testés pour les jeunes feuilles

Milieu	Milieu de base + charbon actif (150 mg/L)	2,4-D 100 mg/L	Picloram 150 mg/L
1	X	X	
2	X		X

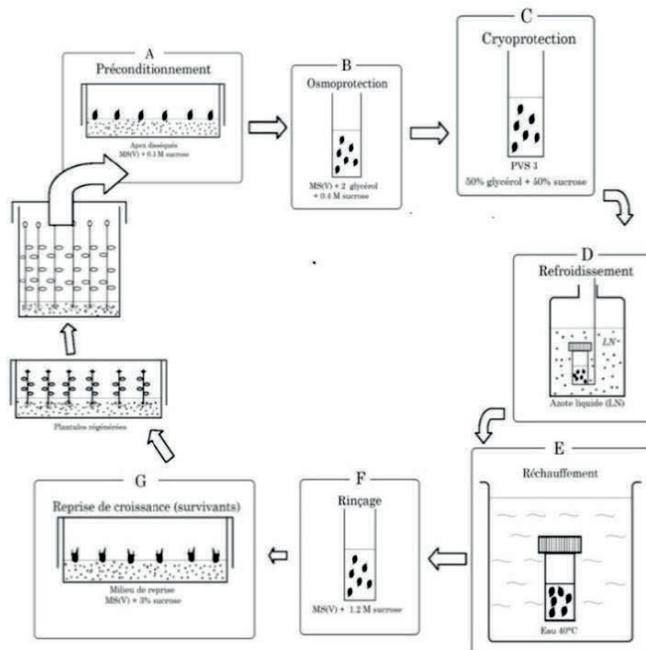
Milieux testés pour les inflorescences immatures

ANNEXE 11 - Méthodes de cryoconservation

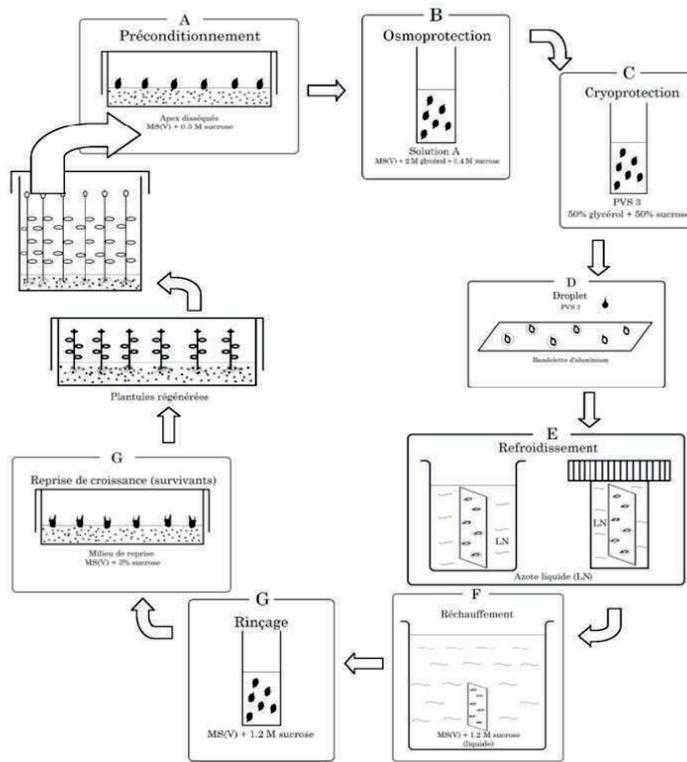
Engelman et Dussert (2013) décrivent sept techniques de cryoconservation :

