

TRAVAUX EFFECTUES SUR *LIPARIS LOESELII* EN 2018

1. Suivi des cultures en conditions semi-naturelles au jardin à partir des plantes issues de culture *in vitro* symbiotique.

Les plantules obtenues à partir des protocormes récupérés sur la boîte de Pétri envoyée par le laboratoire de Prague et cultivés au CBN en tubes sur milieu nutritif gélosé depuis 2015 ont été transférées en juin 2017 sur substrat terreux en boîtes plastiques stériles, et placées en phytotron.

Après une période de repos d'environ 4 à 5 mois à l'état de pseudobulbes, ces plantules issues de la seconde génération ont régénéré un voire plusieurs individus.

Au printemps 2018, la moitié des individus a été transférée en godets plastiques dans un mélange terreux (1/4 terreau, 1/4 vermiculite, 1/4 sphagnum, 1/4 substrat provenant du marais du Vivier) et placée dans une terrine sur une couche de tourbe conservée humide, et recouverte d'un film plastique aéré permettant de conserver une hygrométrie suffisante.

Quatre boîtes de culture plastique témoin sorties des incubateurs, plantules non transférées, ont été placées dans les mêmes conditions.

A partir des 28 plantules en tubes, puis 39 en boîtes plastique, 52 plantes sont apparues tout au long du printemps et de l'été 2018 dans les 2 modes de culture. 5 plantes ont fleuri mais seules 2 capsules ont pu être récoltées, les autres fruits ont avorté ou été détruits par des prédateurs (mollusques).



Individus en culture en godets repiqués en boîte fermée afin d'éviter la prédation par les mollusques.

Ce taux de multiplication d'environ 85% sur deux années et en moyenne de 36% par an est assez conforme/similaire à celui obtenu par le Conservatoire Botanique National de Gap qui a cultivé des individus adultes au jardin durant plusieurs années.

Les individus qui avaient été contaminés par un pathogène lors du dernier repiquage en boîtes plastiques ont redémarré très tardivement (fin juin) et n'ont donc pas terminé un cycle de végétation complet.

Les conditions météorologiques de l'été et de l'automne 2018 (chaleur et sécheresse difficiles à contrôler) ont été défavorables aux jeunes plantules en pot. La prochaine saison de végétation renseignera sur les modifications à apporter au mode de culture.

2. Etude de la colonisation mycorhizienne des individus de *Liparis loeselii* sur le site du marais du Vivier à Chénay (Marne) et essais d'identification moléculaire.

Les années précédentes, l'isolation du symbiote potentiel de *Liparis loeselii* avait été effectuée uniquement à partir de petites portions de racines, et les souches obtenues correspondaient à différents champignons communs dans le sol infectant également les racines des plantes alentour. De plus le taux de cellules infectées (infection mycorhizienne) semblait faible.

Afin de diversifier l'échantillonnage et de préciser le modèle d'infection, trois individus entiers non fleuris à des stades de croissance légèrement différents ont été prélevés en juin 2018 et ont servi à différentes analyses :



Individu 1 mis en culture

Individus 2 et 3 extraction ADN

2.1. Vérification à la loupe binoculaire de la présence du champignon dans les différentes parties de la plante (racines, pseudobulbe et base de la tige feuillée (pseudobulbe pas encore formé) (individus n°1 & 3 sur la photo).

Des pelotons mycéliens ont été observés dans toutes les parties de la plante dans des proportions variables. Les pseudobulbes étaient colonisés dans la partie basale peu chlorophyllienne, et les racines dans le tiers supérieur, mais les pelotons semblaient à un stade de dégénérescence déjà avancé. Par contre la base de la tige feuillée, non chlorophyllienne, futur pseudobulbe, était largement infectée.

2.2. Mise en culture d'un individu, essai d'isolation du champignon pour identification moléculaire et utilisation pour des semis symbiotiques.

A partir de l'individu n°1, 23 explants ont été mis en culture sur milieu FIM (Fungus Isolation Medium, Clements M.A. et Muir H., 1986).

| Tissus mis en culture | Croissance d'un champignon* | Contaminations diverses |
|----------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Pseudobulbe (6 explants) | 2 | Autres champignons & bactéries |
| Racine (4 explants) | 0 | Autres champignons |
| Base Tige Feuillée (13 explants) | 10 | Bactéries |

* potentiellement mycorhizien selon des caractères morpho-anatomiques connus.

