

DÉVELOPPEMENT ACCÉLÉRÉ DE NOUVELLES VARIÉTÉS DE POMME DE TERRE VIA L'UTILISATION DE GREFFES ET DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES

RAPPORT FINAL

**Projet # 14-C-359
PROGRAMME D'APPUI FINANCIER AUX
REGROUPEMENTS ET AUX ASSOCIATIONS DE PRODUCTEURS
DÉSIGNÉS- VOLET C**

Responsables du projet :

**Clément Lalancette, Fédération des producteurs de pommes de terre du Québec,
Réjean Dubé, Centre de recherche Les Buissons**

Février 2017



ÉQUIPE DE RÉALISATION

S. Kristine Naess, Centre de recherche Les Buissons, responsable scientifique
358 rue Principale, Pointe-aux-Outardes, Québec, G0H 1M0
Tél: 418 567 2235 poste 222, FAX: 418 567 8791

Nicole Fournier, Centre de recherche Les Buissons, (MAPAQ) responsable technique
358 rue Principale, Pointe-aux-Outardes, Québec, G0H 1M0
Tél: 418 567 2235 poste 117, FAX: 418 567 8791

Stéphanie Devost, Centre de recherche Les Buissons, technicienne
358 rue Principale, Pointe-aux-Outardes, Québec, G0H 1M0
Tél: 418 567 2235 poste 117, FAX: 418 567 8791

Nancy Martel, Centre de recherche Les Buissons, aide-technique
358 rue Principale, Pointe-aux-Outardes, Québec, G0H 1M0
Tél: 418 567 2235 poste 117, FAX: 418 567 8791

REMERCIEMENTS

Ce projet a été réalisé grâce à une aide financière du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, dans le cadre du Volet C du Programme d'appui financier aux regroupements et aux associations de producteurs désignés.

L'équipe de recherche tient à remercier Maxime Bastien, Ph.D., Université Laval, ainsi que Marie-Hélène Déziel, M.Sc., MAPAQ pour leurs traductions précieuses et leurs commentaires constructifs sur la demande d'aide financier.

DÉVELOPPEMENT ACCÉLÉRÉ DE NOUVELLES VARIÉTÉS DE POMME DE TERRE VIA L'UTILISATION DE GREFFES ET DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES

**Clément Lalancette, Fédération des producteurs de pommes de terre du Québec,
Réjean Dubé, Centre de recherche Les Buissons**

Durée : 05/2015 – 02/2017

FAITS SAILLANTS

En moins de 2 ans nous avons réussi à faire 4 générations de croisements consécutives en utilisant une récolte de graines F1 immatures jumelée au greffage des plantes de pomme de terre sur des pieds de tomate. La sélection basée seulement sur les résultats des analyses biomoléculaires nous permettait de progresser d'une génération à la prochaine sans l'implication d'une étape de tubérisation. La nouvelle méthode accélérée était presque 8 fois plus rapide que la méthode standard (Tableau A).

OBJECTIF(S) ET MÉTHODOLOGIE

Développer une méthode d'amélioration génétique accélérée pour travailler avec des génotypes récalcitrants et des hybrides interspécifiques de pomme de terre afin de faciliter l'introgression de gènes d'intérêt. La production accrue de graines issues des croisements et la réduction du temps requis par génération ont été réalisées en agissant à quatre niveaux: 1) Greffage des parents femelles sur des plants de tomate, 2) Récolte des graines F1 immatures, 3) Tests des plantules issues des croisements avec des marqueurs moléculaires pour ne conserver que celles qui ont les gènes de résistance provenant du parent donneur et 4) Greffe des plantes retenues sur la base des marqueurs pour la prochaine génération de croisements.

RÉSULTATS SIGNIFICATIFS POUR L'INDUSTRIE

Les différences entre un système de sélection normal et le système de sélection accéléré sont résumés en tableau A. En moins de 2 ans nous avons réussi à faire 4 générations de croisements consécutives en utilisant une récolte de graines F1 immatures jumelée au greffage des plantes de pomme de terre sur des pieds de tomate. La sélection basée seulement sur les résultats des analyses biomoléculaires nous permettait de progresser d'une génération à la prochaine sans l'implication d'une étape de tubérisation. La nouvelle méthode accélérée était presque 8 fois plus rapide que la méthode standard (Tableau A). La réussite du système accéléré facilitera l'augmentation de l'utilisation de la biodiversité génétique disponible aux améliorateurs de la pomme de terre en réduisant de manière spectaculaire le nombre d'années requis pour l'intégration des caractéristiques des espèces sauvages dans une variété avec des qualités agronomiques acceptables.

Tableau A. Sommaire des deux systèmes d'amélioration génétique.

	Système	
	Normal	Accéléré
Matériel végétal	Tubercules	Tubercules/Boutures/Graines
Période de l'année	Printemps	Toute l'Année
Pots	6 litres	3 litres
Dormance Graines	Oui	Non
Sélections Biomoléculaires au Stade Plantule	Non	Oui
Sélections sur l'Apparence des Tubercules	Oui	Non
Temps Requis par Génération	156 semaines	20 semaines

APPLICATIONS POSSIBLES POUR L'INDUSTRIE

Les générations 4 et 5 produites lors du projet rentreront dans le programme d'amélioration génétique de la pomme de terre au CRLB. Les meilleurs génotypes avancés seront testés dans les essais réguliers du CRLB. Si certains possèdent d'excellentes qualités agronomiques, ils seront enregistrés comme cultivars. Les cultivars issus de ce travail qui seront enregistrés porteront des gènes de résistance au mildiou, au virus Y et au nématode doré. Les entreprises agricoles qui planteront ces variétés épargneront les coûts liés à l'achat et à l'application des pesticides normalement employés pour combattre ces ravageurs.

