Rapport de mission Nicaragua

Novembre 2007

Appui scientifique et technique

Hervé Etienne
Micropropagation et génomique fonctionnelle du caféier
UMR 98 RPB
CIRAD-BIOS
TA A-98/IRD, 34398 Montpellier, Cedex 5, France

Dixième rapport technique du projet ECOM/CIRAD

Mission novembre 2007

Hervé Etienne

Préambule : L'objectif de cette mission était de faire le point sur les activités du laboratoire et des pépinières avec Eduardo Malo et Frédéric Georget environ six mois après l'arrivée de ce dernier. En novembre 2007, presque 800.000 embryons avaient été acclimatés, correspondant à la production de plantes pour 2008 (Prod2008), et il était très important de bien se mettre d'accord sur les itinéraires techniques à utiliser en pépinière pour ce matériel végétal. Au laboratoire, cette fin d'année correspondait également à une phase de transition par la mise en place d'un procédé de production d'embryons en milieu liquide plus performant devant permettre un changement d'échelle important.

Objectifs de la mission

A/ Bilan de la multiplication des génotypes destinés à l'établissement de champs semenciers
B/ Evaluation et organisation au niveau du laboratoire de la production 2009
C/ Appui au changement d'échelle en milieu liquide : suspensions cellulaires et grands bioréacteurs
D/ Efficacité de l'acclimatation en microtunnels à Sebacco
E/ Optimisation du transfert des plantules en tubetes dans les pépinières de la Cumplida
F/ Prévoir l'amélioration du laboratoire et les achats d'équipements de base pour 2008

Personnes rencontrées lors de la mission

- Frédéric Georget, Directeur technique du projet de micropropagation ECOM/CIRAD
- Eduardo Malo, Responsable du laboratoire ECOM/Nicaragua
- Christophe Montagnon, Manager du Projet
- Rafael Reyes, Responsable de la pépinière de vitroplants de la Cumplida

A) Bilan de la multiplication des génotypes destinés à l'établissement de champs semenciers

A.1/ Mâle stérile

Prêt de 10.000 embryons somatiques ont été produits et acclimatés au cours des derniers mois. Les conditions de production ont été nettement optimisées et la qualité de ce matériel au laboratoire est excellente. De même, l'acclimatation du mâle stérile ne pose pas de problème et les taux de réussite ainsi que les niveaux de croissance sont similaires à ceux obtenus pour des hybrides F1.
L'objectif de 2007 est donc atteint et un grand champ semencier pour la production de semences F1 pourra être établi à la finca la Cumplida. De grandes quantités d'embryons de mâles stériles sont encore présentes au laboratoire. Il est sage de maintenir cette activité jusqu'à ce que l'ensemble des champs semenciers ait pu être établi au Nicaragua et au Mexique. La priorité actuelle est l'expédition d'embryons somatiques pour acclimatation à la finca El Retiro au Mexique.

A.2/ Variété Nemaya

Des quantités importantes de l'un des géniteurs, le T-3751, ont été produites et l'acclimatation est en cours. L'autre géniteur, le T-3561, a été introduit *in vitro* et du cal embryogène devrait prochainement être disponible. Là aussi, il faudra équilibrer les lots acclimatés entre le Nicaragua et le Mexique. Des expéditions à la finca El Retiro pourront commencer en fin d'année 2008.

A.3/ Le T-3751 tétraploide

Cet individu est très récalcitrant à la culture *in vitro*. Néanmoins quelques foyers d'embryons commencent à être obtenus. Il faut les amplifier sur milieu gélifié. Parallèlement, des suspensions embryogènes de cet individu ont été établies et devraient permettre une propagation plus massive.

B) Evaluation et organisation au niveau du laboratoire de la production 2009

L'objectif de production pour 2008 (Prod 2008 : plantes vendues en 2008) était de 800.000 plantes, l'objectif pour 2009 est de 2,4 millions de plantes. Ce changement d'échelle s'accompagne également d'une modification dans les proportions des variétés hybrides multipliées et une extension de la gamme d'hybrides avec l'introduction des 5 hybrides ECOM/CIRAD. Dix hybrides F1 d'Arabica sont actuellement en cours de multiplication au laboratoire.

- Hybrides PROMECAFE : Une grande partie des embryons somatiques des 4 hybrides PROMECAFE pour 2009 a déjà été produite et leur acclimatation va débuter en janvier 2008. Dans ce but, 4 nouveaux tunnels d'acclimatation (capacité de 100.000 embryons chacun) ont été construits fin 2007. La capacité de l'aire d'acclimatation est maintenant de 900.000 embryons. Plus de 400.000 embryons stockés à 20°C vont

pouvoir être acclimatés. La production de nouveaux embryons doit se poursuivre à la fois à partir des bioréacteurs déjà en production en 2007 grâce à l'inoculation en bioréacteurs de tissus embryogènes début 2007 mais aussi à partir de bioréacteurs devant être inoculés au cours de cette mission à partir de tissus embryogènes obtenus plus récemment. Il a été décidé qu'une quinzaine de RITA®s devait être inoculés pour chaque hybride. Cette nouvelle inoculation a pour but de renouveler progressivement l'ensemble de la production. L'autre objectif est d'avoir en permanence du matériel végétal à tous les stades de développement et de pouvoir ainsi sécuriser la production (avoir toujours du matériel en amont permettra à tout moment de remplacer du matériel perdu accidentellement). Par ailleurs, un des hybrides qui n'a pas donné satisfaction au champ doit sortir de la production.

