



TC/50/17

ORIGINAL : anglais

DATE : 28 janvier 2014

UNION INTERNATIONALE POUR LA PROTECTION DES OBTENTIONS VÉGÉTALES

Genève

COMITÉ TECHNIQUE

**Cinquantième session
Genève, 7 – 9 avril 2014**

RÉVISION DU DOCUMENT TGP/7 : SOURCE DE MATÉRIEL DE REPRODUCTION OU DE MULTIPLICATION

Document établi par le Bureau de l'Union

Avertissement : le présent document ne représente pas les principes ou les orientations de l'UPOV

1. L'objet du présent document est de présenter une proposition de conseils sur la source de matériel de reproduction ou de multiplication à incorporer dans une future version révisée du document TGP/7.

2. Les abréviations ci-après sont utilisées dans le présent document :

TC : Comité technique
 TC-EDC : Comité de rédaction élargi
 TWA : Groupe de travail technique sur les plantes agricoles
 TWC : Groupe de travail technique sur les systèmes d'automatisation et les programmes d'ordinateur
 TWF : Groupe de travail technique sur les plantes fruitières
 TWO : Groupe de travail technique sur les plantes ornementales et les arbres forestiers
 TWP : Groupes de travail techniques
 TWV : Groupe de travail technique sur les plantes potagères

3. La structure du présent document est la suivante :

INFORMATIONS GÉNÉRALES	2
EXAMEN PAR LES GROUPES DE TRAVAIL TECHNIQUES EN 2013	2
PROPOSITION	3
ANNEXE I : SOURCE DE MATÉRIEL DE REPRODUCTION OU DE MULTIPLICATION (TEXTE PRÉSENTÉ AUX SESSIONS DES GROUPES DE TRAVAIL TECHNIQUES DE 2013)	
ANNEXE II : SOURCE DE MATÉRIEL DE REPRODUCTION OU DE MULTIPLICATION (NOUVELLE PROPOSITION)	

INFORMATIONS GÉNÉRALES

4. À sa quarante-neuvième session tenue à Genève du 18 au 20 mars 2013, le Comité technique (TC), a pris note que des informations sur l'influence de la méthode de multiplication végétative et l'origine du matériel de multiplication prélevé de l'intérieur de la plante, sur le développement futur de la plante et l'expression des caractères, ainsi que sur la manière dont ces informations pourraient figurer dans les principes directeurs d'examen, seraient présentées au Groupe de travail technique sur les plantes fruitières (TWF) et au Groupe de travail technique sur les plantes ornementales et les arbres forestiers (TWO) à leurs sessions de 2013 par des experts de l'Union européenne (voir le paragraphe 81 du document TC/49/41 intitulé "Compte rendu des conclusions").

5. En réponse à la demande du TC, le rédacteur de l'Union européenne (M. Jens Wegner) a établi un projet de conseils relatifs à la source de matériel de reproduction ou de multiplication et accepté de présenter ce document à tous les groupes de travail techniques en 2013; ce document est reproduit à l'annexe I du présent document.

EXAMEN PAR LES GROUPES DE TRAVAIL TECHNIQUES EN 2013

6. Les groupes de travail techniques TWO, TWF, TWV, TWC et TWA ont examiné les conseils relatifs à la source de matériel de reproduction ou de multiplication rédigés par un expert de l'Union européenne et présentés dans la section IV, intitulée "Conseils pour l'élaboration des principes directeurs d'examen", des annexes des documents TWO/46/10, TWF/44/10, TWV/47/10, TWC/31/10 et TWA/42/10 (voir les paragraphes 22 et 23 du document TWO/46/29 "Report", les paragraphes 25 à 27 du document TWF/44/31 "Report" et les paragraphes 25 à 27 du document TWV/47/34 "Report", les paragraphes 23 et 24 du document TWC/31/32 "Report", ainsi que les paragraphes 24 à 26 du document TWA/42/31), tels que reproduits à l'annexe I du présent document.

7. Le TWO est convenu qu'il ne serait pas approprié de chercher à insérer, dans la section 9.2 du Questionnaire technique, un texte standard supplémentaire sur la source de matériel de reproduction ou de multiplication. Il a toutefois noté que le document donnait des informations utiles sur les effets de la source de matériel de reproduction ou de multiplication et a demandé que soit établie une version condensée d'indications générales à l'intention des rédacteurs des principes directeurs d'examen, en vue de son incorporation dans le document TGP/7.

8. Le TWF a noté que le document fournissait des informations utiles sur les effets de la source de matériel de reproduction ou de multiplication et pouvait servir de source d'indications générales à l'intention des rédacteurs des principes directeurs d'examen, en vue de son incorporation dans le document TGP/7, et il a demandé à l'expert de l'Union européenne d'établir une version condensée du texte, en vue de sa présentation au TWF à sa quarante-cinquième session, en 2014.

9. Le TWF a invité un expert d'Espagne à présenter, à sa quarante-cinquième session, un exposé sur l'expérience pratique de l'utilisation de matériel multiplié *in vitro* soumis pour examen DHS ou en vue de programmes de certification.

10. Le TWV a noté que le document fournissait des informations utiles sur les effets de la source de matériel de reproduction ou de multiplication et pouvait servir de source d'indications générales à l'intention des rédacteurs des principes directeurs d'examen, en vue de son incorporation dans le document TGP/7, et il a demandé à l'expert de l'Union européenne d'établir, avec le concours d'experts de France et des Pays-Bas, une version condensée du texte, en vue de sa présentation au TWV à sa quarante-huitième session, en 2014.

11. Le TWV a demandé d'ajouter des exemples pour les légumes multipliés par voie végétative.

12. Le TWC a noté que le document fournissait des informations utiles sur les effets de la source de matériel de reproduction ou de multiplication et a souscrit à la demande d'élaboration d'une version condensée pouvant servir de source d'indications générales à l'intention des rédacteurs des principes directeurs d'examen, en vue de son incorporation dans le document TGP/7.

13. Le TWC a demandé au rédacteur d'éviter de se référer à Wikipédia, afin de garantir une référence à une source d'information fiable.