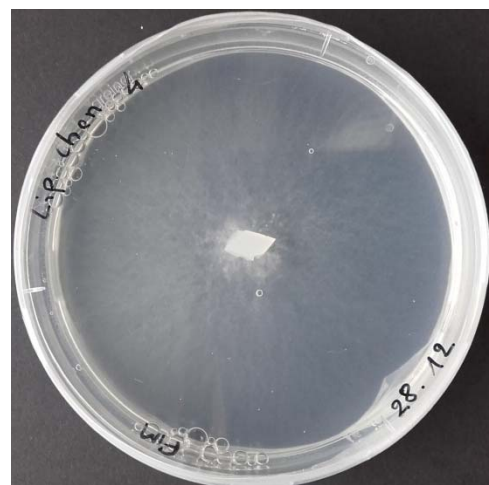


Illustration de 2 souches extraites de racines (à gauche : Chen. 2017) et d'un jeune pseudobulbe de *Liparis loeselii* (à droite : Chen. 4). Les filaments de la souche Chen. 2017 sont aériens et couvrent le couvercle de la boîte de Pétri alors que la souche Chen. 4 présente des hyphes traçants correspondant plus à un symbiote des orchidées.

2.3. Caractérisation moléculaire

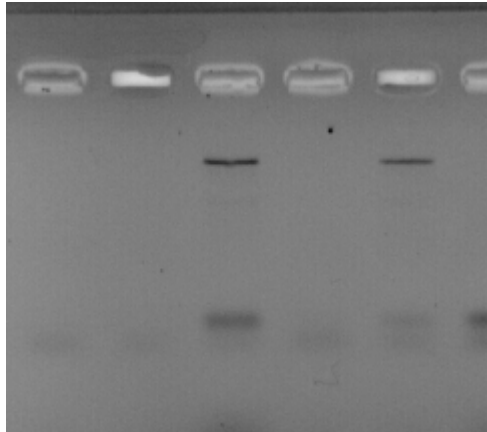
2.3.1. Par extraction d'ADN sur 2 individus afin de déterminer à quel groupe voire à quel genre appartient le champignon observé (individus 2 & 3 sur la photo).

Chaque organe fut traité séparément, 6 échantillons d'ADN ont ensuite été testés avec différents couples d'amorces spécifiques du groupe *Tulasnella sp.* colonisant largement la famille des orchidées tant tropicales/épiphytes que terrestres et supposé être présent chez *Liparis*.

Aucun résultat n'ayant été obtenu, les échantillons seront à nouveau testés en élargissant à d'autres groupes de symbiotes des orchidées (*Ceratobasidium*, *Sebacina*...).

2.3.2. Par extraction d'ADN sur 4 souches obtenues en culture *in vitro*.

Parmi les 10 souches obtenues en culture *in vitro*, 4 furent retenues pour une identification moléculaire corroborant ou infirmant les résultats des tests utilisant l'ADN plante.



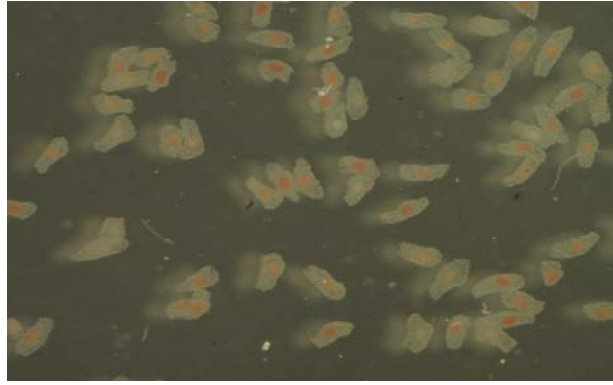
Ci-dessous détection de Tulasnella sur gel d'électrophorèse pour 2 échantillons en culture avec le couple d'amorces 5.8S- tul/TW14.

- La souche issue de culture *in vitro* à partir des racines en 2017 n'a donné aucun résultat positif avec différents couples d'amorces. Ceci confirmerait que cet isolat n'est pas non plus du groupe *Tulasnella*.
- Chen1, Chen 2, Chen 3-1, Chen 3- 2, Chen4 : l'identification génétique par séquençage est en cours pour les échantillons Chen 4 et Chen 3- 1 sur 2 couples d'amorces.

