

Création d'un chèvrefeuille nain à partir d'un cultivar grimpant par mutagenèse *in vitro*

Joseph Belin¹

Résumé : Depuis plus de 15 ans, sur le centre Inra d'Angers, nous créons et sélectionnons des chèvrefeuilles pour enrichir la gamme horticole et répondre ainsi à la demande des consommateurs. Dans cette espèce, nous recherchons des cultivars homogènes et stables, résistants aux bio-agresseurs avec des ports compacts qui conviennent mieux aux petits jardins d'aujourd'hui. Pour atteindre nos objectifs nous avons utilisé la mutagenèse *in vitro* et la déchimérisation de mutants chimériques. Nous avons effectué le travail en deux étapes ; d'abord, nous avons irradié un chèvrefeuille sarmenteux qui a engendré un mutant chimérique, le L115 ; ensuite, nous avons déchimérisé ce mutant qui en a produit 9 autres dont le L553. Actuellement en cours d'expérimentation, le L553, dont l'ancêtre est un chèvrefeuille grimpant de trois à quatre mètres de haut, ne mesure pas plus de cinquante centimètres. Il prospère sans support, il est résistant aux pucerons et à l'oïdium et son port compact permet d'en faire une plante en pot. Pour être commercialisé, ce petit chèvrefeuille devra satisfaire aux exigences expérimentales des pépiniéristes.

Mots clés: Chèvrefeuille, *Lonicera*, culture *in vitro*, mutagenèse, dose d'irradiation, mutant, chimère, déchimérisation

Introduction

Aujourd'hui, les consommateurs recherchent des arbustes à vigueur réduite et au port compact pour orner les balcons, les terrasses et les petits jardins. Le chèvrefeuille subit, lui aussi, cette tendance. Pour répondre à cette demande, notre laboratoire d'Amélioration des Arbustes d'Ornement du Centre d'Angers, en collaboration avec les professionnels de la pépinière, travaille, depuis 15 ans déjà, à la création de nouveaux chèvrefeuilles.

Les objectifs que nous recherchons sont, d'une part, la résistance aux bio-agresseurs et, d'autre part, des ports compacts mieux adaptés aux besoins actuels. Cependant ces caractères génétiques doivent être réunis au sein d'un même génotype homogène et stable.

Pour atteindre ces objectifs nous aurions pu utiliser la méthode ancienne de la mutagenèse *in vivo*, mais le méristème contenu dans le bourgeon végétatif est mille fois plus gros que celui du bourgeon *in vitro* et, une première solution pour obtenir plus facilement des mutants homogènes est la diminution de la taille de la cible. Un méristème *in vitro* présente donc plusieurs avantages : les chances de survie de la cellule mutée sont plus grandes dans cet environnement maîtrisée, l'obtention de chimères est diminuée car les rayonnements atteignent plus facilement les cellules méristématiques qui reconstitueront la plantule mutée.

Le chèvrefeuille, de nom latin *Lonicera*, appartient à la famille des caprifoliacées. Ce nom vulgaire de chèvrefeuille remonterait au Moyen Age en référence au goût prononcé des chèvres pour les feuilles de cet arbrisseau.

Environ 200 espèces existent dans le monde, en France seulement 9 espèces poussent spontanément : 4 grimpantes et 5 arbustives.

Le chèvrefeuille grimpant est une plante encombrante, qui ne peut être utilisée que pour orner des grilles, des tonnelles ou des grands espaces.