- Encapsulation – Déshydratation : appliquée pour la conservation d'apex d'espèces tempérées et tropicales et pour la production de semences artificielles.
- Vitrification : basée sur un traitement progressif utilisant des solutions cryoprotectantes de plus en plus concentrées. Utilisée sur de nombreuses espèces.
- Encapsulation – Vitrification : combinaison des deux techniques ci-dessus, elle présente l'avantage de ne pas mettre les explants en contact avec les solutions de vitrification qui peuvent être toxiques.
- Déshydratation : technique la plus simple, très utilisée pour les semences orthodoxes hormis celles riches en lipides. Elle consiste à déshydrater les explants puis les introduire directement dans l'azote liquide.
- Préculture sur milieu contenant des cryoprotectants : technique très simple qui a été utilisée pour la cryoconservation de méristèmes de bananier
- Préculture – Déshydratation : technique utilisant le protocole précédent suivi d'une déshydratation sous flux stérile ou avec du silicagel. Appliquée avec succès sur asperge, embryons somatiques de palmier à huile ou zygotiques de cocotier.
- Droplet – Vitrification : technique développée plus récemment, elle utilise la vitrification mais la phase de refroidissement en plaçant les explants dans des gouttes de solutions de vitrification déposées sur des feuilles d'aluminium qui sont ensuite immergées dans l'azote liquide. Cette technique, développée pour le bananier, est de plus en plus utilisée.

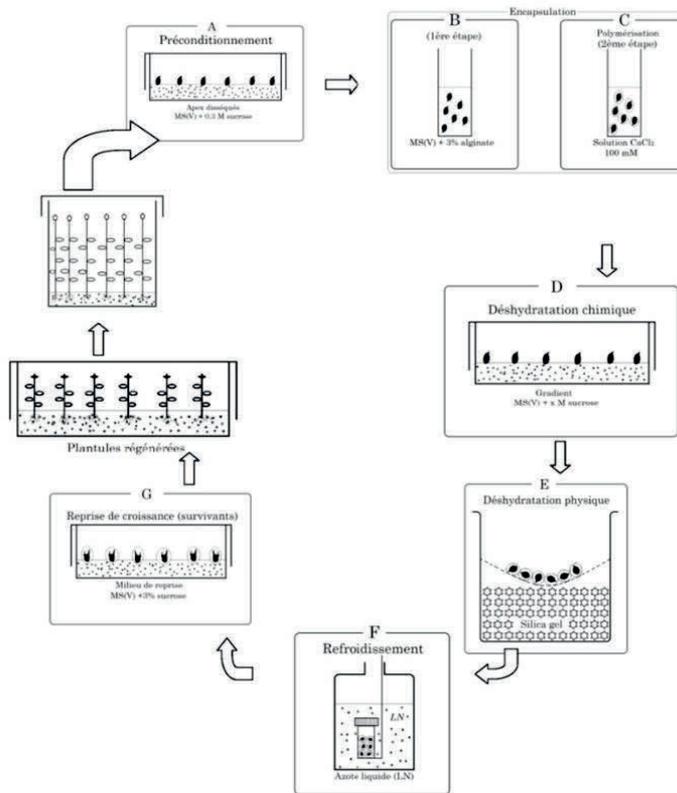
Schéma des trois principales méthodes de cryoconservation d'organes végétatifs



Protocole de vitrification d'apex



Protocole de droplet-vitrification d'apex



Protocole d'encapsulation-déshydratation d'apex

ANNEXE 12 – Composition des milieux PVS2 et PVS 3 pour la cryoconservation et solutions de vitrification A1/A5 et B1/B5 (Kim et al., 2009)

	Composition avec 1g pour 1mL (w/v)			
	Glycerol	Sucrose	Ethylene glycol	DMSO Diméthylsulfoxyde
PVS2	30%	0,4M	15%	15%
PVS3	50%	50%	-	-

Solution de vitrification	Composition (% , w/v)	Concentration
A1	Glycerol 30.0 + DMSO (diméthylsulfoxyde) 15 + Ethylene Glycol 15 + sucrose 13.7	73.7 % PVS 2
A7	Glycerol 37.5 + DMSO 10 + EG 10 + sucrose 32.5	90 % PVS 2
B1	Glycerol 50 + sucrose 50	100 % PVS 3
B5	Glycerol 40 + sucrose 40	80 % PVS 3

ANNEXE 13 – Liste des accessions testées et résultat des contrôles de taux de germination des semences avant et après cryoconservation