3. Semis symbiotique et asymbiotique de la récolte de graines 2018

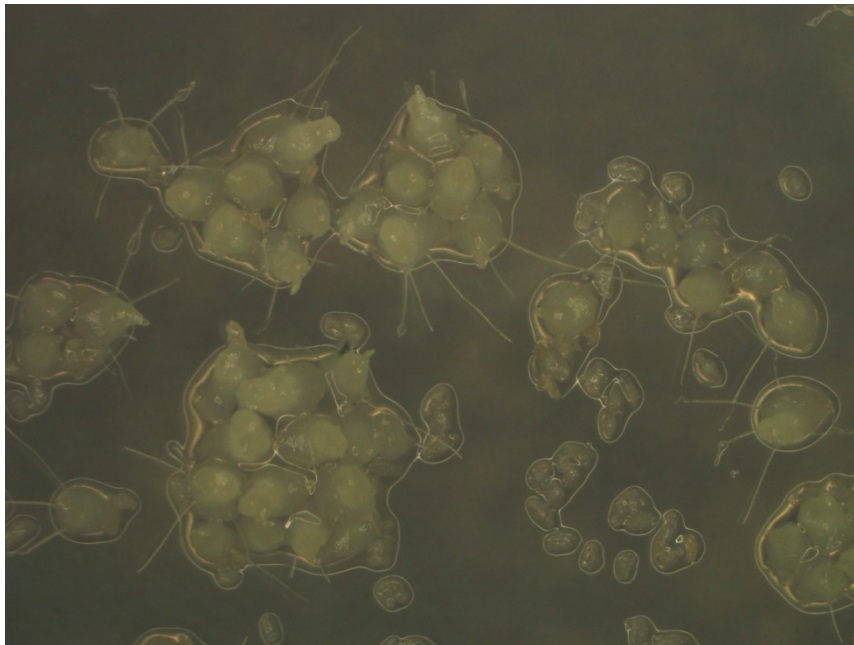
Une récolte de plusieurs capsules sur 3 individus a été effectuée en septembre 2018 et envoyée au laboratoire début décembre, ce délai avant semis n'étant pas préjudiciable dans le cas d'une récolte de fruits à maturité contenant des graines avec un tégument complètement formé.

Un test préalable de viabilité des semences au TTC (Tétrazolium chloride) effectué à la fois sur les graines provenant du marais du Vivier et sur les graines provenant d'une station sur le territoire d'agrément du CBN de Bailleul (CBNBI) a permis de comparer la qualité des 2 lots. Environ 75 % des semences sont colorées et viables. 25% des embryons colorés en rose/orange clair ont été comptabilisés comme viables car la solution de TTC ne pénètre pas de manière régulière dans des semences dont l'épaisseur du tégument externe est variable.



Test de coloration vitale des semences récoltées au marais du Vivier.
En rouge et rose/orange clair les embryons viables.

Un premier semis asymbiotique mi-octobre 2018 sur les semences du CBNBI récupérées plus tôt a confirmé que le protocole de semis était maîtrisé. La germination est visible sur différents milieux au bout d'environ 30 à 45 jours.



Protocormes issus du semis de Liparis loeselii (semences du CBNBI) servant de témoin positif au semis de graines du marais du Vivier.

Deux nouveaux semis asymbiotiques sont en cours à partir des graines du marais du Vivier et des graines du CBNBI servant de témoin positif sur quatre milieux différents :

- Milieu Tokuhara and Mii 1993 (semis Liparis terrestre et épiphyte).
- Milieu de Harvais (1982).
- Milieux BM et BM1 (Van Waes et Debergh 1986).

Ces trois derniers milieux ont déjà été utilisés sur de nombreuses espèces d'orchidées terrestres.

Plusieurs souches de champignons issues du Liparis du marais du Vivier mais également d'autres populations de Liparis ont été utilisées pour les semis symbiotiques.

Ces matériels semences et souches prélevées en dehors du territoire d'agrément du CBNBP ne serviront qu'à la mise au point des protocoles de semis et de culture.

A noter que les souches obtenues sur des plantes adultes ne correspondent pas systématiquement à celles favorisant la germination. La recherche de protocormes sur le terrain qui permettrait sans doute d'obtenir le symbiote le plus sûrement compatible avec les semences ne semble pas possible dans notre programme. L'introduction de graines dans des sachets nylon au pied de plantes adultes peut donner de bons résultats mais reste aléatoire et demande plusieurs années.