¹ Inra-INH : UMR GenHort (Génétique et horticulture) ☎ 0241225786 ✉ joseph.belin@angers.inra.fr

Nous avons donc opté pour la technique plus récente de la mutagenèse *in vitro* à laquelle nous avons ajouté la *déchimérisation*. Le but de la *déchimérisation* est d'obtenir un mutant homogène et stable car une plante chimérique entraîne l'impossibilité de la commercialiser. C'est J. Cambededes, lors de sa thèse en 1991 (Cambededes J., 1991), qui a mis au point pour la première fois cette technique combinée de mutagenèse et de culture *in vitro*, en irradiant au Cobalt 60 des bourgeons de chèvrefeuille. Bien que cette nouvelle méthode ait considérablement amélioré les performances de la mutagenèse, elle n'a toutefois pas empêché les chimères. Rappelons-le, une plante en chimère exprime sur le même génotype à la fois la mutation et le phénotype de la variété d'origine. J.Cambededes avait donc obtenu des chèvrefeuilles mutés mais malheureusement pas tous viables : certains ont vu leurs chromosomes trop perturbés par les mutations; d'autres, potentiellement intéressants étaient en chimères; enfin pour le reste des mutants, ils n'apportaient pas d'amélioration tangibles par rapport à la variété d'origine.

En 1994, nous avons réinitialisé un programme de création variétale par mutagenèse et nous l'avons mené en deux temps : d'abord l'irradiation d'un chèvrefeuille grimpant, selon la méthodologie de J. Cambededes, qui a fourni un mutant chimérique, le L115 ; puis, la mise en place de quatre processus de *déchimérisation* appliqués au L115 qui a généré 9 autres mutants dont un compact, le L553

Ce nouveau chèvrefeuille L553 est conforme à nos objectifs. Depuis 5 ans, dans nos conditions d'expérimentations, il s'est avéré homogène et stable, résistant aux pucerons et aux taches blanches provoquées par l'oïdium. Il est nain avec un port en boule, sa floraison est très abondante et très parfumée et il a la capacité à faire une plante en pot.

Avant de faire une variété commerciale, ce joli chèvrefeuille doit satisfaire aux exigences expérimentales qui sont en cours dans les entreprises de nos partenaires.



Photo 1: *Lonicera japonica* 'Hall's Prolific' grimpant de plusieurs mètres de haut © J.Belin