14. Le TWA est convenu avec le TWO qu'il ne serait pas approprié de chercher à insérer, dans la section 9.2 du Questionnaire technique, un texte standard supplémentaire sur la source de matériel de reproduction ou de multiplication. Il a noté que le document fournissait des informations utiles sur les effets de la source de matériel de reproduction ou de multiplication et pouvait servir de source d'indications générales à l'intention des rédacteurs des principes directeurs d'examen, en vue de son incorporation dans le document TGP/7, et il a demandé à l'expert de l'Union européenne d'établir, avec le concours d'experts de France et des Pays-Bas, une version condensée du texte, en vue de sa présentation au TWA à sa quarante-troisième session, en 2014. Le TWA a pris note des effets de la source de matériel de reproduction ou de multiplication sur les plantes agricoles telles que la pomme de terre, dont il convient de tenir compte pour l'examen DHS.

15. Le TWA a noté que les points soulevés dans le document TWA/42/10 étaient différents de l'utilisation intentionnelle de substances chimiques (par exemple des retardateurs de croissance) sur toutes les variétés à inclure dans l'essai DHS. Il a rappelé que les questions d'ordre général étaient abordées dans la section suivante du document TG/1/3 intitulé "Introduction générale à l'examen de la distinction, de l'homogénéité et de la stabilité et à l'harmonisation des descriptions des obtentions végétales" (voir le document TG/1/3, chapitre 2, section 2.5.3) :

"L'expression d'un ou de plusieurs caractères d'une variété peut être affectée par des facteurs tels que parasites ou maladies, traitement chimique (par exemple retardateurs de croissance ou pesticides), effets d'une culture de tissus, porte -greffes, scions prélevés sur un arbre à différents stades de croissance, etc. Dans certains cas (par exemple, résistance aux maladies), la réaction à certains facteurs est utilisée intentionnellement (voir TG/1/3, chapitre 4, section 4.6.1) comme caractère dans l'examen DHS. Toutefois, lorsque le facteur n'est pas destiné à être utilisé pour l'examen DHS, il est important que son influence ne fausse pas cet examen. Par conséquent, selon les circonstances, le service d'examen doit s'assurer que :

- "a) les variétés à l'examen sont toutes exemptes de ces facteurs, ou,
- "b) que toutes les variétés incluses dans l'examen DHS, y compris les variétés notoirement connues, sont exposées au même facteur, et que celui -ci a le même effet sur toutes les variétés, ou encore,
- "c) s'il est toujours possible de procéder à un examen satisfaisant, que les caractères affectés sont exclus de l'examen DHS, à moins que l'expression véritable du caractère du génotype puisse être déterminée malgré la présence du facteur en cause."

Le TWA a également rappelé les indications figurant dans le document TGP/12 intitulé "Conseils en ce qui concerne certains caractères physiologiques".

PROPOSITION

16. Sur la base des observations formulées par les TWP en 2013, l'expert de l'Union européenne a élaboré une version condensée du projet de conseils sur la source de matériel de reproduction ou de multiplication, présentée dans l'annexe II du présent document. La proposition relative à son incorporation dans une future version révisée du document TGP/7 sous forme de Note indicative sur la qualité du matériel figure dans la partie IV de l'annexe II.

17. Le TC-EDC, à sa réunion tenue à Genève les 8 et 9 janvier 2014, a conclu qu'il serait utile de commencer à élaborer les conseils en invitant des experts aux sessions de 2014 des TWP, afin qu'ils fassent part de leurs expériences en matière de sources de matériel de reproduction et de multiplication, ainsi que de la manière dont ils ont résolu la survenue éventuelle de problèmes. Sur la base de ces informations, des conseils fondés sur des pratiques recommandées pourraient être élaborés.

18. Le TC est invité à encourager des experts à présenter, lors des sessions 2014 des TWP, leurs expériences concernant les sources de matériel de reproduction et de multiplication inclus dans l'examen DHS, en vue de l'élaboration de conseils fondés sur des pratiques recommandées.

[Les annexes suivent]

ANNEXE I

SOURCE DE MATÉRIEL DE REPRODUCTION OU DE MULTIPLICATION
(texte présenté aux sessions des groupes de travail techniques de 2013)

I. INTRODUCTION

Une large gamme de méthodes de multiplication végétative est suivie dans le secteur horticole. Les méthodes les plus fréquemment appliquées à l'échelle commerciale sont les suivantes :

- bouturage de conifères,
- bouturage de feuillus,
- bouturage de feuilles,
- division de rhizomes ou de groupes végétaux,
- stolons,
- bulbilles,
- micromultiplication,
- greffage.

Certaines méthodes, telles que le bouturage de feuilles, se limitent à un très petit nombre de plantes (par exemple *Gesneriaceae*, *Begonia*, *Sanseveria* non panachée). S'agissant des rares plantes auxquelles elle peut être appliquée, la méthode du bouturage de feuilles est généralement suivie pour toutes les variétés, et elle n'entraîne pas de complications dans l'examen DHS. Cette méthode ne sera donc pas examinée plus avant. Il en va de même pour les plantes multipliées efficacement par stolons (par exemple *Fragaria*) et bulbilles (par exemple *Tulipa*). Lorsque des plantes sont multipliées par d'autres méthodes telles que le bouturage de conifères ou de feuillus ou le greffage, ces méthodes peuvent toutefois entraîner des complications dans l'examen DHS.

La micromultiplication peut être appliquée à certaines plantes (par exemple orchidacées, broméliacées) soit en remplacement de toutes les autres méthodes, soit en tant que seule méthode de multiplication intéressante du point de vue commercial. La micromultiplication et diverses autres techniques *in vitro* sont couramment appliquées à l'heure actuelle pour la sélection végétale (par exemple récupération d'embryons), l'obtention de végétaux indemnes de virus, la multiplication (de masse) de végétaux et le conditionnement aux fins de la multiplication ou de la reproduction (par exemple rajeunissement). Chaque technique et méthode peut avoir à la fois une incidence directe et des effets tardifs sur le phénotype et par conséquent sur l'examen DHS.

Pour les besoins du présent document, "micromultiplication" est synonyme d'autres termes couramment employés : techniques *in vitro*, "culture *in vitro*" et "culture de tissus".