Prévision travaux 2019

Les travaux prévus en 2018 ont été partiellement réalisés :

- Extractions multiples des différents champignons colonisant la plante sur le site du marais du Chénay ainsi que d'autres sites pour comparaison :

3 sites ont été explorés dont 2 grâce à un partenariat avec le CBN alpin engagé dans un programme d'actions sur le Liparis sur leur territoire d'agrément. Par contre l'objectif d'identification moléculaire des champignons n'est que partiellement rempli. Cette étude sera poursuivie avec l'équipe de cryptogamie du Muséum (M.A. Selosse et F. Martos)

- Récolter des semences sur d'autres populations plus dynamiques :

La récolte de semences prévue cette année par le CBN alpin a été utilisée à d'autres fins pour leur propre projet mais il a été convenu d'une nouvelle récolte en 2019.

- Faire appel à d'autres partenaires ayant travaillé sur le même sujet et susceptibles de nous fournir du matériel graines :

Seul le CBN de Bailleul a fourni des semences. Une demande de prélèvement concernant des semences et des racines (Cerfa) a été envoyée au CENL () qui gère la tourbière de Pagny-sur-Meuse sur laquelle se trouve une importante population de Liparis.

- Pollinisations manuelles et protection des individus contre les prédateurs au marais du Vivier à Chénay :

Cette opération n'a pas été réalisée pour des raisons pratiques mais sera reconduite pour 2019. Le technicien en charge de la culture *in vitro* localisé à Paris effectuera plusieurs visites sur le site à partir de début juin.

Les 3 hampes florales récoltées en 2018 étaient à terre, abîmées par des mollusques. Un dispositif de protection des individus doit être impérativement testé en 2019. Un système de cage

recouverte d'un grillage plastifié très fin plus résistant qu'un voile de protection tissé difficile à bloquer en bas de la plante sera utilisé.

DEMANDE DE DÉROGATION

POUR LA COUPE* L'ARRACHAGE*
 LA CUEILLETTE* L'ENLÈVEMENT*
DE SPÉCIMENS D'ESPÈCES VÉGÉTALES PROTÉGÉES

* cocher la case correspondant à l'opération faisant l'objet de la demande

Titre I du livre IV du code de l'environnement
 Arrêté du 19 février 2007 fixant les conditions de demande et d'instruction des dérogations
 définies au 4° de l'article L. 411-2 du code l'environnement portant sur des espèces de faune et de flore sauvages protégées

A. VOTRE IDENTITÉ

Nom et Prénom : G r i v e a u C h a n t a l
 ou Dénomination (pour les personnes morales) : C. B. N. B. P. Conservatoire Botanique National du bassin Parisien
 Nom et Prénom du mandataire (le cas échéant) : C. B. N. B. P.
 Adresse : N° 61 Rue Buffon
 Commune Paris
 Code postal 75005
 Nature des activités : Missions du CBN : connaissance de l'état et de l'évolution de la flore sauvage, conservation des espèces les plus menacées, assistance technique et scientifique, information et d'éducation du public
 Qualification : Responsable banque de semences du CBNBP

B. QUELS SONT LES SPÉCIMENS CONCERNÉS PAR L'OPÉRATION

| Nom scientifique Nom commun | Quantité(1) | Description (2) |
|--------------------------------|-------------|--|
| B1 Liparis loeselii | 10 (maxi) | 1 tronçon de racine sur 10 individus maximum, la quantité prélevée sera adaptée à la taille et à l'état phénologique de la population. |
| B2 Liparis loselii | 10 (maxi) | 1 capsule de graines sur 10 individus maximum, la quantité prélevée sera adaptée à la taille de la population. |
| B3 | | |
| B4 | | |
| B5 | | |

(1) poids en grammes ou nombre de spécimens
 (2) préciser la partie de la plante récoltée

C. QUELLE EST LA FINALITÉ DE L'OPÉRATION *

| | | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Protection de la faune ou de la flore | <input type="checkbox"/> | Prévention de dommages aux cultures | <input type="checkbox"/> |
| Sauvetage de spécimens | <input type="checkbox"/> | Prévention de dommages aux forêts | <input type="checkbox"/> |
| Conservation des habitats | <input type="checkbox"/> | Prévention de dommages aux eaux | <input type="checkbox"/> |
| Inventaire de population | <input type="checkbox"/> | Prévention de dommages à la propriété | <input type="checkbox"/> |
| Etude phytoécologique | <input type="checkbox"/> | Protection de la santé publique | <input type="checkbox"/> |
| Etude génétique | <input type="checkbox"/> | Protection de la sécurité publique | <input type="checkbox"/> |
| Etude scientifique autre | <input checked="" type="checkbox"/> | Motif d'intérêt public majeur | <input type="checkbox"/> |
| Prévention de dommages à l'élevage | <input type="checkbox"/> | Détention en petites quantités | <input type="checkbox"/> |
| Prévention de dommages aux pêcheries | <input type="checkbox"/> | Autres | <input type="checkbox"/> |