Photo 2: Détail des fleurs de *Lonicera japonica* 'Hall's Prolific' © J.Belin

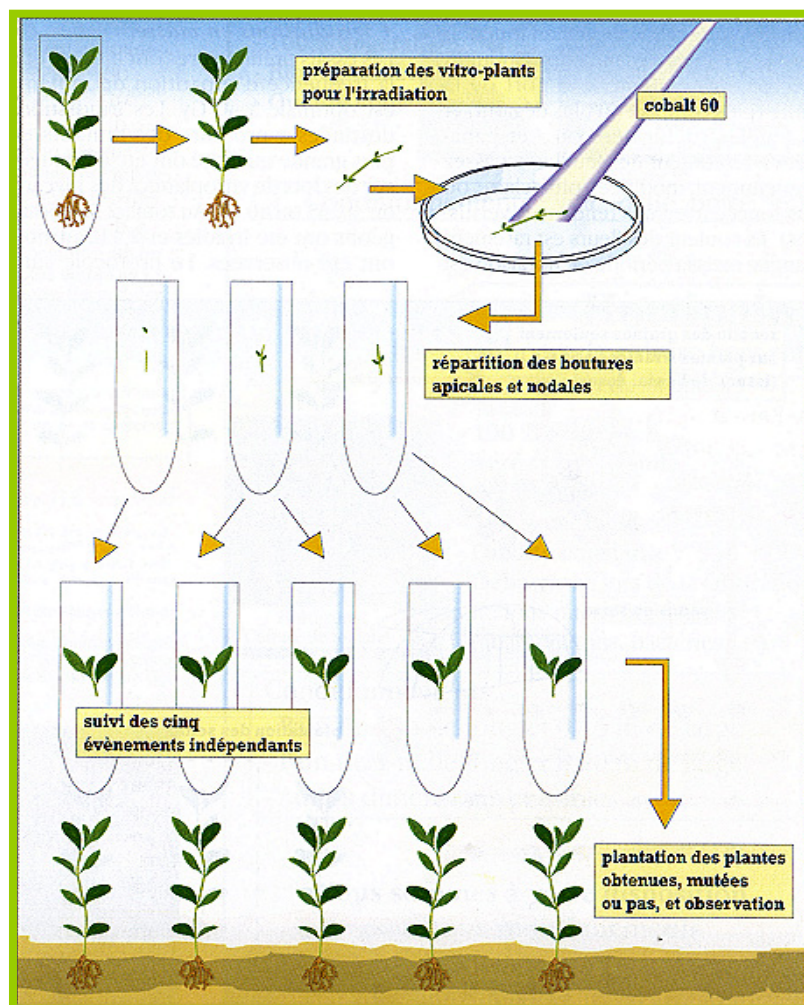


Schéma 1 : Représentation des étapes de culture in vitro nécessaires pour obtenir le maximum de bourgeons portant ou non des mutations induites.

1. Matériel et méthode

1.1 Le matériel végétal

Le génotype traité est le *Lonicera japonica* 'Hall's Prolific' (**Photos 1 et 2**) répertorié dans notre collection sous le code de L80. Il a été choisi pour sa floribondité et son parfum que nous envisageons de transmettre à ses mutants.

1.2 L'équipement technique

Pour réaliser les irradiations, nous avons combiné l'utilisation de la culture in vitro et l'application d'agent mutagène physique. Ce choix pour les rayons gamma du cobalt 60 venait du fait que le Centre Hospitalier Universitaire d'Angers entretenait une collaboration scientifique avec notre laboratoire mettant ainsi à notre disposition un équipement de radiothérapie très performant. Toutefois, les végétaux à irradier devaient représenter une faible surface (**Photo 3**) et devaient être en milieu stérile. La culture *in vitro* du *Lonicera* répondait tout à fait à ces exigences.



Photo 3: Appareil de radiothérapie : le champ d'irradiation est petit, il correspond à la surface de la boîte en polystyrène blanc. Seulement quelques boîtes de Pétri peuvent être irradiées en même temps.

1.3. Les étapes

Nous avons mené ce programme de recherche en 2 étapes :

- l'irradiation du *Lonicera japonica* 'Hall's Prolific' selon la méthode de J.Cambececes. Cette irradiation a engendré le L115, compact mais en chimère ;
- la mise en place de quatre processus de *déchimérisation* appliqués au L115 qui ont produit 9 mutants dont le L553.

1.3.a 1^{ère} Etape : Irradiation du *Lonicera japonica* 'Hall's Prolific' (L80)

- Préparation du végétal pour l'irradiation

La préparation des plantes avant l'irradiation consiste à retirer les racines et les feuilles pour exposer uniformément les bourgeons aux rayonnements. Seule la tige comprenant l'extrémité apicale et 2 noeuds est conservée et déposée à plat dans des boîtes de Pétri contenant le milieu de culture habituel. La culture *in vitro* du chèvrefeuille qui consiste à cultiver les plantes en tube et en milieu stérile a été mise au point par Cambececes en 1991 (Cambececes J., 1991). Le milieu Woody Plant Medium (Lloyd et Mc Cown, 1980) additionné de 3g/l de charbon actif et sans hormone est utilisé à tous les stades de l'expérimentation.

- Les traitements mutagènes

Les irradiations ont été délivrées par exposition des explants aux rayonnements gamma de la source de cobalt 60 du centre anticancéreux Paul Papin à Angers. Les rayonnements ionisants, appliqués à des cellules végétales, provoquent des cassures et des réparations aléatoires au niveau des chromosomes engendrant ainsi les mutations. Les 5 doses que nous avons choisies correspondaient à 20, 30, 40, 50 et 60 grays [un gray (Gy) = 100 rads = 1 joule par kilogramme]. Pour chaque dose, une seule boîte de pétri contenant 12 tiges de L80 a suffi; ainsi l'irradiation au centre de radiothérapie fut très aisée. Ces doses ont permis d'évaluer la radiosensibilité du végétal et de déterminer sa DL 50 (dose létale 50). En général, la dose retenue pour des irradiations à but de sélection est celle qui assure la survie de 50 % des bourgeons ou dose létale 50.