L'origine du matériel de multiplication de certaines espèces, prélevé de l'intérieur de la plante mère, peut également avoir une grande influence sur l'apparence ultérieure des plantes-filles. Il faut donc en tenir compte, en plus de la méthode de multiplication par voie végétative.

L'objet du document est d'examiner l'incidence éventuelle de la méthode de multiplication ou reproduction sur les conclusions de l'examen DHS et la manière d'éviter la prise de décisions erronées concernant la conformité aux critères d'examen DHS.

II. MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE PAR BOUTURAGE

Les boutures – habituellement prélevées sur des rameaux ou des branches, rarement sur des racines – présentent un comportement caractéristique, propre à chaque type : les boutures de conifères s'enracinent et croissent plus rapidement que les boutures de feuillus. Contrairement aux boutures de tête, la dominance apicale des boutures prélevées sur la partie centrale ou la base de la plante est rompue, et les plantes qui en sont issues sont comparables à des plantes pincées ou rabattues à rameaux multiples; on peut donc prévoir une corrélation directe entre le nombre de pousses adventives et leur taille. Le mode de bouturage utilisé pour multiplier la plante joue alors un rôle crucial dans l'évaluation de caractères tels que : "nombre de rameaux", "largeur de la plante", "densité de la plante", etc.

Tant que toutes les variétés d'une plante donnée sont multipliées par le même mode de bouturage, il n'y a pas lieu de prévoir d'incidence sur l'examen DHS. Les plantes issues de boutures prélevées sur la partie centrale du rameau et les plantes issues de boutures de tête peuvent être comparables si celles-ci ont été pincées.

Si, pour la plupart des plantes herbacées, la question de l'origine du matériel de multiplication ou de reproduction prélevé de l'intérieur de la plante mère est plus pertinente pour une multiplication efficace (de masse) que pour la comparaison d'échantillons dans le cadre de l'examen DHS, ces questions peuvent revêtir une importance cruciale dans le cas de certaines plantes ligneuses : il convient de tenir compte de la topophyse et de la cyclophyse de la bouture car elles ont une incidence non seulement sur la capacité d'enracinement mais aussi sur le port de la plante et sa capacité de ramification et de floraison.

Lorsque des branches de plantes à croissance orthotrope d'une variété donnée sont utilisées pour produire des plantes à croissance plagiotrope (par exemple *Abies*, *Araucaria*, *Picea* et *Pseudotsuga*), ces plantes ne doivent pas être traitées comme de nouvelles variétés, mais comme constituant simplement un mode de croissance différent de variétés existantes. De même, lorsqu'une plante à croissance plagiotrope produit occasionnellement des rameaux à croissance orthotrope à la base, ceux-ci ne doivent pas être considérés comme des pousses hors-type.

Les plantes à croissance plagiotrope peuvent avoir un grand intérêt ornemental, et elles sont parfois les seules plantes sur le marché. Lorsqu'on ne dispose pas de plantes à croissance orthotrope d'une variété donnée à des fins de comparaison, et qu'il ne s'agit pas d'une variété (par exemple simplement une plante isolée – voir le paragraphe 5 du document UPOV/EXN/VAR), l'examen DHS devra être effectué sur le type à croissance plagiotrope.

S'agissant d'espèces dont les effets de la topophyse et de la cyclophyse sont connus, les principes directeurs d'examen correspondants doivent définir le matériel – y compris l'origine du matériel de multiplication prélevé de l'intérieur de la plante mère – qui doit faire l'objet de l'examen DHS. Les obtenteurs et les fournisseurs de matériel de référence doivent fournir des précisions, éventuellement en répondant à des questions particulières qui seront formulées dans le questionnaire technique.

III. EFFETS DE LA CULTURE *IN VITRO*

La culture *in vitro* peut avoir une incidence sur l'expression de pratiquement tous les caractères. Des modifications morphologiques et fonctionnelles ont été signalées en liaison avec l'enracinement, le port, la floraison et la production des fruits. Les examinateurs DHS sont fréquemment confrontés à des problèmes tels que : croissance inégale des plantes, ramification atypique (perte de dominance apicale), pousses rabougries ou allongées, perte ou apparition de feuilles panachées, mauvaise floraison, etc.

Ces modifications peuvent être temporaires ou permanentes. Des changements permanents se produisant pendant la culture tissulaire peuvent s'expliquer par l'activation de transposons, la ségrégation de chimères ou une mutation "ordinaire", telle qu'elle peut se produire à tout moment *ex vitro*. Les plantes ayant subi une modification permanente n'appartiennent plus à la variété initiale et sont donc considérées comme hors-type (voir le document TGP10/1, section 4, Évaluation de l'homogénéité d'après les plantes hors-type). De même, une variation épigénétique (par exemple une méthylation – souvent un effet secondaire d'une transformation génétique – qui se produit en culture tissulaire (ou *ex vitro*) donne lieu à l'expression de caractères qui ne repose pas sur le génome. S'il s'agit de plantes isolées, elles ne peuvent pas être considérées comme hors-type; si toutes les plantes d'une "variété" donnée sont concernées, cela ne doit pas – en l'absence de base génétique d'expression des caractères en question – entraîner l'octroi d'un titre de protection. La difficulté à laquelle un examinateur DHS peut être confronté réside dans la distinction entre ces différentes modifications. Dans le premier cas, l'échantillon doit être considéré comme inapproprié à la conduite de l'examen DHS; dans le second cas, une déclaration éventuellement erronée de conformité au critère de distinction devra être rectifiée, ce qui entraînera l'annulation d'un droit octroyé.

Explication des effets de la culture *in vitro*

Quand on cultive *in vitro* du matériel végétal – que ce soit des plantes entières, des parties de plantes, des cellules isolées ou des groupes de cellules (cal), des protoplastes ou des semences – on utilise toujours un certain milieu de culture. Les milieux de culture contiennent, entre autres, des régulateurs de croissance (phytohormones). La composition précise du milieu de culture et des régulateurs de croissance ajoutés dépendent du but de la culture *in vitro*. Outre les régulateurs de croissance utilisés par le laboratoire, les plantes produisent elles-mêmes ces hormones.

