



A la recherche de méthodes alternatives aux tests biologiques classiques pour la détermination de la date de sortie d'endodormance : la quête du haut débit par le Groupe de Travail Dormance de Perpheclim et d'ODS



Marc Bonhomme¹, Jean Paul Charpentier², Vincent Segura², Luc Pâques², Jean Marc Audergon³, José Quero Garcia⁴, Elisabeth Dirlewanger⁴, Remi Beauvieux⁴, Bénédicte Wenden⁴, Jean Michel Legave⁵, Isabelle Farrera⁵, Hendrik Davi⁶, Frédéric Jean⁶, Isabelle Chuine⁷

Introduction

La caractérisation du niveau de dormance des bourgeons n'est actuellement possible que par l'utilisation de 2 tests biologiques : le test bouture de nœud isolé pour les bourgeons végétatifs principalement et le test Tabuenca, pour les bourgeons floraux.

Les 2 tests sont des tests de forçage dont la mise en œuvre est longue, couteuse en matériel végétal et temps d'observation, et pas toujours facile à interpréter.

Ces méthodes ne sont donc pas adaptées à du screening sur de larges effectifs.

Nous sommes par conséquent à la recherche de méthodes alternatives permettant cela

Introduction

La première approche envisagée est la spectrométrie proche infrarouge

En effet, l'évolution de l'état de dormance s'accompagne forcément d'une évolution de la composition chimique des tissus,

L'idée était de tester si ces changements étaient suffisamment importants pour se traduire en spectroscopie proche infrarouge et donc de voir si cette technique pourrait constituer une alternative aux tests biologiques, en étant plus rapide et simple à mettre en œuvre.

Introduction

La seconde approche est basée sur les travaux de Rinne et Van der Schoot concernant la présence de callose autour du méristème en période d'endodormance.

La disparition de la callose étant alors considérée comme synonyme de fin d'endodormance et de reprise des connexions symplasmiques

La troisième approche est basée sur l'évolution des glucides au sein des bourgeons.

Un exemple sur cerisier vous sera montré par Rémi Beauvieux

La spectrométrie proche infrarouge SPIR ou NIRS

Matériels et Méthodes

Le matériel végétal prélevé

Pour chaque espèce, nous avons prélevé des bourgeons et des portions des rameaux porteurs

L'étude a porté sur 5 espèces fruitières :

Pommier (Golden, bgs seulement, Montpellier)

Abricotier (2 variétés Bergeron et Rouge du Roussillon, Avignon)

Cerisier (Burlat, Bordeaux)

Pêcher (Redhaven, Clermont)

Noyer (Franquette, Clermont)

Et 2 espèces forestières :

Mélèze d'Europe (Clermont 2 sites et Orléans)

Mélèze du Japon (Orléans)

Hêtre (Clermont et Avignon, site du Ventoux, 3 placettes, 2 précocités par placette)

Matériels et Méthodes

La préparation du matériel végétal

Pour chaque espèce, les bourgeons et fragments de tiges ont été plongés dans l'azote liquide, conservés à -80°C, puis lyophilisés.

Ensuite les spectres ont été acquis

Sur bourgeons entiers

Sur tige grossièrement découpées

Les tiges et bourgeons ont ensuite été broyés pour obtenir une poudre fine

Les tiges ont été broyés sur le robot d'Orléans,

Les bourgeons, au froid, sur le broyeur à billes de Clermont (bols refroidis à l'azote liquide).

L'expérimentation a été renouvelée en 2013-2014 et 2014-2015

Matériels et Méthodes

L'acquisition des spectres IR

les spectres ont été acquis sur 2 équipements différents :

Le spectromètre Perkin à Transformé de Fourier d'Orléans :
(uniquement dans le proche infrarouge, sur la bande 4000-8000 cm^{-1} soit 1250 à 2500 nm)

Le spectromètre FOSS de l'INRA Clermont
(sur le visible et le proche infrarouge : 400-2500 nm)

Matériels et Méthodes

L'analyse des spectres IR

Pour l'instant, seuls les spectres issus du spectromètre Perkin à Transformé de Fourier d'Orléans ont fait l'objet d'une première analyse