Code CRB	Espèce	% germination avant cryo	% germination après cryo
CRF0007	<i>Lablab purpureus</i>	30*	6*
CRF0008	<i>Lablab sp.</i>	62	48
CRF0009	<i>Lablab sp.</i>	70	100
CRF0010	<i>Vigna unguiculata ssp. Sesquipedalis</i>	92	88
CRF0011	<i>Vigna unguiculata</i>	86.9	90
CRF0014	<i>Vigna unguiculata</i>	83	36*
CRF0015	<i>Vigna unguiculata</i>	97	64
CRF0016	<i>Vigna unguiculata</i>	96	90
CRF0019	<i>Canavalia ensiformis</i>	100	96.9
CRS0031	<i>Solanum melongena</i>	30	37.5
CRS0032	<i>Capsicum frutescens</i>	32.5	47.5
CRS0036	<i>Capsicum bacatum</i>	52.5	80
CRS0044	<i>Capsicum annuum</i>	100	98
Cirad 412	<i>Zea mais</i>	97.5	100
Cirad 413	<i>Zea mais</i>	85	90
Cirad 415	<i>Zea mais</i>	87.5	100
CVR 3	<i>Zea mais</i>	100	87.5

* importantes contaminations fongiques

ANNEXE 14 – Liste des espèces en collection CRB VATEL

catégorie	famille	nom commun	nom scientifique
Légumes à graines	Cucurbitaceae	citrouille du Cap	<i>Cucurbita maxima</i>
		pipangaille lisse	<i>Luffa aegyptiaca (cylindrica)</i>
		pipangaille à côtes	<i>Luffa acutangula</i>
		patole courte	<i>Trichosanthes anguina (cucumerina)</i>
		patole	<i>Trichosanthes anguina (cucumerina)</i>
		margose d'Inde	<i>Momordica charianta</i>
		calebasse bouteille	<i>Lagenaria siceraria</i>
		calebasse la gale	<i>Lagenaria siceraria</i>
		calebasse longue	<i>Lagenaria siceraria</i>
		calebasse ronde	<i>Lagenaria siceraria</i>
		margose amère	<i>Momordica charianta</i>
		citrouille péi	<i>Cucurbita moschata</i>
		concombre péi	<i>Cucumis sp.</i>
		concombre pointes noires	<i>Cucumis sp.</i>
	Fabaceae	pois sabre rouge	<i>Canavalia gladiata</i>
		pois sabre blanc	<i>Canavalia ensiformis</i>
		pois sabre maritime	<i>Canavalia maritima</i>
		antaque blanc	<i>Lablab sp</i>
		antaque rouge	<i>Lablab purpureus</i>
		antaque long	<i>Lablab sp</i>
		antaque de Maurice	<i>Lablab sp</i>
		antaque mauve	<i>Lablab sp</i>
		antaque plat	<i>Lablab sp</i>
		antaque huile	<i>Lablab sp</i>
		antaque brandeis	<i>Lablab sp</i>
		haricot kilomètre	<i>Vigna unguiculata ssp. Sesquipedalis</i>
		voème 40 jours	<i>Vigna unguiculata ssp. unguiculata</i>
		voème chinois	<i>Vigna unguiculata ssp. unguiculata</i>
		voème blanc	<i>Vigna unguiculata</i>
		voème rouge	<i>Vigna unguiculata</i>
		pois carré	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>
		pois manioc/patate cochon	<i>Pachyrhizus erosus</i>
		voandzou "pistache malgache"	<i>Vigna subterranea</i>
arachide blanche	<i>Arachis hypogaea</i>		
arachide rouge	<i>Arachis hypogaea</i>		
ambrevade	<i>Cajanus cajan</i>		
ambrevade panaché	<i>Cajanus cajan</i>		
ambrevade gris	<i>Cajanus cajan</i>		
zembériques rouges	<i>Vigna sp.</i>		