- Hybrides ECOM/CIRAD (ECi): Cinq hybrides ont été introduits. Ils sont produits en grande quantité et serviront à la mise en place de réseaux de validation agronomique clonaux multi-locaux au Nicaragua et surtout au Mexique.

Le changement d'échelle en 2008 doit être rendu possible pour différentes raisons :

1) l'activité du laboratoire est à présent routinière et bien organisée,
2) l'utilisation de suspension cellulaire est possible et permet d'accélérer le processus de régénération (voir ci-après),
3) l'utilisation de gros bioréacteurs en verre semble possible et doit permettre de produire plus d'embryons (voir ci-après).

C) Appui au changement d'échelle en milieu liquide : suspensions cellulaires et grands bioréacteurs

C.1/ Suspensions cellulaires

Depuis 6 mois, des essais sont réalisés pour évaluer le potentiel de régénération de suspensions d'hybrides d'Arabica multipliés sur des concentrations faibles d'auxine. L'équipe Nestlé a montré le potentiel de régénération des suspensions chez le Robusta mais, contrairement à l'Arabica, il est possible chez cette espèce de multiplier des agrégats embryogènes en absence d'auxine. Un taux de prolifération satisfaisant (x3 toutes les 4 semaines) est obtenu sur le long terme en présence d'une faible concentration en 2,4-D, et une production routinière et importante a été rapidement obtenue directement en bioréacteurs RITA® à partir de ces suspensions. Ce procédé est plus rapide que le procédé de régénération à partir de cal embryogène (environ 4 mois de moins) et permet de conserver des tissus embryogènes plusieurs mois. Il faudra toutefois veiller à ce que l'introduction d'une phase de multiplication en présence d'une faible concentration en 2,4-D ne provoque pas une augmentation significative de variants somaclonaux. Toutefois, des travaux antérieurs (Etienne and Bertrand, 2001, 2003 dans Tree Physiology) ont permis de déterminer les durées de multiplication et les concentrations en 2,4-D maximales à utiliser en suspension pour rester à des niveaux très faibles de variations somaclonales.

C.2/ Grands bioréacteurs

Différents types de recipients plus volumineux que le Rita® et en verre, ont été construits et sont en cours d'évaluation pas l'équipe à Sebacco. Outre leur plus grande capacité, ces bioréacteurs basés sur le principe des fioles jumelées (Twin-bioreactors), offrent d'autres

avantages tels que d'être produits localement (élimination du surcoût associé au transport ou au dédouanement) et d'être beaucoup moins chers. Par ailleurs, une année de production industrielle nous a montré qu'il n'était pas possible d'utiliser le Rita lors des toutes dernières étapes du procédé d'embryogenèse somatique. Le volume utile de ce bioréacteur étant trop petit, les quantités nécessaires pour la phase de pré-germination sont énormes et incompatibles avec la rentabilité économique du procédé. En effet, au cours de cette étape, le développement des cotylédons rend le volume des embryons somatiques beaucoup plus important. La fabrication d'un des modèles a été lancée et d'excellents résultats biologiques sont obtenus pour l'étape de pré-germination.

D/ Efficacité de l'acclimatation en microtunnels à Sebacco

Les microtunnels de confinement installés près du laboratoire offrent de bonnes conditions environnementales (humidité saturante et faible luminosité) pour l'acclimatation des embryons somatiques. Après les 10 semaines requises en phase 1, les pourcentages de pertes sont effectivement inférieurs à 3% et 60% des embryons ont régénéré une paire de feuilles. Cependant, il existe une disparité importante en fonction des hybrides. Par ailleurs, plusieurs dizaines de pourcents d'embryons n'ont pas réussi à émettre une paire de feuilles dans ce laps de temps et sont maintenus après repiquage dans ces conditions de confinement (F1bis).

Une grande partie d'entre eux régénérera des plantes ultérieurement. Même les embryons n'ayant pas produit de tige en phase 1bis ne meurent pas et une partie d'entre eux réussira finalement à évoluer en plantes. Cette observation met en évidence une possible et importante marge de progression lors de cette phase. Il doit être possible de favoriser une conversion en plantes plus rapide et plus efficace soit par l'optimisation de l'état physiologique des embryons pré-germés au niveau du laboratoire et/ou par une modification des conditions d'acclimatation, la fertilisation probablement. Un autre problème réside dans le fait qu'à l'issue de cette longue période, le matériel n'a pas été endurci par une accoutumance à des humidités plus faibles ou une luminosité plus forte. Enfin, la durée de cette phase de pure acclimatation F1 n'est elle pas trop longue ?