L'analyse a été effectuée en utilisant un programme R développé par Vincent SEGURA intégrant un module de sélection de bandes par la méthode CARS (Li et al 2009)

L'idée étant :

1 - d'analyser la réponse sur les poudres de bourgeons en testant la corrélation entre valeurs de DMDs (test bouture) et spectre

2- de voir si on obtient une approximation suffisamment bonne en utilisant la poudre de la tige (plus facile à prélever et à traiter)

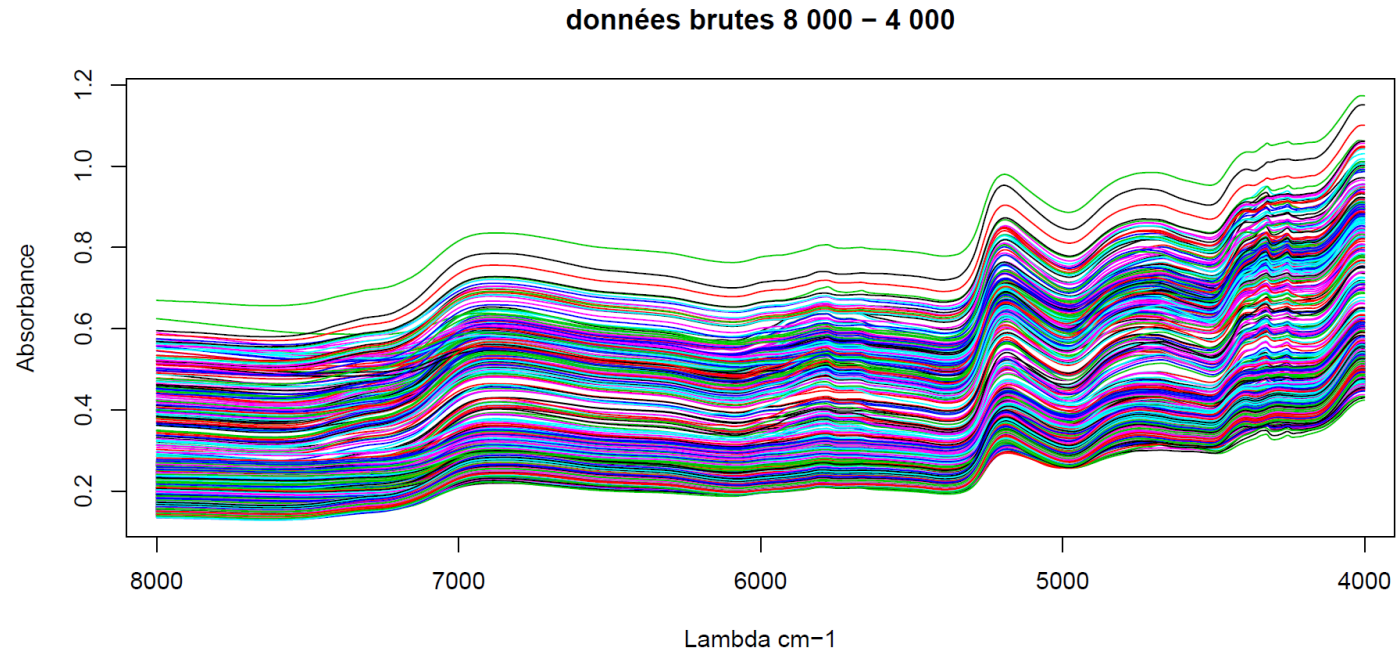
3- voir si on conserve une corrélation acceptable (quel niveau de dégradation) en travaillant