- Développement des bourgeons irradiés

Moins de 12 heures après l'irradiation, les boutures sont repiquées sur le milieu de multiplication habituel. Pour récupérer le maximum de plantes portant des mutations, elles sont sectionnées en 3, la bouture apicale et deux boutures nodales comprenant chacune deux

bourgeons axillaires. Au total, chaque plante irradiée en a produit 5, correspondant à 5 événements indépendants. L'impact des rayonnements fut suivi séparément.

- Effectif des bourgeons traités, nombre de vivants et nombre de mutants

En tout, 60 plantes *in vitro* ont été exposées au rayonnement Gamma (tableau 1), soit 300 bourgeons. Les témoins non irradiés se composaient d'un lot de boutures conduites de la même façon que les boutures à irradier. Les témoins sont indispensables dans ces expérimentations pour révéler les effets de l'irradiation. Après 6 mois de culture *in vitro*, les plantes sont acclimatées en serre puis repotées en conteneurs avant d'être plantées en plein champ.

Géotypes irradiés	Doses d'irradiation -----}	20 Gy	30Gy	40 Gy	50 Gy	60 Gy
<i>Lonicera japonica</i> 'Hall's Prolific' (300 bourgeons)	Nombre de bourgeons irradiés	60	60	60	60	60
	Bourgeons vivants, plantes au champ	60	60	60	48	20
	Nombre de mutants	0	5	8	10	15

Tableau 1 : *Quantité de bourgeons irradiés – nombre de survivants – nombre de mutants*

☞ **Premier résultat : obtention du L115**

La gamme de doses que nous avons appliquée a permis de situer la DL50 du chèvrefeuille L80 autour de 55Gy. Les doses que nous avons utilisées sont très élevées par rapport à celles appliquées sur les cellules animales. Certains articles rapportent que des doses de 5 à 10 Gy peuvent être mortelles pour certains organes animaux.

Lors des observations portant sur la survie (**figure 1**), dans les mois qui ont suivi l'irradiation, nous avons noté un effet dose. La notion de survie est l'aptitude des bourgeons à engendrer une pousse supérieure ou égale à 1cm, deux mois après l'irradiation. Nous avons observé que les bourgeons apicaux étaient repartis moins vite que les bourgeons des boutures nodales. Cette différence de tolérance des bourgeons aux rayonnements avait déjà été observée sur Weigela (Duron et Decourtye, communication personnelle, Inra Angers). La survie de L80 a commencé à chuter après 40Gy, mais elle était encore de plus de 25% à 60Gy.

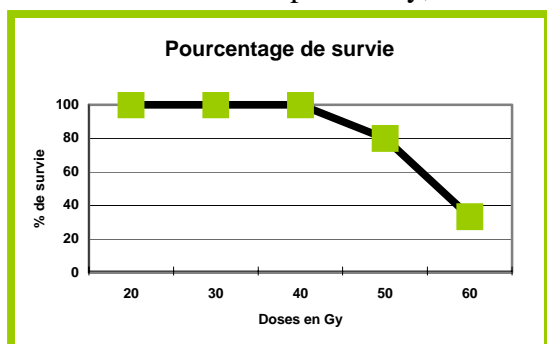


Figure 1 : *Pourcentage de survie*

L'évolution en culture *in vitro* des bourgeons irradiés fut suivie pendant 6 mois pour déceler les mutants éventuels, et elle s'est poursuivie à l'extérieur par l'observation des plantes issues de ces bourgeons. Nous avons observé que plus la dose d'irradiation s'accroît plus le nombre de plantes vivantes diminue, en revanche, le nombre de mutants augmente jusqu'à la dose létale. Effectivement, c'est à la dose de 60 Gy que nous avons observé le plus de mutants (**figure 2**) ; cependant, ils n'étaient pas tous viables car trop perturbés par les mutations.

