

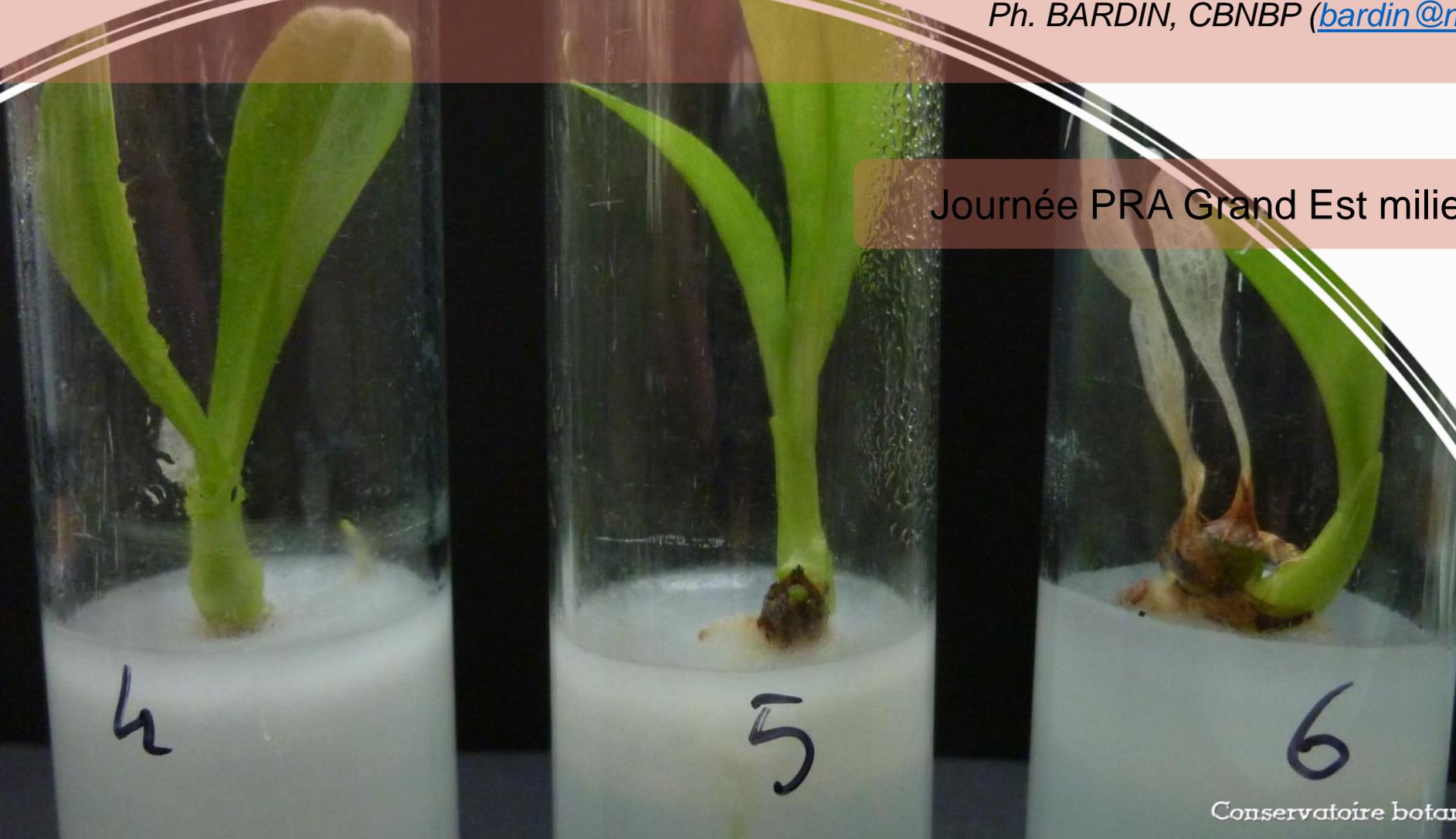
Bilan PNA *Liparis loeselii*

La multiplication *ex situ* en appui aux renforcements de populations

Ph. BARDIN, CBNBP (bardin@mnhn.fr)



Journée PRA Grand Est milieux ouverts



SENSIBILISER



CONSERVER



ACCOMPAGNER



CONNAÎTRE



Maîtrise des itinéraires techniques permettant la mise en œuvre de programmes de renforcement (réintroduction ou introduction)