Sur bourgeons entiers

Sur tiges grossièrement broyées

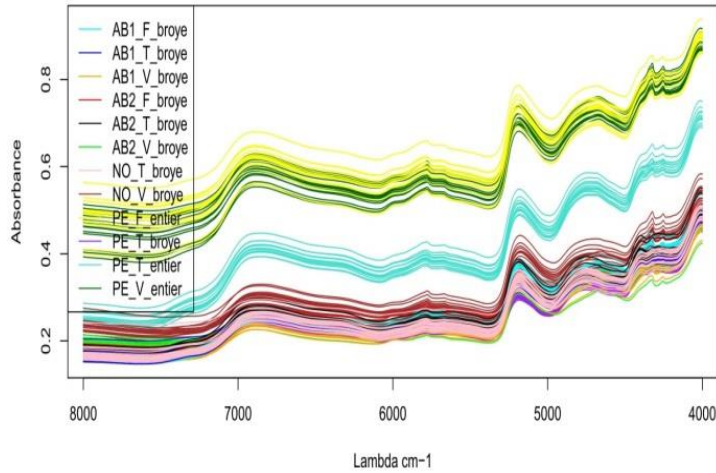
Résultats

Spectres en FTIR

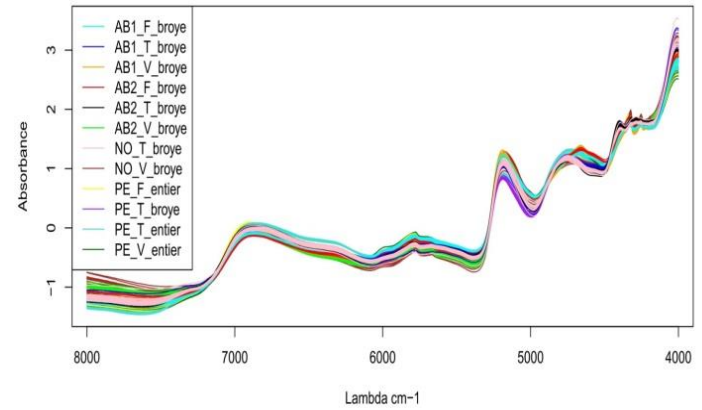


Pré-Traitements

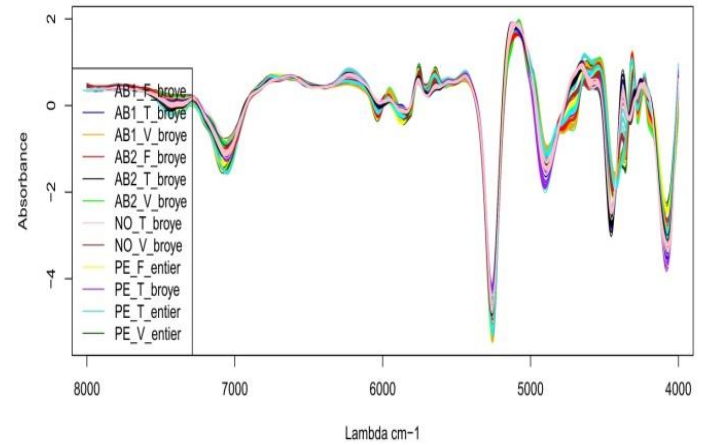
données brutes 8 000 - 4 000



Normalisation



Derivée 1^{ère} & Normalisation



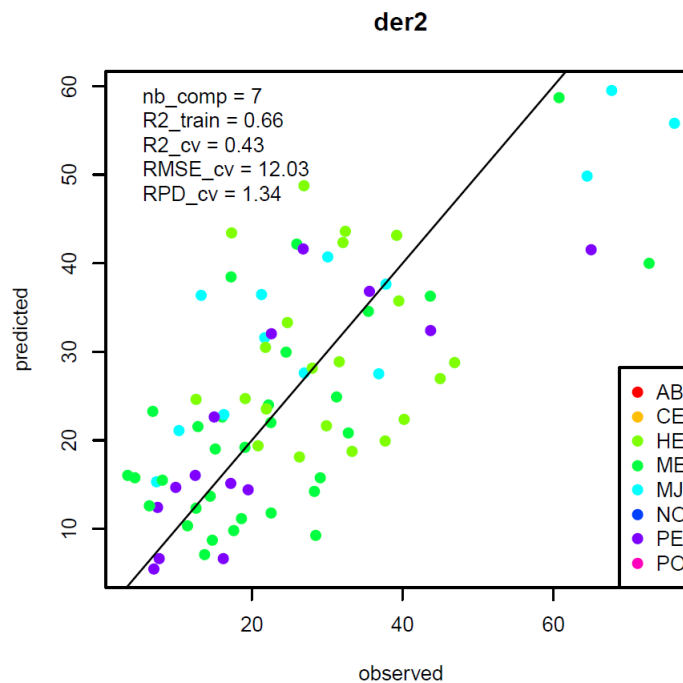
Résultats

Spectres en FTIR sur bourgeons entiers

Etat	Tissu	Esp	Effectif	pretr	nbcomp	R2_train	R2_MCCV	RMSE_MCCV	RPD_MCCV	nb_outliers	nb_lambda
Entier	V	HE, M, PE	80	der2	7	0.66	0.43	12.03	1.34	1	317
Entier	V	HE, M	66	der1	3	0.42	0.31	15.89	1.22	0	4
Entier	V	M	45	der2_norm	5	0.80	0.66	10.43	1.76	1	33

legende

RPD > 3	R2 > 0.9