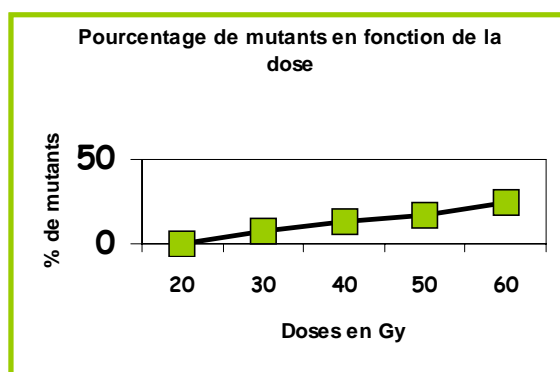


Figure 2 : Pourcentage de mutants en fonction de la

dose

Nous avons élevé 248 plantes en conteneurs, puis nous les avons plantées en plein champ. Les observations faites, d'abord, au stade conteneur et ensuite en pleine terre, nous ont permis de repérer 38 mutants. Les mutations observées chez les mutants du L80 se situent souvent sur :

- les feuilles avec des déformations, des panachures jaunes ou blanchâtres, des allongements rendant le limbe plus fin ;
- les fleurs avec parfois la modification de la couleur, ou l'absence de floraison et du parfum;
- le port avec des tiges aux entrenœuds plus courts conférant un aspect compact ou au contraire des branches plus souples donnant l'impression d'une suspension ;
- la sensibilité aux maladies.

C'est parmi ces 38 mutants que nous avons sélectionné le L115 qui correspondait à nos objectifs. Cette plante à l'état adulte prospérait sans support car elle ne mesurait pas plus de 50 cm. Sa floraison était tout aussi abondante et odorante que chez son parent le L80. Malheureusement, elle présentait un génotype en chimère ; des rameaux sarmenteux réapparaissaient lors de la multiplication par bouturage. Cet état a deux conséquences :

- l'impossibilité de protéger cette sélection par Certificat d'Obtention Végétale ;
- le risque de perte de la variété en entreprise lors des bouturages intensifs à partir des plantes porte-boutures.

1.3.b 2^{ème} Etape : Mise en œuvre de 4 processus de *déchimérisation* visant à stabiliser le L115 (schéma 2)