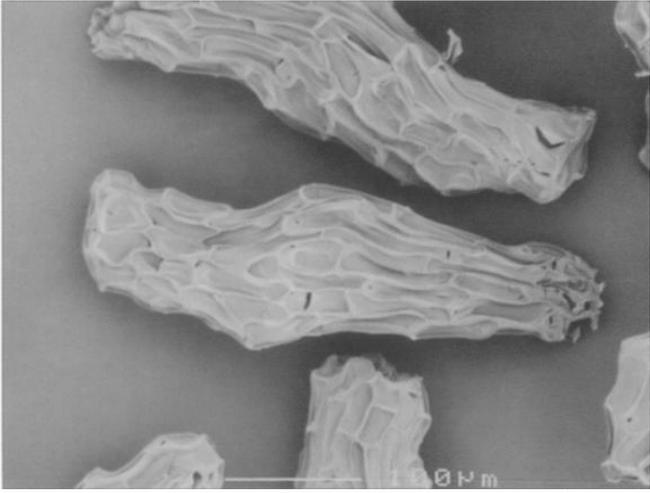
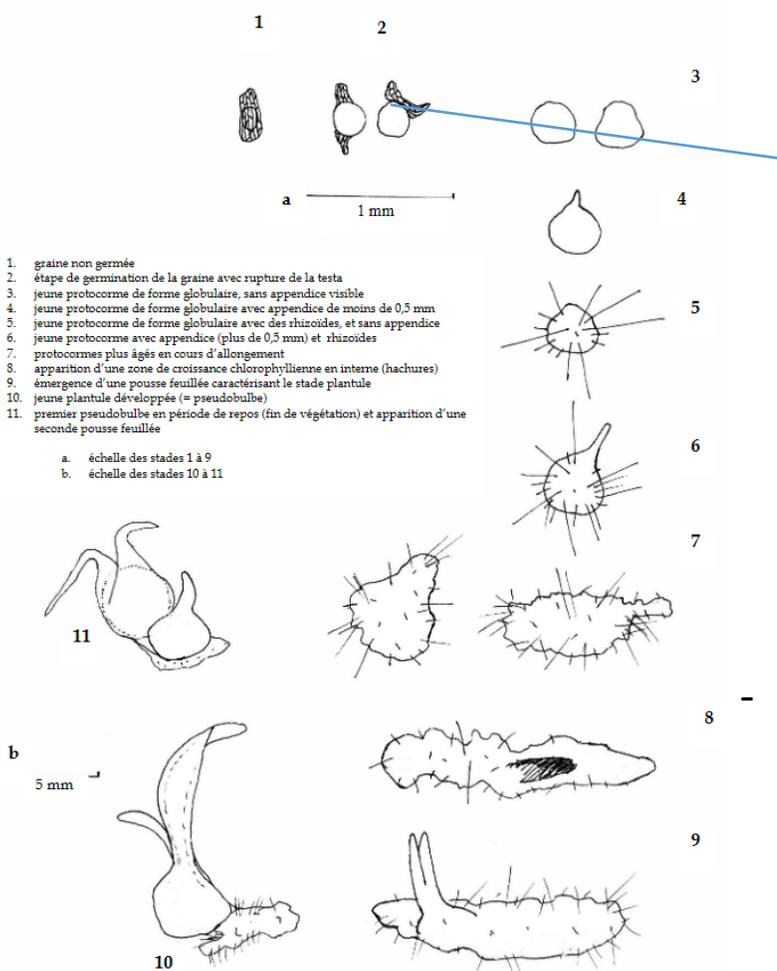
Marais de Cormicy (Cormicy, 51)
Marais du Vivier (Chénay, 51)



- *Vérification de la qualité des lots de semences : mise au point des tests de germination*
- Etude du maintien des capacités de germination au cours du processus de conservation (tests réguliers pour le choix du mode de conservation le plus approprié)
- *Méthode d'amplification*



Éléments sur la biologie des semences et la culture du Liparis de Loesel



Graine = embryon entouré d'une épaisse couche cellulaire hydrophobe (testa)