2 < RPD < 3	0.75 < R2 < 0.9
1.5 < RPD < 2	0.55 < R2 < 0.75
RPD < 1.5	R2 < 0.55



Résultats

Spectres en FTIR sur poudres de bourgeons végétatifs

Etat	Tissu	Esp	Effectif	pretr	nbcomp	R2_train	R2_MCCV	RMSE_MCCV	RPD_MCCV	nb_outliers	nb_lambda
Broye	V	AB, CE, HE, M, NO, PE	236	der1	13	0.81	0.73	8.76	1.93	3	350
Broye	V	AB, CE, PE, PO	62	der2_norm	6	0.68	0.48	4.70	1.40	1	124
Broye	V	AB, CE, PE	51	norm	10	0.90	0.70	4.93	1.88	0	313
Broye	V	AB, PE, PO	47	der2_norm	7	0.92	0.83	2.88	2.51	1	46
Broye	V	HE, M, NO	174	der2_norm	12	0.89	0.82	7.74	2.35	3	126
Broye	V	HE	93	raw	10	0.90	0.83	7.71	2.48	0	365
Broye	V	M	62	der1_norm	10	0.96	0.91	6.15	3.37	0	117
Broye	V	HE, M, PE	80	norm	16	0.95	0.79	8.52	2.24	0	468