Taille de l'explant

Outre les régulateurs de croissance, d'autres facteurs expliquent les différences entre plantes cultivées *in vitro* et plantes multipliées par des voies conventionnelles. Généralement, les microboutures transférées sur un substrat d'enracinement *ex vitro* sont beaucoup plus petites que les boutures classiques. Par ailleurs, le choc de la transplantation est plus important. Il faut prévoir davantage de temps pour rattraper le retard de croissance. Cette différence peut être particulièrement importante lorsqu'on compare des végétaux reproduits par micromultiplication à des végétaux multipliés par division de rhizomes, de bulbilles ou de tubercules, car ces organes contiennent une réserve importante de nutriments végétaux qui leur permettent de croître rapidement après la plantation. L'examineur DHS doit s'assurer que les plantes de toutes les variétés examinées sont bien au même stade de développement et ont des réserves comparables de nutriments végétaux (par exemple de jeunes plants à tubercules comparés à des boutures simplement enracinées avant le développement du tubercule).

Conditions d'éclairage

La culture de végétaux *in vitro* se fait en outre sous éclairage artificiel et (généralement) en régime de jours longs. Cela peut expliquer la mauvaise floraison de plantes micromultipliées parfois observée.

Phytohormones

Les phytohormones ont une incidence sur pratiquement tous les aspects du développement de la plante. L'effet (et le sens de l'effet, positif ou inhibiteur) qu'ont les phytohormones dépend non seulement de leur concentration, mais aussi de celle d'autres hormones. *Ex vitro*, les plantes produisent elles-mêmes toutes les hormones, ce qui ne les empêche pas de réagir à des hormones appliquées de l'extérieur.

Il existe cinq catégories de phytohormones : auxines, cytokinines, acide abscissique, gibbérellines et éthylène. Les quatre premières se composent de nombreuses substances chimiques, de structure différente, mais ayant un effet similaire sur les végétaux; elles sont variables d'une espèce végétale à l'autre. En outre, il existe des produits de synthèse qui ont des effets comparables sur la croissance de la plante.

Nombre de subcultures

Des observations contradictoires ont été faites concernant l'effet que le nombre de subcultures (cycles de multiplication) a *in vitro* sur le phénotype des plantes après transplantation. Lorsque la culture de tissus s'accompagne d'un rajeunissement de l'explant tissulaire, ce phénomène s'accroît à chaque sous-culture suivante jusqu'à ce que le tissu soit complètement rajeuni. Cet effet s'observe en particulier pour les végétaux dont les formes d'apparence sont différentes aux stades juvénile et adulte. Ce rajeunissement peut être souhaitable à des fins de production commerciale, car il permet de multiplier des végétaux par bouturage au lieu de greffage. Le nombre de subcultures n'a pas toujours d'incidence pour les espèces dont la forme n'est pas différente aux stades juvénile et adulte.

Méthode de multiplication in vitro

Les plantules issues de culture de tissus peuvent se comporter différemment selon le mode de multiplication : les boutures de tête *in vitro* ont des chances de poursuivre leur croissance comme des boutures de tête ordinaires, tandis que des groupes d'explants obtenus par division continueront probablement de croître sous forme de plantes à rameaux multiples. En particulier, lorsque le but était de prélever des boutures de tête, mais que les incisions ont été trop profondes dans le groupe, ou lorsque des groupes sont divisés en sous-groupes présentant un nombre inégal de rameaux, les plantes régénérées risquent de croître de manière inégale par la suite et le nombre de rameaux d'être inversement proportionnel à leur taille.

Transposons

Enfin, sous l'effet de l'activation de transposons, la stabilité de variétés ayant subi avec succès un premier examen DHS peut ne pas être confirmée. Il faut appliquer la législation nationale en matière de droits des obtenteurs lorsque celle-ci prévoit la possibilité d'une vérification technique de variétés protégées.

Informations fournies par les demandeurs et devant être prises en considération dans l'essai DHS

Les obtenteurs délèguent souvent la multiplication par culture de tissus à des laboratoires spécialisés. Bien que, dans la plupart des cas, on utilise le milieu de culture MS classique (milieu de Murashige et Skoog) – modifié en fonction des besoins particuliers du végétal et de l'expérience du laboratoire – les laboratoires commerciaux sont généralement peu enclins à révéler sa composition précise, considérée comme un secret d'affaires. L'examineur DHS ne doit donc pas s'attendre à ce que l'obteneur lui communique tous les détails concernant les régulateurs de croissance appliqués aux plantes (ou à leurs plantes mères) pour les besoins de l'essai DHS. Hormis la lourdeur administrative inacceptable qu'elle représenterait pour les demandeurs, la communication de ces renseignements serait d'un intérêt limité pour l'examineur, car les effets peuvent être très complexes, et souvent liés aux circonstances; l'impact de la culture *in vitro* est donc peu prévisible au stade de la conception de l'examen DHS. Trois scénarios sont possibles :

Scénario 1 : la culture de tissus est la méthode standard de multiplication : toutes les variétés multipliées à l'échelle commerciale le sont *in vitro*; le matériel végétal soumis à l'examen DHS – variétés candidates et de référence – sort directement du flacon, sans multiplication intermédiaire. Même si l'influence de la culture *in vitro* sur le phénotype peut revêtir la plus grande importance, on peut estimer que son effet sur l'examen DHS n'est guère plus important que celui de la comparaison de matériel végétal de différentes sources.

Exemple : *Phalaenopsis*

Scénario 2 : des plantes mères ou des plantes élitaires éloignées ont été mises en culture tissulaire; plusieurs cycles de multiplication *ex vitro* ont donc eu lieu avant que le matériel végétal ne soit soumis à l'examen DHS. En ce cas, on peut supposer que le matériel végétal a surmonté tous les effets tardifs que la culture *in vitro* a pu avoir.