➡ Germination de la graine = franchir la testa

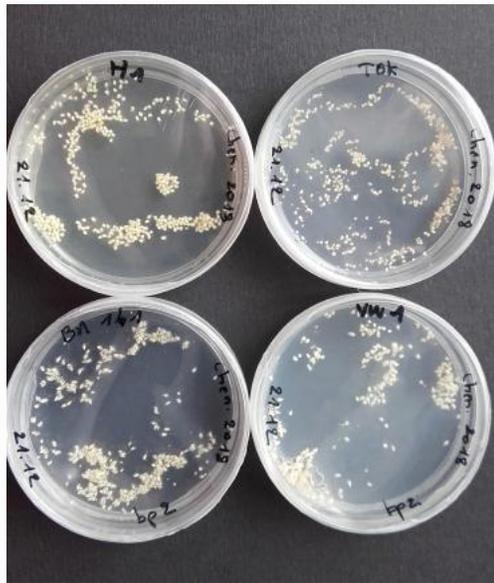
- *In natura* : intervention d'un champignon endophyte (endosymbiote) : pénétration des filaments et imbibition de l'embryon. Lyse progressive de la paroi (micro-organismes, érosion physique)

VOIE SYMBIOTIQUE

- *Ex situ* : utilisation d'agents chimiques agressifs (hypochlorite de calcium 5%).

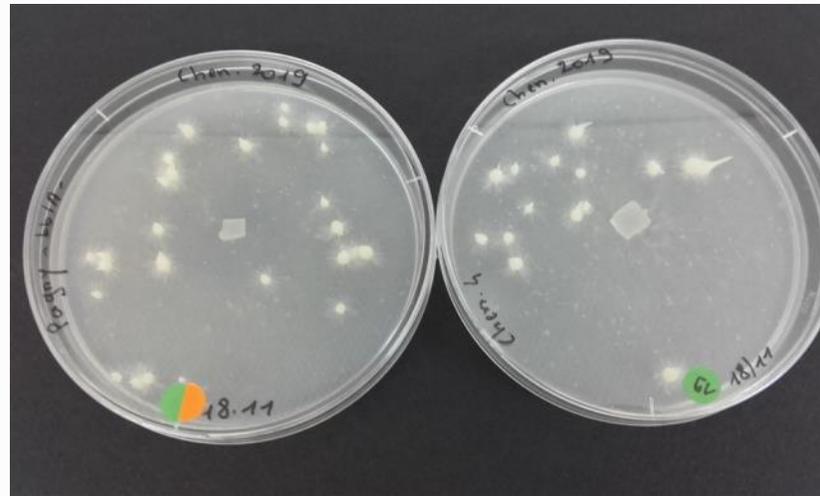
VOIE ASYMBIOTIQUE (micro/macro-éléments, vitamines)+ SYMBIOTIQUE

Semis asymbiotique



- Graines de Chénay
- Graines de Pagny-sur-Meuse
- Graines de Merlimont (62)
- Différents milieux de culture

Semis symbiotique



- Graines de Chénay
- Différents champignons isolés par prélèvement:
 - Chénay
 - Prague
 - Pagny-sur-Meuse
 - Marais du Vallin et du Pontet (73)
- Milieu avoine

Test de culture phases post-germination (repiquage, acclimatation etc.)



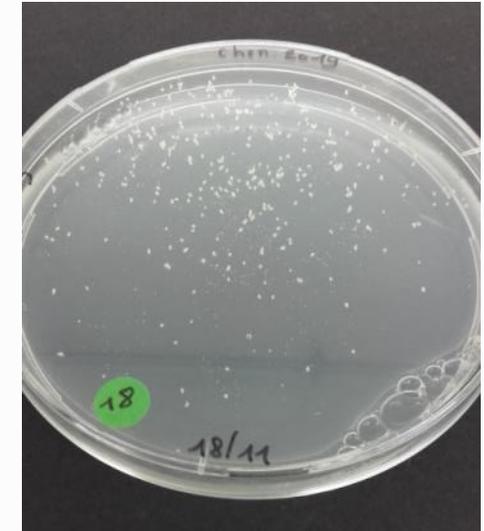
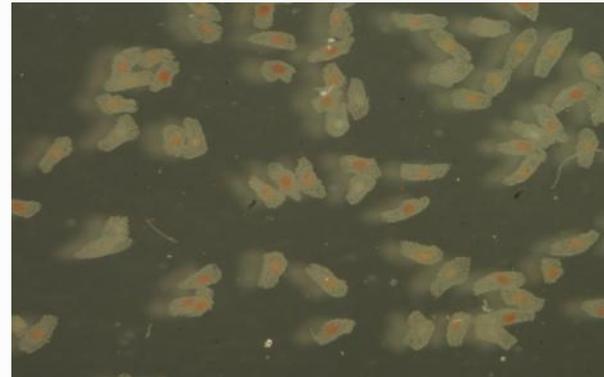
- Protocormes reçus de Prague
- Application sur les protocormes issus de Chénay