Préciser l'action générale dans laquelle s'inscrit l'opération, l'objectif, les résultats attendus, la portée locale, régionale ou nationale : Action 18 de la déclinaison régionale du PNA en faveur du Liparis loeselii en Champagne-Ardenne. Voir note jointe.....

Suite sur papier libre

D. QUELLE EST LA PÉRIODE OU LA DATE DE L'OPÉRATION

Préciser la période : Racines : juillet
 ou la date : Graines : septembre à octobre

E. QUELLES SONT LES CONDITIONS DE RÉALISATION DE L'OPÉRATION *

Arrachage ou enlèvement définitif Préciser la destination des spécimens arrachés ou enlevés :

Laboratoire semences du CBNBP- MNHN.- Paris.....

Arrachage ou enlèvement temporaire avec réimplantation sur place

avec réimplantation différée

Préciser les conditions de conservation des spécimens avant la réimplantation :

.....

Préciser la date, le lieu et les conditions de réimplantation :

.....

Suite sur papier libre

EI. QUELLES SONT LES TECHNIQUES DE COUPE, D'ARRACHAGE, DE CUEILLETTE OU D'ENLÈVEMENT

Préciser les techniques :

Prélèvement des racines : soulèvement de la plante avec sa motte de substrat, couper une racine au niveau du pseudobulbe.....

.....

Prélèvement des graines : prélèvement d'une capsule.....

.....

Suite sur papier libre

F. QUELLE EST LA QUALIFICATION DES PERSONNES CHARGÉES DE L'OPÉRATION *

Formation initiale en biologie végétale Préciser :

.....

Formation continue en biologie végétale Préciser : Formation en culture in vitro au laboratoire de Morphogénèse
Expérimentale, Université Paris Sud-Orsay

.....

Autre formation Préciser :

.....

G. QUELS SONT LES LIEUX DE L'OPÉRATION

Régions administratives : ..ACAL.....

Départements : ...55.....

Cantons : ...Vaucouleurs.....

Communes : ..Pagny-sur-Meuse.....

H. EN ACCOMPAGNEMENT DE L'OPÉRATION, QUELLES SONT LES MESURES PRÉVUES POUR LE MAINTIEN DE L'ESPÈCE CONCERNÉE DANS UN ÉTAT DE CONSERVATION FAVORABLE *

Réimplantation des spécimens enlevés Mesures de protection réglementaires

Renforcement des populations de l'espèce Mesures contractuelles de gestion de l'espace

Préciser éventuellement à l'aide de cartes ou de plans les mesures prises pour éviter tout impact défavorable sur la population de l'espèce concernée : ..Prélèvements non délétères pour la plante, à des fins d'expérimentation, mises au point et amélioration des techniques de culture in vitro et au jardin.....

.....

Parallèlement, la tourbière de Pagny-sur-Meuse est gérée par le CENL dont les récents rapports ont montré un bon état de conservation de la population.....

.....

Suite sur papier libre

I. COMMENT SERA ÉTABLI LE COMPTE RENDU DE L'OPÉRATION

Bilan d'opérations antérieures (s'il y a lieu) :

..... Bilan des actions 2018 menées dans le cadre de la déclinaison régionale du PNA en faveur du Liparis de Loesel.....

.....

Modalités de compte rendu des opérations à réaliser :

.....

Le compte-rendu des travaux ex situ sera inclus dans le rapport de la déclinaison régionale du PNA en faveur du Liparis de Loesel. Ce rapport sera envoyé à la DREAL Grand-Est et au CENL.

* cocher les cases correspondantes

La loi n° 78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés s'applique aux données nominatives portées dans ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour ces données auprès des services préfectoraux.

Fait à ..P.a.r.i.s.....

le..2.2./..0.1./..2.0.1.9.....

Votre signature *Griveau Chantal*