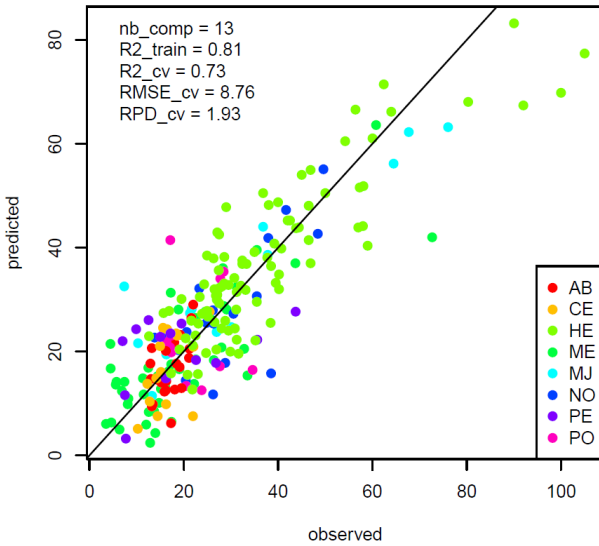
legende

RPD > 3	R2 > 0.9
2 < RPD < 3	0.75 < R2 < 0.9
1.5 < RPD < 2	0.55 < R2 < 0.75
RPD < 1.5	R2 < 0.55

Résultats

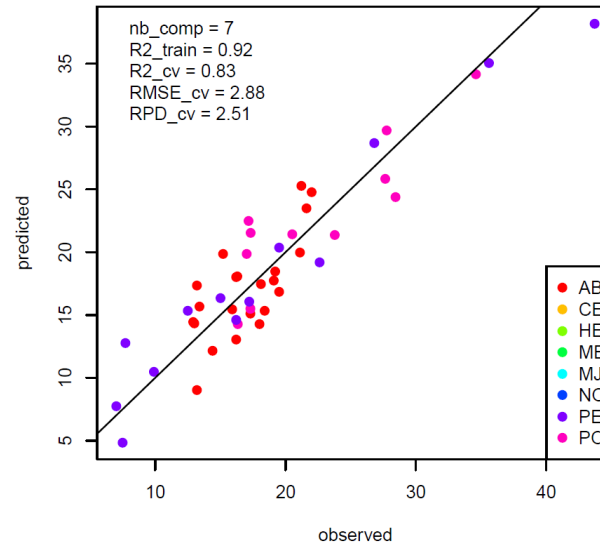
Spectres en FTIR sur poudres de bourgeons végétatifs

der1



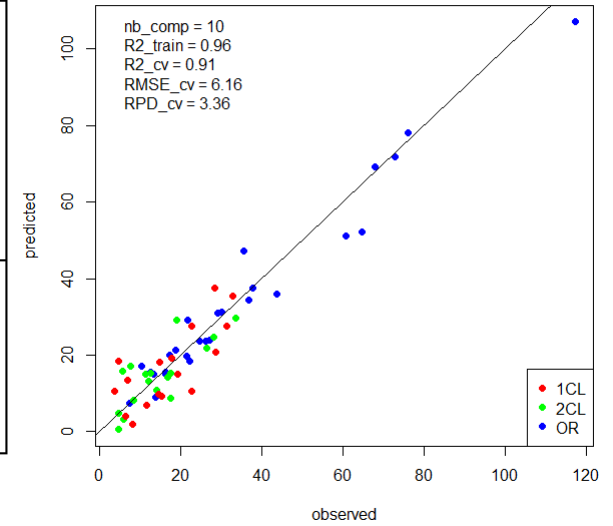
tous

der2_norm



AB - Abricotier
PE - Pêcher
PO - Pommier

der1_norm

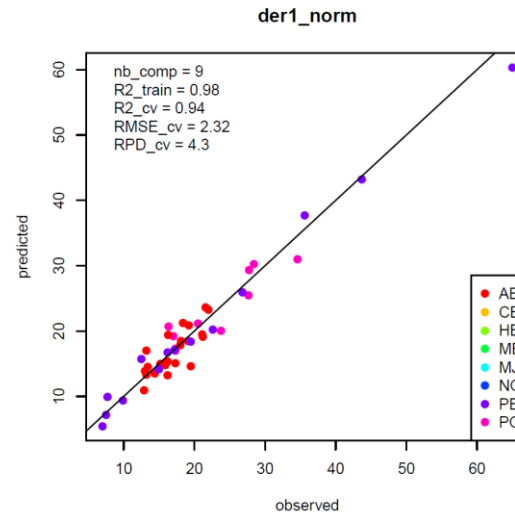


mélèze

Spectres en FTIR sur poudres de bourgeons floraux

Etat	Tissu	Esp	Effectif	pretr	nbcomp	R2_train	R2_MCCV	RMSE_MCCV	RPD_MCCV	nb_outliers	nb_lambda
Broye	F	AB, PE, PO	46	der1_norm	9	0.98	0.94	2.34	4.26	0	168

legende	
RPD > 3	R2 > 0.9
2 < RPD < 3	0.75 < R2 < 0.9
1.5 < RPD < 2	0.55 < R2 < 0.75
RPD < 1.5	R2 < 0.55



Conclusions

Tout est évidemment à consolider mais

Sur poudre, on obtient une bonne corrélation entre DMDs et Spectres

Pour les bourgeons floraux très bonne

Pour les bourgeons végétatifs assez bonne

Sur bourgeons entiers

C'est pas bon, il faut abandonner

Sur tiges grossières et poudres de tige

On dégrade mais cela pourrait rester acceptable pour du screening car rapide et facile à faire

**il semble quand même préférable de gérer par groupe d'espèce ou genre (comme les prunus)
mais cet aspect est encore à affiner**

Essais « Callose »

1 seul essai fait à Clermont, mais tard en saison (endodormance levée)