Exemple : *Pelargonium*

Scénario 3 : la culture de tissus n'est pas la seule méthode de multiplication à l'échelle commerciale. Le matériel végétal utilisé pour l'examen DHS – variétés candidates ou de référence – peut être issu de différents modes de multiplication : il s'agit, d'une part, des plantes issues directement de la culture tissulaire ou des descendants directs de ces plantes, et d'autre part, de plantes multipliées de manière classique. Le mélange de ces matériels dans un même essai peut induire une décision erronée quant au respect du critère de distinction, ainsi que des descriptions erronées des variétés. Les conséquences pour l'examen DHS sont décrites dans la section 2.3.

Exemple : *Rhododendron*

Conséquences pour la conduite de l'examen technique DHS

Variation au sein de l'échantillon

Lorsqu'une variation au sein de l'échantillon est imputée à la multiplication *in vitro*, aucune décision ne peut être prise quant au respect du critère d'homogénéité. Il appartient au service chargé de l'examen de refuser l'échantillon au motif qu'il ne convient pas à l'examen DHS, ou bien de multiplier le matériel végétal, de manière à faire disparaître l'impact de la culture *in vitro*. Dans certains cas, le rabattage des plantes peut induire une repousse homogène; dans d'autres cas, toutefois, il peut suffire de prolonger l'examen technique d'un cycle de croissance supplémentaire.

Rajeunissement des plantes

Les examinateurs doivent savoir que certaines espèces végétales ont des formes juvéniles et adultes clairement distinctes sur le plan morphologique (par exemple la forme de la feuille de *Hedera helix*) qui peuvent être transmises aux plantes-filles. Cette distinction ne peut pas toujours être faite entre plantes d'autres espèces au niveau des caractères morphologiques, mais de leurs caractères physiologiques (par exemple la capacité d'enracinement de boutures de *Syringa vulgaris*), qui influent sur leur croissance ultérieure. Les examinateurs doivent donc s'assurer toutes les descriptions de variétés portent sur des végétaux de même âge physiologique (normalisé).

Effets tardifs de l'application de phytohormones synthétiques au cours de la micromultiplication

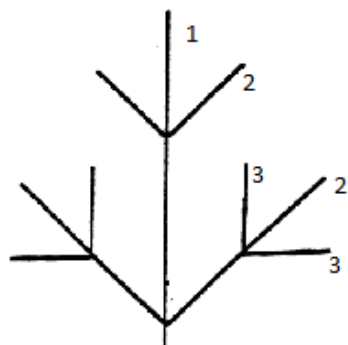
Lorsque, après mise en culture tissulaire, des plantules sont transférées sur un substrat de croissance *ex vitro*, elles conservent des quantités résiduelles des phytohormones synthétiques provenant du milieu de culture *in vitro*. Ces résidus de phytohormones synthétiques continuent d'agir sur le développement de la plante. La durée d'observation de ces effets tardifs ne dépend pas de la quantité absolue des résidus de phytohormones synthétiques mais de leur concentration dans le tissu et de la concentration des hormones produites de manière autonome par la plante. La concentration diminue à mesure que la plante poursuit sa croissance. La suite de la multiplication de la plante *ex vitro*, seule, ne réduit donc pas les effets tardifs de la culture de tissus; des boutures prélevées sur des plantes juste après la fin de la culture tissulaire contiennent encore des résidus de phytohormones synthétiques en concentration bien supérieure que des boutures prélevées sur des plantes dont la culture tissulaire est terminée depuis longtemps (à condition que ces plantes aient présenté une croissance végétative importante dans l'intervalle). Des phytohormones circulent à l'intérieur de la plante et peuvent être stockées temporairement, puis libérées par la suite. C'est pourquoi un simple rabattage de plantes dans le but de rendre comparable la repousse de différents échantillons est moins efficace que la production de nouvelles plantes à partir de boutures.

Effets tardifs d'autres conditions de micromultiplication

Lorsque du matériel végétal présente une floraison médiocre ou prématurée, l'échantillon doit être considéré comme inapproprié à la conduite de l'examen DHS. Il appartient au service d'examen de refuser l'échantillon ou de pallier l'insuffisance, soit en rabattant les plantes, soit en attendant un cycle de croissance supplémentaire. Si l'on constate une répartition homogène de ces effets dans toutes les plantes d'une variété donnée, l'influence perturbatrice de la culture *in vitro* sur l'examen DHS est difficile à détecter en l'espace d'un seul cycle de croissance.

IV. CONSEILS POUR L'ÉLABORATION DE PRINCIPES DIRECTEURS D'EXAMEN

S'agissant de variétés à multiplication *ex vitro* classique – notamment des végétaux qui ne sont pas élagués au cours de l'essai en culture – des principes directeurs d'examen doivent éventuellement définir le type de bouturage à effectuer pour produire l'échantillon destiné à l'examen DHS. Il pourrait être proposé d'ajouter au document TGP 9 "Examen de la distinction" un chapitre sur le matériel à utiliser pour l'examen DHS : Pour les plantes dont les effets topophysiques et cyclophysiques sont connus, les critères s'appliquant au matériel de multiplication, y compris l'origine du matériel de multiplication ou de reproduction prélevé de l'intérieur de la plante mère, doivent être particulièrement contraignants afin de garantir la comparabilité des variétés. Le questionnaire technique doit contenir des questions permettant à l'examineur d'évaluer si le matériel végétal multiplié par le déposant d'une demande d'exploitation commerciale de la variété convient à la conduite de l'examen DHS, ou s'il convient de fournir un autre matériel, selon l'exemple cité dans TG/96/4 (*Picea abies* (L.) Karst.), où il est précisé au point II "Matériel requis" : "*Il doit, de préférence, ne pas être obtenu par multiplication *in vitro*. Si les plantes sont greffées, le porte-greffe utilisé doit être indiqué. Les greffons doivent être sélectionnés d'une manière à éviter des expressions causées par l'influence de la topophyse.*" Le questionnaire technique ne demande aux déposants que de préciser si l'origine de la variété est une plante de semis, une mutation ou une découverte. Il est proposé que, dans le cas d'une mutation ou d'une découverte, les déposants soient invités à indiquer (par exemple en indiquant la branche pertinente sur un dessin) sur quelle partie des plantes mères le matériel initial de la variété candidate a été prélevé. Le dessin figurant dans le document TG/96/4, chapitre VIII, a été modifié comme suit à cet effet :