Tests de germination asymbiotiques

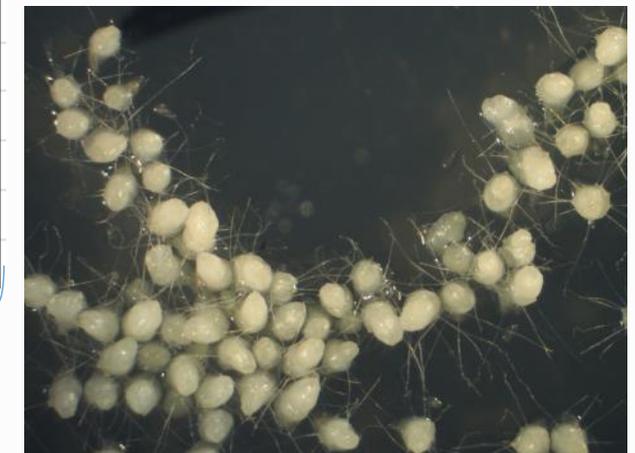
- **Premiers tests** sur lots de semences du Marais du Vivier de 2013 et 2015 : **0%**.
- **Tests supplémentaires** avec l'utilisation de milieux de culture différents, toujours sur lots de semences du Marais du Vivier de 2016 : **0%**.
- **Troisième série d'essais** sur lot de semences du Marais du Vivier de 2017.

- Test préalable de viabilité (TZT) : **75%**.

- Test sur 4 milieux différents



Milieux	Stades de développement						
	Gt° stade 1	Stade 1 +	Stade 2 +	Stade 3	Stade 4	Stade 5	Plantule
BM 141 (AS)	71,43	52,03	50,74	*	*	*	*
VW (AS)	69,93	55,03	46,67	*	*	*	*
H (AS)	61,05	48,05	44,58	*	*	*	*
Tok (AS)	65,45	47,56	45,81	*	*	*	*



Grande variabilité des viabilités des lots en interannuel (récoltes plusieurs années)

Passage en milieu symbiotique pour accélérer le développement

Tests de germination asymbiotiques

Milieu Van Waes J.M. & Debergh P.C. (1986) = VW (culture asymbiotique)

In vitro gt^o of some Western European orchids. *Physiol. Plant.*, 67 : 253 – 261

Macro-éléments Thomale GD (1954) modifié*

KNO₃ 400 mg/L

NH₄NO₃ 370

KH₂PO₄ 300

(NH₄)₂SO₄ 60

MgSO₄·7H₂O 100

Micro-éléments Nitsch & Nitsch (1969)

MnSO₄·4H₂O 25 mg/L

H₃BO₃ 10

ZnSO₄·7H₂O 10

Na₂MoO₄·2H₂O 0.25

CuSO₄·5H₂O 0.025

CoCl₂·6H₂O 0.025

Composition type des milieux de culture

Vitamines Nitsch & Nitsch (1965)