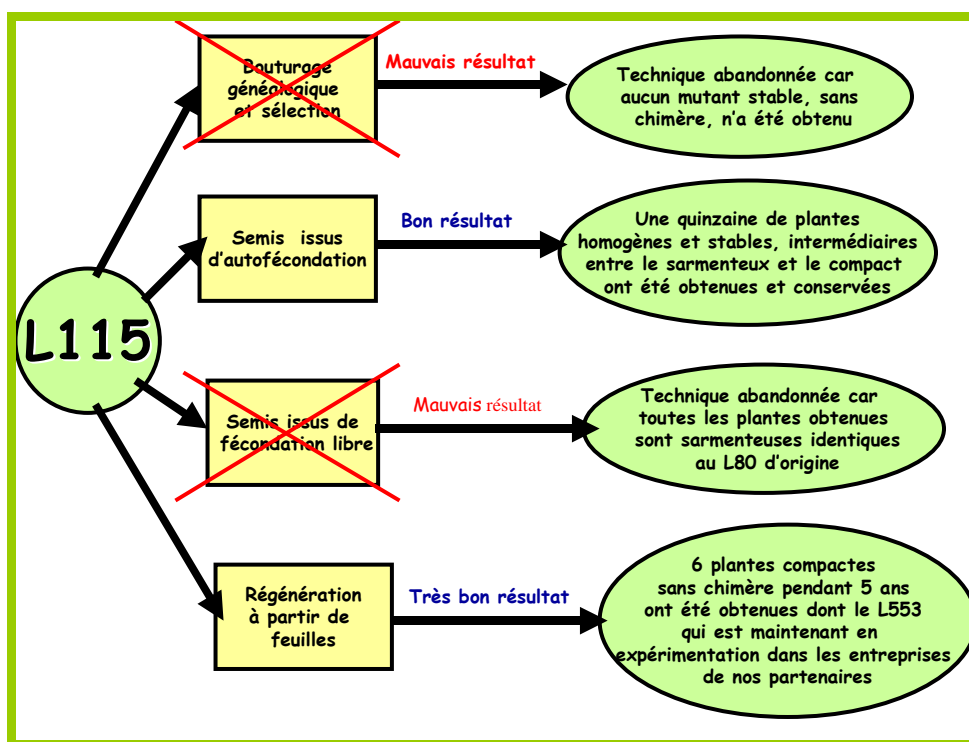


Schéma 2: Travaux réalisés pour déchimériser le L115

L'objectif de ce travail était de conserver les qualités du mutant L115 et d'éliminer ses chimères.

- Bouturage 'généalogique' du mutant L115

Il s'agit de réaliser une sélection généalogique sur boutures. A partir de la plante mutée, des boutures sont réalisées et observées. Toutes les plantes présentant des chimères sont éliminées et les autres sont re-bouturées pour constituer des clones dont l'origine précise est connue. Toutes les plantes homogènes de ces clones sont de nouveau bouturées et observées. Seuls les individus homogènes et stables sont conservés. Ce cycle répété 4 ou 5 fois, permet d'écartier au maximum les plantes en chimères. Cette technique ne nous a pas permis d'aboutir à un mutant stable, car des retours au type parental, avec des rameaux sarmenteux, se sont produits quelques fois.

- Semis issus d'autofécondations du mutant L115

Sur les 500 fleurs autofécondées, nous avons pu récupérer moins de 50 plantes dont une quinzaine sont moins sarmenteuses que le parent et moins compactes que le L115. Cependant, 3 plantes de 1,2 mètre de haut environ, homogènes et stables, apportaient un intermédiaire sérieux entre le parent sarmenteux L80 et le compact L115.

- Semis issus de fécondations libres du mutant L115

Toute la descendance issue des graines s'est avérée sarmenteuse, identique au parent L80. Nous avons donc abandonné cette technique.

- Régénération adventive du mutant L115

Cette technique *in vitro* permet de reproduire des bourgeons à partir d'explants indifférenciés, comme des feuilles ou des tiges par exemple, sous l'influence d'hormones. Le chèvrefeuille étant récalcitrant à la régénération, 14 expérimentations ont été nécessaires pour mettre en culture *in vitro* 3 000 feuilles et 1 000 entre-nœuds de tige sur 53 milieux différents. Malgré ces efforts, le meilleur taux de régénération n'a pas dépassé 30 %. Avec les feuilles du L115, nous n'avons obtenu que 42 plantes. Parmi celles-ci, 6 avaient le phénotype compact du L115 et un seul a retenu notre attention : le L553 ; il était plus florifère que les 5 autres et son feuillage était plus sain.

☞ Deuxième résultat : obtention du L553 et des autres

Les différentes techniques de *déchimérisation* du L115 que nous avons mises en oeuvre, ont abouti à 9 mutants. 3 ne répondaient pas totalement à nos attentes mais leur phénotype, intermédiaire entre le sarmenteux L80 et le compact L115, diversifiait la gamme. En plus, ils étaient issus de la *déchimérisation* par autofécondation et de ce fait ils étaient homogènes et stables.