- 1 pousse principale
- 2 pousse latérale de premier ordre
- 3 pousse latérale de deuxième ordre

S'agissant de la micromultiplication, les principes directeurs d'examen peuvent préciser si ce genre de matériel végétal peut être utilisé aux fins de l'examen DHS. Pour les végétaux auxquels la culture de tissus n'est pas la seule méthode de multiplication appliquée, les demandeurs doivent fournir des renseignements précis – par exemple dans le questionnaire technique – concernant les générations de végétaux qui ont été soumis à une culture tissulaire, au lieu de décrire en détail la composition du milieu de culture. Le point 9.2 du questionnaire technique pourrait être modifié comme suit (modifications en caractères *italiques*) :

"9.2 Le matériel végétal ne doit pas avoir subi de traitement susceptible d'influer sur l'expression des caractères de la variété, sauf autorisation ou demande expresse des autorités compétentes. S'il a été traité, le traitement appliqué doit être indiqué en détail. En conséquence, veuillez indiquer ci-dessous si, à votre connaissance, le matériel végétal a été soumis aux facteurs suivants :

- | | | | |
|-----|--|---------|---------|
| "a) | micro-organismes (p. ex. virus, bactéries, phytoplasmes) | Oui [] | Non [] |
| "b) | traitement chimique (p. ex. retardateur de croissance, pesticides) | Oui [] | Non [] |
| "c) | culture de tissus (<i>veuillez cocher la case appropriée</i>) : | | |
| | <i>i) le matériel végétal à examiner a été multiplié par micromultiplication</i> | [] | |
| | <i>ii) le matériel végétal à examiner a été multiplié ex vitro mais ses plantes mères ont fait l'objet d'une culture de tissus</i> | [] | |
| | <i>iii) le matériel végétal à examiner ainsi que ses ascendants directs ont été multipliés ex vitro, mais les plantes mères distantes (par exemple le matériel élite) ont fait l'objet d'une culture de tissus</i> | [] | |
| | <i>iv) ni le matériel végétal à examiner ni aucun ancêtre n'ont fait l'objet d'une culture de tissus</i> | [] | |
| "d) | autres facteurs | Oui [] | Non [] |

Si vous avez répondu "oui" à l'une de ces questions, veuillez préciser."

....."

S'agissant d'espèces qui font l'objet d'une culture de tissus, les principes directeurs d'examen pourraient prévoir régulièrement plus d'un cycle de croissance, ce qui, d'une part, permettrait à l'examineur de détecter une micromultiplication non déclarée, et, d'autre, part, permettrait aux effets tardifs de la culture de tissus de se manifester, ce qui réduirait le risque de décision erronée relative à la distinction.

Bibliographie :

Bhat, S.R. and Srinivasan, S. (2002): Molecular and genetic analysis of transgenic plants: Considerations and approaches. *Plant Science* 163: 673-681

Fouad, M., Swartz, H.J. and Buta, G. (1991): The role of abscisic acid and plant growth regulators in tissue culture-induced rejuvenation of strawberry *ex vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 75-84

Jesch, H.-H. and Plietzsch, A. (2000): Langzeit-Leistungsprüfung *in vitro* vermehrter Ziergehölze (Prunus). I. Morphologische Merkmale. *Gartenbauwissenschaft* 65: 203-2012

Jesch, H.-H. and Plietzsch, A. (2001): Langzeit-Leistungsprüfung *in vitro* vermehrter Ziergehölze (Prunus). II. Phänologische und physiologische Merkmale. *Gartenbauwissenschaft* 66: 61-67

Klaehn, F.U.: the relation of vegetative propagation to topophysis, cyclophysis and periphysis in forest trees.

Krüssmann, G. (1997): *Die Baumschule*. 6th Ed. Parey Berlin

Murashige T. and Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497

Ochatt, S.J., Pontécaille, C. and Rancillac, M. (2000): The growth regulators used for bud regeneration and shoot rooting affect the competence for flowering and seed set in regenerated plants of protein peas. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*; *Plant* 36: 188-193

Smith, M.K. and Hamill, S.D. (1996): Field evaluation of micropropagated and conventionally propagated ginger in subtropical Queensland. *Austr. J. of Experimental Agriculture* 36: 347-54

Waldenmaier, S. and Bünemann, G. (1991): *Ex vitro* effects in micropropagation of *Syringa L.*; *Acta Horticulturae* 300

Wikipedia: Plant hormone: en.wikipedia.org/wiki/Plant_hormone

[L'annexe II suit]

ANNEXE II

SOURCE DE MATÉRIEL DE REPRODUCTION OU DE MULTIPLICATION

I. INTRODUCTION

Une large gamme de méthodes de multiplication végétative est appliquée dans le secteur horticole. Les méthodes les plus fréquemment appliquées à l'échelle commerciale sont les suivantes :

- bouturage de conifères,
- bouturage de feuillus,
- bouturage de feuilles,
- division de rhizomes ou de groupes de végétaux,
- stolons,
- bulbilles,
- micromultiplication (également connue sous la désignation de techniques *in vitro*, "culture *in vitro*" et "culture de tissus", termes employés dans le même sens dans le présent document),
- greffage,
- (mini- ou micro-) tubercules.

La méthode de multiplication pouvant avoir une incidence directe sur l'apparence des plantes, des complications peuvent survenir au cours de l'examen DHS lorsque les végétaux sont multipliés alternativement selon d'autres méthodes. Tel est en particulier le cas pour le premier cycle de croissance. De même, pour certaines plantes, l'origine du matériel de multiplication ou de reproduction prélevé de l'intérieur de la plante mère peut avoir une forte incidence sur l'apparence ultérieure des plantes-filles. Il faut donc en tenir compte, ainsi que de la méthode de multiplication végétative. D'autres complications peuvent surgir lorsqu'il s'agit de comparer des variétés multipliées par voie végétative à des variétés reproduites par voie sexuée.