1 méthodologie très simple inspirée de l'observation de tubes polliniques

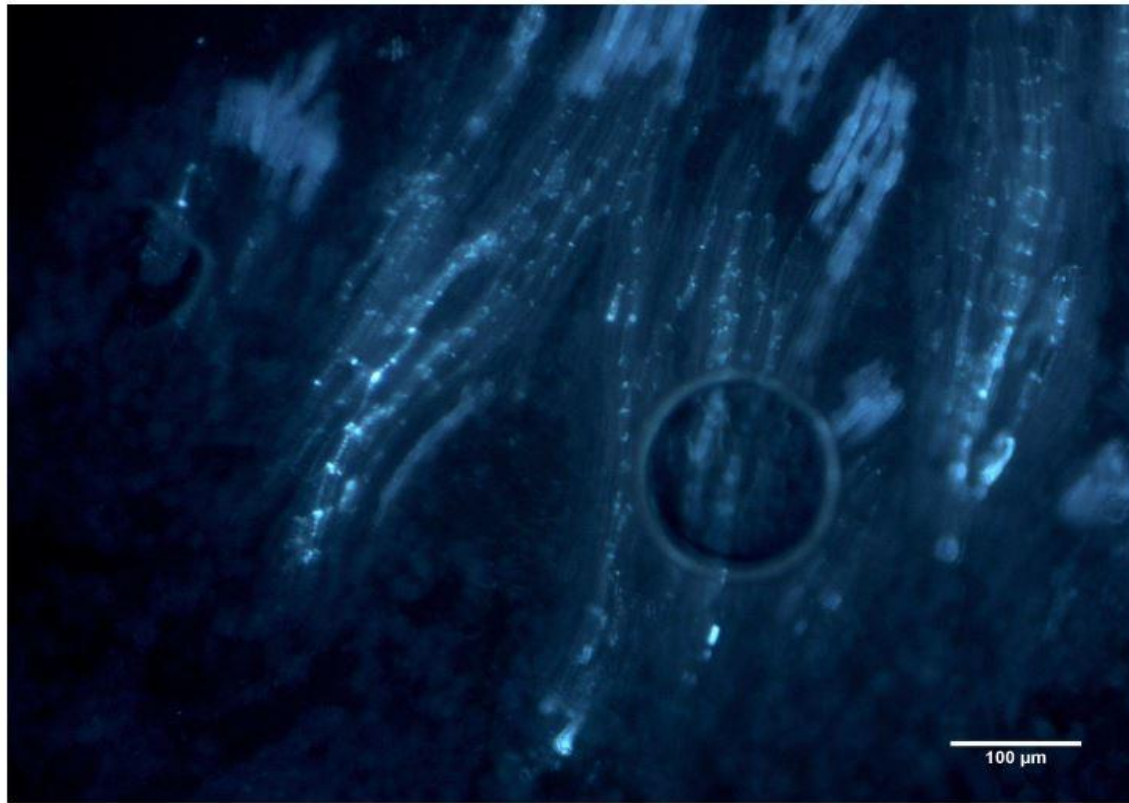
1. Coupe

La coupe du bourgeon est réalisée à l'aide d'un microtome autorétractable Leica muni d'un Peltier sur le porte échantillon afin de congeler le bourgeon lors de la coupe. Les meilleurs résultats ont été obtenus pour des coupes de 40 μ .

2. Coloration de la coupe afin d'observer la callose

Plonger les coupes réalisées dans une solution de bleu d'aniline soluble à 0.1% dans une solution tampon 0.1n K₃PO₄. Une fois la coloration faite monter sur lame avec de la glycérine.

Essais « Callose »



bourgeon de pêcher

Essais « Callose »

On voit de la callose Mais pas ou on voudrait

Était-il trop tard pour la voir vers la zone méristématique ?