		zembériques gris	<i>Vigna sp.</i>
		zembériques nain	<i>Vigna sp.</i>
		pois cameroun	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois nacré	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois gris	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois dragée	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois vert	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois dragée coco blanc	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois noir	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois rosée	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois cendré clair	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois cendré brun	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois cap rouge	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois cap malbar	<i>Phaseolus lunatus</i>
		pois cap rouge-vert	<i>Phaseolus lunatus</i>
	pois cap saint-paul	<i>Phaseolus lunatus</i>	
	<i>Solanaceae</i>	Brede morelle	<i>Solanum nigrum</i>
	<i>Amaranthaceae</i>	Brède pariétaire blanc	<i>Amaranthus sp.</i>
		Brède pariétaire rouge	<i>Amaranthus sp.</i>
		Brède pariétaire épines	<i>Amaranthus sp.</i>
	<i>Asteraceae</i>	Brède lastron	<i>Sonchus</i>
Brède lastron cheval		<i>Sonchus</i>	
Brède mafane		<i>Acmella oleracea</i>	
<i>Basellaceae</i>	Brède malbar	<i>Basella rubra</i>	
<i>Brassicaceae</i>	Brède moutarde	<i>Brassica rapa</i>	
<i>Aizoaceae</i>	Brède z'épinard	<i>Tetragonia tetragonioides</i>	
Racines et Tubercules	<i>Euphorbiaceae</i>	manioc	<i>Manihot esculenta</i>
	<i>Cannaceae</i>	conflore	<i>Canna edulis</i>
	<i>Convolvulaceae</i>	patate douce	<i>Ipomoea batatas</i>
	<i>Dioscoreaceae</i>	pommes en l'air/hoffes	<i>Dioscorea bulbifera</i>
		hoffes foie de volaille	<i>Dioscorea bulbifera</i>
		cambarre	<i>Dioscorea alata</i>
	<i>Araceae</i>	chou caraïbe	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>
		songe pâté	<i>Amorphophallus paeoniifolius</i>
		songe gris	<i>Colocasia esculenta</i>
		songe maurice	<i>Colocasia esculenta</i>
		songe hollandaise	<i>Colocasia esculenta</i>
		songe jaune	<i>Colocasia esculenta</i>
		songe mange tout	<i>Colocasia esculenta</i>
	<i>Zingiberaceae</i>	gingembre	<i>Zingiber officinale</i>
gingembre mangue		<i>Curcuma amada</i>	
<i>Marantaceae</i>	arrow-root	<i>Maranta arundinacea</i>	

ABSTRACT

For more than 30 years, my professional activities have been devoted to studying and valorizing the genetic diversity of food plants, especially tropical species that are often orphaned. These studies on agrobiodiversity in the tropics concerned conservation, health status and genetic diversity of various species (potato, rice, onion and garlic, *Fabaceae* and *Cucurbitaceae*, palm trees, etc.).

Plant genetic resources are major elements in the progress of agriculture in the southern countries. Today they are increasingly threatened by the specialization and intensification of production systems as well as global changes such as global warming and anthropization environments. In addition, access and use of these resources for research and development purposes have become more complex due to the legal aspects of the Convention on Biological Diversity and Plant breeders' rights.

The first part of my VAE (Validation of Acquired Experience) file retraces my career in France and abroad. This course is punctuated by phases of various professional activities with increasing responsibilities and also by the fact of resuming diploma studies. This new drive led me to the position of researcher that I occupy since 2001 at CIRAD in Reunion Island. To illustrate my research activities, three research projects are presented in the second part of my document.

The first one describes works of new varieties creation for short days tropical onions. It uses classical breeding methods: introduction of diversity, creation of hybrid families, recombination and character fixation by self-fertilization, individual and phenotypic recurrent selection. The selection was based on the following main characteristics: yield, dry matter content, color and shape of the bulb, disease tolerance. Several varieties have been created to diversify and improve local production.

The second project concerns the vegetative propagation of *Bactris gasipaes* an exotic palm species, introduced in Reunion for the diversification of agricultural production. The protocol of *in vitro* propagation by somatic embryogenesis is derived from methods developed for other palm species. A histological study revealed an area of induction of callogenesis from epidermal cells of juvenile leaf lamina. A multiplication protocol was developed and used by a start-up specialized in the *in vitro* production of agricultural and ornamental plants.

The third project focuses on the conservation of genetic resources in tropical environments, particularly for vegetatively propagated species. It is illustrated by the development of an apex cryopreservation protocol for vanilla plants. Despite numerous difficulties related to the specificity of Vanilla, the results show the feasibility of the droplet-vitrification technique. In parallel, seed cryopreservation trials were successfully conducted.

Finally, an analysis of the regulatory context in relation to intellectual property rights and access to genetic resources is presented. It draws on the case of La Réunion and highlights the difficulties (or even the incongruities) encountered in the implementation, in a tropical environment, of regulations established by the countries of the North, especially for orphan species.

This VAE file is complemented by the perspective of my participation in a project regarding the conservation and valorization of cassava landraces in Africa. This regional network project, which is particularly important in fighting the two main cassava-virus diseases, will mobilize different disciplines (genetics, plant health and social sciences) in an integrated approach.