E/ Optimisation du transfert des plantules en tubetes dans les pépinières de la Cumplida (phase F2)

Dans les toutes premières semaines après transfert des plantules en tubetes, on observe régulièrement des brûlures sur les extrémités des feuilles pré-existantes. Les plantes affectées mettent une longue période à reprendre leur développement mais les nouvelles feuilles ne présentent plus de brûlures. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène :

- Une brûlure chimique provoquée par l'apport d'engrais azoté en conditions très confinées (la partie ammoniacale est très volatile et est susceptible de brûler les feuilles),
- Une brûlure par l'ensoleillement excessif (il y a moins d'ombrage dans les tunnels en phase 2),
- Une brûlure par un déficit hydrique ou dessèchement provoquée par une réduction trop brutale de l'humidité lors du passage de F1 en F2.

La mission d'Henri Régent et les essais de fertilisation conduits en phases F1 et F2 ont permis d'éliminer l'hypothèse d'une brûlure chimique. La localisation de la brûlure (uniquement aux extrémités des feuilles) permet d'écarter l'hypothèse d'une brûlure pas le soleil et est caractéristique d'un dessèchement. De plus, des essais de confinement en début de phase F2 ont permis d'éliminer ce problème. Ces brûlures et cet arrêt de croissance qui leur est consécutif sont donc provoqués par un choc trop brutal lors du passage de F1 en F2 (qu'il soit fait à Sebacco ou à la Cumplida) lié spécifiquement à l'humidité relative.

On retrouve le problème de manque d'endurcissement des plantes en fin de phase F1 où elles sont toujours sous 100% d'humidité. Il est souhaitable de préparer au niveau hydrique les plantes à leur transfert en F2 en les plaçant deux semaines sous 70-80% d'HR. Cette opération doit être réalisée préférentiellement à Sebacco et permettra d'avoir des plantes plus robustes en prévision de leur transfert à La Cumplida.
Des tunnels spécifiquement adaptés à cette phase d'endurcissement (humidité plus faible et luminosité plus forte) doivent être préparés à Sebacco. Il est souhaitable de disposer au plus vite de courbes modèles et de valeurs seuil ou repère concernant l'humidité et la luminosité pour pouvoir les ajuster en permanence et à n'importe quelle étape de pépinière.
En début de phase 2, suite au transporte et au repiquage de plantes, il est souhaitable pour favoriser leur reprise de re-confiner 2 ou 3 jours avant de revenir au niveau d'humidité antérieur (70-80%). Des essais doivent être faits afin d'optimiser la durée et les conditions de ce re-confinement.

F/ Prévoir l'amélioration du laboratoire et les achats d'équipements de base pour 2008

Le laboratoire est à présent saturé. La totalité des salles de culture sont pleines de matériel végétal alors qu'un changement d'échelle de production important est en cours. D'autre part, plusieurs équipements de base doivent être doublés par des appareils soit plus robustes (il doivent faire face aux longues coupures de courant journalières) soit plus grands et donc plus adaptés à la nouvelle échelle de production. C'est par exemple le cas du distillateur d'eau ou de l'autoclave. Enfin, quelques erreurs de conception du laboratoire doivent être corrigées pour y faciliter le travail (manque d'espace de bureaux, absence de salles de stockage pour les produits et petits matériels) et en améliorer la qualité et l'esthétique (exemple de la mise en place d'un toit).

En 2008, l'objectif du laboratoire est de produire plusieurs millions d'embryons destinés à différents pays. Il est souhaitable qu'un investissement soit fait le plus vite possible (à inclure dans le budget 2008) pour que son activité ne souffre pas d'un manque d'équipements ou de surface.

<u>Voici une liste des principaux investissement à prévoir :</u>

G-1) Equipements :

- Un distillateur ayant une capacité supérieure au distillateur actuel sous dimensionné.
- Un autoclave très simple et sans électronique.
- Des plateformes d'agitation pour les suspensions cellulaires.
- Une hotte à flux laminaire à 2 postes (dédié au travail avec suspensions cellulaires)
- Un second pHmètre de paillasse

G-2) Travaux sur le bâtiment

- Installation d'un toit sur l'ensemble de l'édifice et incluant les airs conditionnés extérieurs (protection contre le soleil et la pluie). Ce toit facilitera d'une part le refroidissement des salles de culture (actuellement, l'édifice ne dispose que d'une dalle de béton non isolée), et d'autre part évitera l'infiltration d'eau a l'intérieur du laboratoire durant la période des pluies.
- Extension du laboratoire pour disposer de :
    - Un secrétariat,
    - Un bureau supplémentaire,
    - Un petit laboratoire d'observation et de contrôle qualité,
    - Deux salles de culture,
    - Une aire de repiquage supplémentaire,
    - Des salles de stockage pour les produits et petits matériels.

La construction de ce bâtiment permettrait de réorganiser l'aire d'autoclavage actuelle. En gagnant sur la salle de réunion actuelle, il serait possible d'avoir une salle d'autoclavage plus grande et mieux adaptée aux besoins du laboratoire et de la séparer de la laverie, ce qui est recommandé mais n'a pas été prévu initialement.