Le document TG/1/3 intitulé "Introduction générale à l'examen de la distinction, de l'homogénéité et de la stabilité et à l'harmonisation des descriptions des obtentions végétales" stipule ce qui suit au chapitre 2, section 2.5.3 :

"L'expression d'un ou de plusieurs caractères d'une variété peut être affectée par des facteurs tels que parasites ou maladies, traitement chimique (par exemple retardateurs de croissance ou pesticides), effets d'une culture de tissus, porte-greffes, scions prélevés sur un arbre à différents stades de croissance, etc. Dans certains cas (par exemple, résistance aux maladies), la réaction à certains facteurs est utilisée intentionnellement (voir le chapitre 4, section 4.6.1) comme caractère dans l'examen DHS. Toutefois, lorsque le facteur n'est pas destiné à être utilisé pour l'examen DHS, il est important que son influence ne fausse pas cet examen. Par conséquent, selon les circonstances, le service d'examen doit s'assurer que :

- a) les variétés à l'examen sont toutes exemptes de ces facteurs, ou
- b) que toutes les variétés incluses dans l'examen DHS, y compris les variétés notoirement connues, sont exposées au même facteur, et que celui-ci a le même effet sur toutes les variétés, ou encore,
- c) s'il est toujours possible de procéder à un examen satisfaisant, que les caractères affectés sont exclus de l'examen DHS, à moins que l'expression véritable du caractère du génotype puisse être déterminée malgré la présence du facteur en cause. "

Le but du présent document est d'examiner l'incidence éventuelle de la méthode de multiplication sur les conclusions de l'examen DHS et la manière d'éviter la prise de décisions erronées concernant la conformité aux critères d'examen DHS en proposant d'ajouter un texte standard supplémentaire aux principes directeurs d'examen.

II. MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE PAR BOUTURAGE

Les boutures présentent un comportement caractéristique, propre à chaque type et en fonction de l'origine du matériel de multiplication ou de reproduction prélevé de l'intérieur de la plante mère, qui doit être prise en considération pour évaluer des caractères tels que : "nombre de rameaux", "largeur de la plante", "densité de la plante", etc.

En outre – et en particulier pour certaines plantes ligneuses – il convient de tenir compte de la topophyse et de la cyclophyse de la bouture car elles ont une incidence non seulement sur la capacité d'enracinement mais aussi sur le port de la plante et sa capacité de ramification et de floraison. Lorsque des branches de plantes à croissance orthotrope d'une variété donnée sont utilisées pour produire des plantes à croissance plagiotrope (par exemple *Abies*, *Araucaria*, *Picea* et *Pseudotsuga*), ces plantes ne doivent pas être traitées comme de nouvelles variétés, mais comme constituant simplement un mode de croissance différent de variétés existantes. De même, lorsqu'une plante à croissance plagiotrope produit occasionnellement des rameaux à croissance orthotrope à la base, ceux-ci ne doivent pas être considérés comme des pousses hors-type.

Les plantes à croissance plagiotrope peuvent avoir un grand intérêt ornemental, et elles sont parfois les seules plantes sur le marché. Lorsqu'on ne dispose pas de plantes à croissance orthotrope d'une variété donnée à des fins de comparaison, et qu'il ne s'agit pas d'une variété (par exemple simplement une plante isolée – voir le paragraphe 5 du document UPOV/EXN/VAR), l'examen DHS devra être effectué sur le type à croissance plagiotrope.

III. EFFETS DE LA CULTURE *IN VITRO*

La culture *in vitro* peut avoir une incidence sur l'expression de pratiquement tous les caractères. Des modifications morphologiques et fonctionnelles ont été signalées en liaison avec l'enracinement, le port, la floraison et la production des fruits. Les examinateurs DHS sont fréquemment confrontés à des problèmes, par exemple : croissance inégale des plantes, ramification atypique (perte de dominance apicale), pousses rabougries ou allongées, perte ou apparition de feuilles panachées, mauvaise floraison, etc. Ces effets peuvent s'expliquer par la taille de l'explant, les conditions d'éclairage, l'apport de phytohormones au milieu de culture, le nombre de subcultures, la méthode de multiplication *in vitro*, l'activation de transposons, la ségrégation de chimères, une variation somaclonale ou une mutation "ordinaire", telle qu'elle peut se produire à tout moment *ex vitro*.

Informations fournies par les demandeurs et devant être prises en considération dans l'essai DHS

Les obtenteurs délèguent souvent la multiplication par culture de tissus à des laboratoires spécialisés. Hormis la lourdeur administrative que représenterait la fourniture de précisions sur les régulateurs de croissance utilisés aux demandeurs, mais la communication de ces renseignements serait d'un intérêt limité pour l'examinateur, car les effets peuvent être très complexes, et souvent liés aux circonstances; l'impact de la culture *in vitro* est donc peu prévisible au stade de la conception de l'examen DHS. L'information concernant le fait que la variété candidate a fait l'objet d'une culture *in vitro* peut néanmoins revêtir de l'importance pour la conduite de l'examen DHS. Trois scénarios sont possibles :

Scénario 1 : la culture de tissus est la méthode standard de multiplication : toutes les variétés multipliées à l'échelle commerciale le sont *in vitro*; le matériel végétal soumis à l'examen DHS – variétés candidates et de référence – sort directement du flacon, sans multiplication intermédiaire. Même si l'influence de la culture *in vitro* sur le phénotype peut revêtir la plus grande importance, on peut estimer que son effet sur l'examen DHS n'est guère plus important que celui de la comparaison de matériel végétal de différentes sources.

Exemple : *Phalaenopsis*

Scénario 2 : des plantes mères ou des plantes élites éloignées ont été mises en culture tissulaire; plusieurs cycles de multiplication *ex vitro* ont donc eu lieu avant que le matériel végétal ne soit soumis à l'examen DHS. En ce cas, on peut supposer que le matériel végétal a surmonté tous les effets tardifs que la culture *in vitro* a pu avoir.

Exemple : *Pelargonium*

Scénario 3 : la culture de tissus n'est pas la seule méthode de multiplication à l'échelle commerciale. Le matériel végétal utilisé pour l'examen DHS – variétés candidates ou de référence – peut être issu de différents modes de multiplication : il s'agit, d'une part, des plantes issues directement de la culture tissulaire ou des descendants directs de ces plantes, et d'autre part, de plantes multipliées de manière classique.