Quant au L553 obtenu grâce au travail de *déchimérisation* du L115 par régénération adventive, il était conforme à nos objectifs, dans nos conditions d'expérimentation. Il est résistant aux pucerons et à l'oïdium, il a un port compact et une floraison abondante et parfumée, il a la capacité à faire une plante en pot. Actuellement, il est en expérimentation dans les pépinières de nos partenaires. Avant de pouvoir être commercialisée, cette jolie plante naine devra satisfaire aux exigences expérimentales des professionnels : facilité de bouturage, aptitude au développement en milieu très azoté, obtention rapide de plants vendables tout en conservant ses spécificités.

Conclusion

Ces quatre dernières décennies, la mutagenèse a produit de nombreuses obtentions commerciales en pépinière ornementale. Parmi les ligneux d'ornement qui ont vu leur gamme variétale s'élargir, on peut citer les rosiers depuis les années 60-70, les azalées, les abélias, les daphnés, les forsythias, les jasmins, les weigelas, plus récemment les caryoptéris et maintenant les chèvrefeuilles.

Ce travail de mutagenèse sur chèvrefeuille a également fourni des résultats scientifiques et 9 mutants dont 4 sont en expérimentation chez les pépiniéristes. Les 3 mutants issus de la *déchimérisation* par autofécondation du L115 ne suscitent pas d'intérêt commercial dans l'immédiat, ils ont cependant l'avantage d'être homogènes et stables.

Le L553 est, quant à lui, très convoité. Si les résultats des expérimentations chez les pépiniéristes sont confirmés, il fera une nouvelle variété commerciale.

Comment choisit-on l'organe à irradier ?

Il faut que cet organe soit capable de reproduire facilement une plante (Duron et Decourtye, 1986). L'idéal serait la régénération de la plante entière à partir d'une seule cellule préalablement irradiée. Cela est d'autant plus envisageable que l'origine unicellulaire de la néoformation de bourgeons adventifs a été démontrée chez plusieurs espèces.

L'efficacité de la mutagenèse, en termes de mutants, pourrait être améliorée en adoptant des stratégies différentes. Par exemple, l'irradiation d'explants indifférenciés comme des rondelles de tige, des fragments de feuille, des parties de pétiole ou des cellules isolées, suivie d'un bourgeonnement adventif *in vitro*, est vraisemblablement plus producteur de mutants stables. Cependant, cette technique nécessite d'abord, de maîtriser parfaitement la régénération adventive.

Dans le nouveau programme de mutagenèse *in vitro*, engagé depuis 2005 dans nos laboratoires de l'Inra à Angers sur *Cytisus*, la régénération adventive est parfaitement maîtrisée sur certains génotypes de genêt alors nous testons la mutagenèse sur explants indifférenciés. Nous espérons ainsi obtenir des mutants sans chimère, homogènes et stables.

Remerciements : *Je tiens à remercier Bernard Dixon, du Centre anticancéreux d'Angers, pour sa contribution à la réalisation des irradiations de bourgeons de chèvrefeuille ; Luc Decourtye, ancien directeur du laboratoire, pour avoir initié ce travail ; Michel Duron, pour m'avoir formé en culture in vitro et transmis le goût pour cette technique ; Alain Cadic, responsable du laboratoire, pour son soutien sans faille et ses conseils avisés ; Véronique Bellenot-Kapusta, animatrice du groupe ornement, pour ses encouragements constants ; ainsi que tous les collègues du Laboratoire, des Installations Expérimentales et de l'Unité expérimentale.*

Bibliographie

- Cambececes J. (1991) Méthodologie de la mutagenèse *in vitro* du genre *Lonicera* ; Organogénèse et caractérisation de mutants. Thèse de Doctorat: Université d'Angers 135 p.
- Duron M. et Decourtye L. (1986) Effets biologique des rayons gamma appliquée à des plantes de *Weigela* cv.'Bristol ruby' cultivées *in vitro*. In: "Nuclear techniques and *in vitro* culture for plant improvement" International Atomic Energy Agency (Ed) Vienna 103-111.
- Lloyd G. Et Mc Cown B. (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceeding International Plant Propagators Society. 30,421-427.