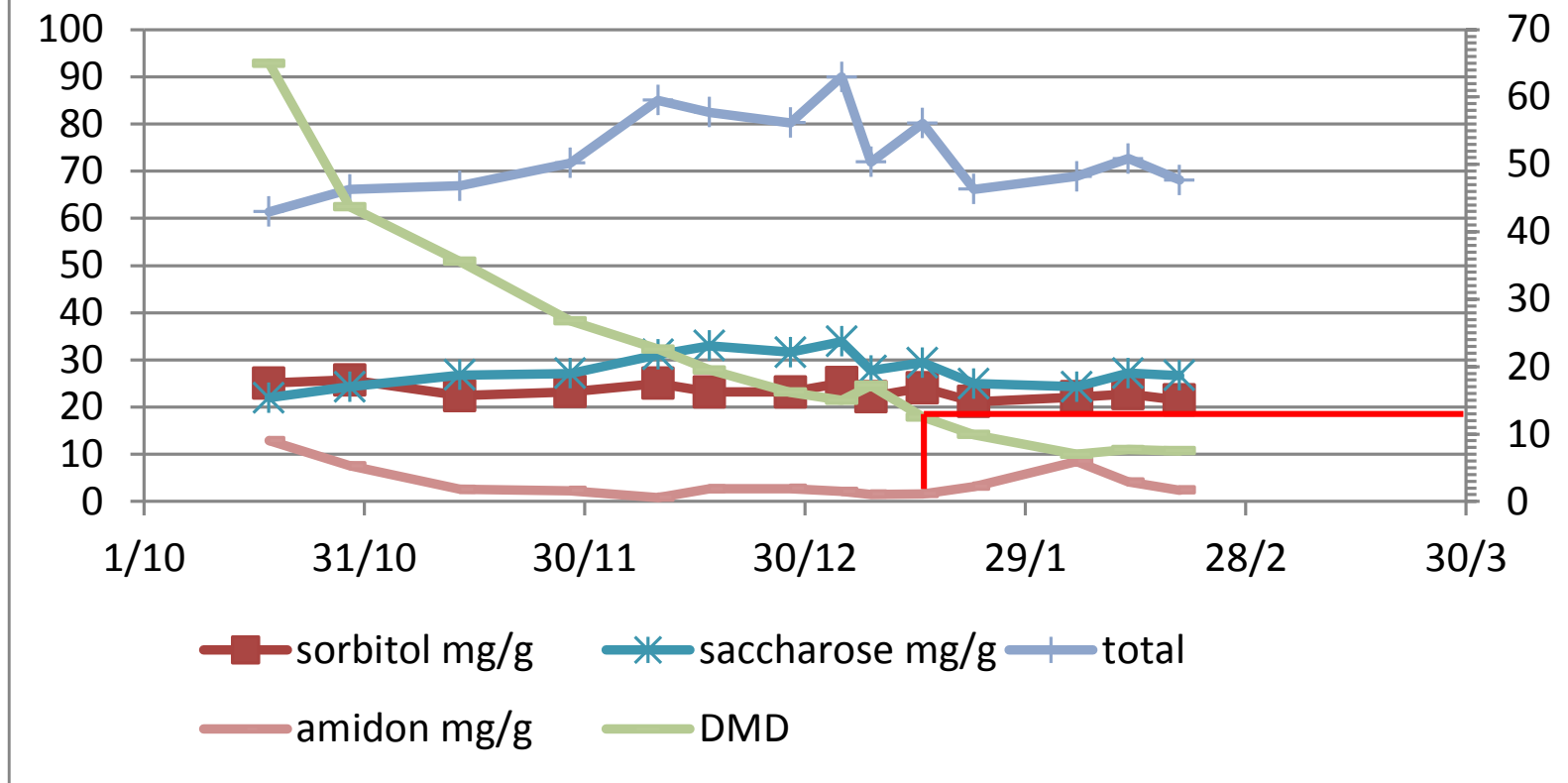
En tout cas la méthode de coloration fonctionne , et elle est simple.

Une autre méthode de préparation des échantillons, plus « classique » avec des inclusions est en cours de test par Isabelle FARRERA à Montpellier

Reste à tester aussi une approche par dosage de la callose

Dynamique des glucides

Pecher 2012-2013





merci à

**Chayma El Khamlichi
Steven Pelletier**

Et tous ceux qui ont participé à l'expérimentation

A ODS et Perpheclim pour les financements

s