Le mélange de ces matériels dans un même essai peut induire une décision erronée quant au respect du critère de distinction, ainsi que des descriptions erronées des variétés. Les conséquences pour l'examen DHS sont décrites dans la section suivante.

Exemples : *Rhododendron, asperge, tomates et poivre*

Conséquences pour la conduite de l'examen technique DHS

Les modifications résultant de la culture de tissus peuvent être temporaires ou permanentes. Les plantes ayant subi une modification permanente n'appartiennent plus à la variété initiale et sont donc considérées comme hors-type; voir le document TGP10/1 (section 4 : Évaluation de l'homogénéité fondée sur les hors-types).

De même, lorsqu'une variation au sein de l'échantillon est imputable à la multiplication *in vitro*, aucune décision relative au respect du critère d'homogénéité ne peut être prise car l'expression des caractères ne repose pas sur le génome.

Si, toutefois, toutes les plantes d'une "variété" donnée sont également affectées (par exemple par rajeunissement ou effet tardif des phytohormones et de l'application d'autres conditions de culture), cela ne doit pas – en l'absence de base génétique d'expression des caractères en question – entraîner l'octroi d'un titre de protection. La difficulté à laquelle un examinateur DHS peut être confronté réside dans la distinction entre ces différentes modifications.

Dans le premier cas, l'échantillon doit être considéré comme inapproprié à la conduite de l'examen DHS (et il appartient alors au service d'examen soit de refuser l'échantillon qui n'est pas approprié à la conduite de l'examen DHS, soit d'attendre un cycle de croissance de culture supplémentaire, afin que disparaisse l'effet de la culture *in vitro*); dans le second cas, une déclaration éventuellement erronée de respect du critère de distinction devra être rectifiée, ce qui entraînera l'annulation d'un droit octroyé.

IV. CONSEILS POUR L'ÉLABORATION DE PRINCIPES DIRECTEURS D'EXAMEN

Le document TGP/7 "Élaboration des principes directeurs d'examen" fournit un texte standard concernant la quantité de matériel végétal à fournir aux fins de l'examen DHS, mais il n'évoque pas la qualité du végétal. C'est pourquoi il est proposé d'ajouter un conseil, afin d'expliquer les problèmes que la source de matériel de multiplication pourrait poser dans le cadre de l'essai en culture.

Boutures (*ex vitro*) :

S'agissant de variétés à multiplication *ex vitro* classique – notamment des végétaux qui ne sont pas élagués au cours de l'essai en culture – des principes directeurs d'examen doivent éventuellement définir le type de bouturage à effectuer pour produire l'échantillon destiné à l'examen DHS. Plusieurs options se présentent :

- a) *Les végétaux doivent avoir été multipliés par boutures de tête et ne pas avoir été pincés ni élagués.*
- b) *Les végétaux doivent avoir été multipliés par boutures de tête et avoir été pincés/élagués/rabattus une fois/deux fois, etc., ou bien multipliés par boutures de conifères prélevées sur la partie centrale ou à la base de la plante mère.*
- c) *Les végétaux doivent avoir été multipliés par boutures de feuillus.*

Pour les plantes dont les effets topophysiques et cyclophysiques sont connus, les critères s'appliquant au matériel de multiplication, y compris l'origine du matériel de multiplication ou de reproduction prélevé de l'intérieur de la plante mère, doivent être particulièrement contraignants afin de garantir la comparabilité des variétés. Il est proposé d'insérer le conseil suivant, repris du document TG/96/4 (*Picea abies* (L.) Karst.), à titre d'exemple :

"Les greffons [ou les boutures] doivent être sélectionnés d'une manière à éviter des expressions causées par l'influence de la topophyse."

Micromultiplication

S'agissant de végétaux qui ne sont pas multipliés par la seule méthode de la culture de tissus, les principes directeurs d'examen peuvent préciser ceci :

“Le matériel végétal fourni doit, de préférence, ne pas être obtenu par multiplication in vitro.”

S'agissant de végétaux multipliés par culture tissulaire, les principes directeurs d'examen pourraient – si possible – prévoir régulièrement plus d'un cycle de croissance (éventuellement accompagné d'une multiplication supplémentaire), ce qui, d'une part, permettrait à l'examineur de détecter une micromultiplication non déclarée, et, d'autre, part, permettrait aux effets tardifs de la culture de tissus de se manifester, ce qui réduirait le risque de décision erronée relative à la distinction.

V. BIBLIOGRAPHIE

Bhat, S.R. and Srinivasan, S. (2002): Molecular and genetic analysis of transgenic plants: Considerations and approaches. *Plant Science* 163: 673-681

Fouad, M., Swartz, H.J. and Buta, G. (1991): The role of abscisic acid and plant growth regulators in tissue culture-induced rejuvenation of strawberry ex vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 75-84

Jesch, H.-H. and Plietzsch, A. (2000): Langzeit-Leistungsprüfung in vitro vermehrter Ziergehölze (Prunus). I. Morphologische Merkmale. *Gartenbauwissenschaft* 65: 203-2012

Jesch, H.-H. and Plietzsch, A. (2001): Langzeit-Leistungsprüfung in vitro vermehrter Ziergehölze (Prunus). II. Phänologische und physiologische Merkmale. *Gartenbauwissenschaft* 66: 61-67

Klaehn, F.U.: the relation of vegetative propagation to topophysis, cyclophysis and periphysis in forest trees.

Krüssmann, G. (1997): *Die Baumschule*. 6th Ed. Parey Berlin

Murashige T. and Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497

Ochatt, S.J., Pontécaille, C. and Rancillac, M. (2000): The growth regulators used for bud regeneration and shoot rooting affect the competence for flowering and seed set in regenerated plants of protein peas. *In Vitro Cell. Dev. Biol.; Plant* 36: 188-193

Smith, M.K. and Hamill, S.D. (1996): Field evaluation of micropropagated and conventionally propagated ginger in subtropical Queensland. *Austr. J. of Experimental Agriculture* 36: 347-54

Waldenmaier, S. and Bünemann, G. (1991): Ex vitro effects in micropropagation of *Syringa* L.; *Acta Horticulturae* 300

[Fin de l'annexe II et du document]