Thiamine HCl 0.5 mg/L

Acide nicotinique 5

Pyridoxine HCl 0.5

Biotine 0.05

Acide folique 0.5

L-glycine 2.0

*Fe-EDTA MS (1962) 36.70

Source de carbohydrates

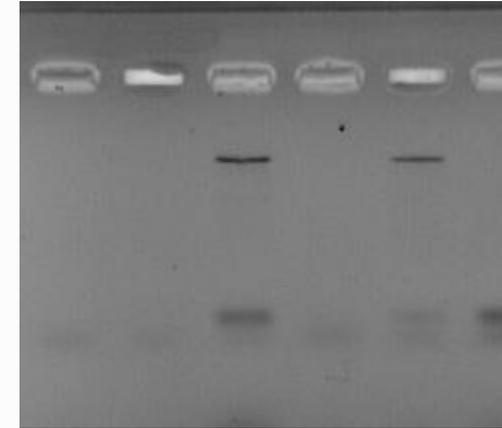
Saccharose 20 g/L

Agar 8 g/L

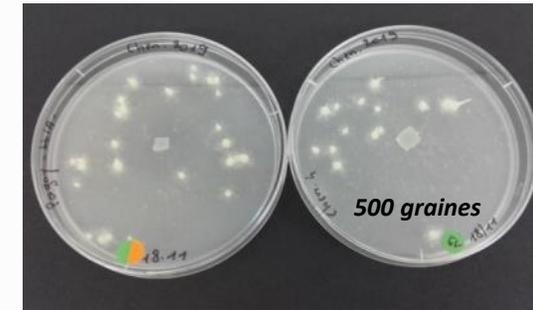
pH 5.8

Tests de germination/semis symbiotiques

- **Essai d'isolement du symbiote** inféodé à Liparis à partir de la mise en culture de fragments de racines prélevés sur 2 individus du Marais du Vivier. **Echec (isolement d'une souche non compatible - fructifications visibles -)**
- **Deuxième essai**, toujours à partir de racines du Marais du Vivier : isolement Mucoromycète (non compatible) et Rhizoctonia (mais non isolable du premier). **Echec.**



➤ **Etude de la colonisation mycorhizienne** par comparaison de racines, pseudobulbes adultes et pseudobulbes en formation (les plus largement infectés car non chlorophylliens).



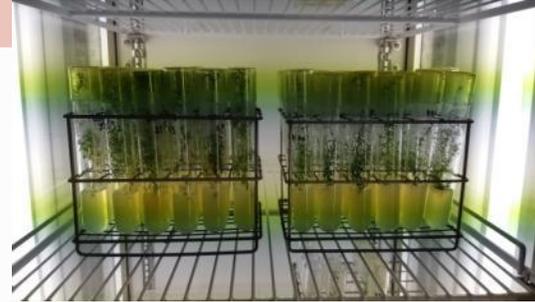
➤ **Mise en culture de fragments de pseudobulbes** et **obtention de 4 souches** pour les individus du Marais du Vivier. **Essai d'identification moléculaire** sur ces souches et sur l'ADN extrait directement des plantes mycorhizées. **Champignons du groupe des Tulasnellaceae.**

- **Troisième essai** avec la souche Chénay 4 (Tulasnellaceae) : obtention de **60% de germination.**

Milieux	Stades de développement						
	Gt° stade 1	Stade 1 +	Stade 2+	Stade 3	Stade 4	Stade 5	Plantule
Chen. 1 (S)	20,05	8,52	0	0	0	0	0
Chen. 2 (S)	30,23	7,56	1,25	0,75	0,75	0,75	0,75
Chen. 3-1 (S)	13,21	4,02	0	0	0	0	0
Chen. 3-2 (S)	11,19	0	0	0	0	0	0
Chen. 4 (S)	62,4	15,7	7	6,9	6,9	6,9	6,9
Pont 2-1 (S)	8,25	0	0	0	0	0	0
Pont 2-2 (S)	5,23	0	0	0	0	0	0
Pont 5 (S)	14,56	13,25	0	0	0	0	0
Pont 6 (S)	23,84	19,95	0	0	0	0	0
Lip. E (S)	40,26	27,96	0	0	0	0	0
LVA3 (S)	37,27	33,57	0	0	0	0	0
Pagny 2019* (S)	58,93	53,57	5,36	5,36	5,36	**	**

Culture d'individus feuillés

- Récupération de quelques dizaines de protocormes de Tchèque.
- Repiquage boîte de Pétri puis en tube (milieu avoine) et culture en phytotron.
- Repiquage en boîte sur substrat stérilisé (acclimatation).
- Passage en jardin.
- Une 100^{aine} d'individus de Chénay en culture.



- Espèce de **culture complexe**
- **Hétérogénéité interannuelle** de la viabilité des lots de semences
- Approche des itinéraires techniques « population-centrée » : **graines et symbiotes locaux**
- En cas d'autres populations concernées : **meilleure connaissance du matériel végétal à prélever** pour identifier le symbiote (pseudobulbe jeune hétérotrophe). Symbiote de Pagny-sur-Meuse efficace sur graines de Chénay, mais préférence au local
- **Privilégier l'approche « tout symbiotique »** si l'objectif est de produire des pieds adultes (passage délicat des protocormes obtenus en asymbiotique en milieu symbiotique)
- **Bonne maîtrise du test de germination simple** (évaluation viabilité d'un lot avant le stockage en banque de semences)
- **Délai d'obtention d'une collection d'individus sur pieds transférables *in vivo* : 16 mois** (deux cycles de végétation *in vitro* permettant d'obtenir des pseudobulbes de taille supérieure facilitant le sevrage).