POINT DE CONTACT

Nom du responsable scientifique du projet : S. Kristine Naess

Téléphone : 418 567 2235 poste 222

Télécopieur : 418 567 8791

Courriel : kristine.naess@crlb.qc.ca

PARTENAIRES FINANCIERS

Ce projet a été réalisé grâce à une aide financière du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, dans le cadre du Volet C du Programme d'appui financier aux regroupements et aux associations de producteurs désignés.

ACTIVITÉS DE DIFFUSION ET DE TRANSFERT AUX UTILISATEURS

Des données préliminaires du projet ont été présentées au kiosque du Centre de recherche Les Buissons par Kristine Naess et Nicole Fournier lors du colloque sur la pomme de terre 2016 à Lévis le 18 novembre.

ACTIVITÉS DE TRANSFERT SCIENTIFIQUE

Le rapport final du projet sera publié sur le site Agri-Réseau. Un article scientifique est prévu dans le journal American Journal of Potato Research une fois que les résultats des essais au champ seront disponibles.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des Figures	8
Liste des Tableaux	9
Introduction	10
<u>Rappel des objectifs</u>	10
<u>Revue de la littérature</u>	11
<i>Raccourcir le temps par génération</i>	11
<i>Augmenter la réussite des croisements impliquant des hybrides et des cultivars récalcitrants</i>	12
<i>Introgession de gènes liés à des marqueurs moléculaires</i>	12
Description de la réalisation	14
<u>Génération 1: volet expérimental</u>	14
<i>Matériel végétal</i>	14
<i>Multiplication et greffage</i>	14
<i>Pollinisations</i>	15
<i>Dispositif expérimental et analyses statistiques</i>	15
<i>Résultats génération 1</i>	16
<u><i>La croissance en hauteur et l'indice de chlorophylle</i></u>	16
<u><i>La production de fleurs</i></u>	19
<u><i>La production de pollen et son taux de germination</i></u>	22
<u><i>La mise à fruit et la production de graines</i></u>	22
<u><i>La production de tubercules aériens</i></u>	24
<u><i>Conclusions génération 1</i></u>	25
<u>Génération 2 : volet non-expérimental</u>	26
<i>Déroulement génération 2</i>	26
<i>Résultats génération 2</i>	27
<u><i>Germination et PCR</i></u>	27
<u><i>Floraison, pollinisations et mise à fruit</i></u>	29
<u><i>Conclusions génération 2</i></u>	30
<u>Génération 3 : volet non-expérimental</u>	31
<i>Déroulement génération 3</i>	31
<i>Résultats génération 3</i>	33
<u><i>Germination et PCR</i></u>	33
<u><i>Greffage</i></u>	33
<u><i>Floraison, pollinisations et mise à fruit</i></u>	34
<u><i>Conclusions génération 3</i></u>	34

<u>Génération 4: volet non-expérimental</u>	35
<i>Déroulement génération 4</i>	35
<i>Résultats génération 4</i>	36
<u>Germination et PCR</u>	36
Discussion et conclusions	36
Bibliographie	38

Liste des Figures

Figure 1. Une greffe d'Envol bien prise sur un porte-greffé de tomate.	16
Figure 2. La croissance en hauteur des plantes selon la variété de pomme de terre et la variété du porte-greffé (variété de tomate) ou sur leurs propres racines (aucun).	17
Figure 3. L'indice de chlorophylle des plantes de pomme de terre selon la variété du porte-greffé (variété de tomate) ou sur leurs propres racines (aucun).	18
Figure 4. L'indice de chlorophylle des plantes selon la variété de pomme de terre et la variété du porte-greffé (variété de tomate) ou sur leurs propres racines (aucun).	18
Figure 5. La production de fleurs sur une plante de RB BC3 #2 sur ses propres racines (à gauche) versus sur un pied de tomate (à droite).	20
Figure 6. La production de fleurs des plantes sur leurs propres racines (aucun) et sur les pieds des quatre variétés de tomate sur 10 semaines.	21
Figure 7. La floraison de Russet Burbank était plus hâtive sur le porte-greffé Stupice que sur les pieds des autres variétés de tomate.	21
Figure 8. Les plantes de RB BC3 #2 étaient en fleurs 2 semaines avant les plantes de Russet Burbank indépendamment de la variété de tomate utilisée comme porte-greffé.	22
Figure 9. Le nombre de graines produit par baie des variétés de pomme de terre RB BC3 #2 et Russet Burbank selon le type de tomate, hâtif ou tardif, utilisé comme porte-greffé.	23
Figure 10. Le nombre de graines obtenu par plante selon la variété de tomate utilisée comme porte-greffé.	23
Figure 11. La production de tubercules aériens dans les axes des feuilles des plantes greffées.	24
Figure 12. La génération 2 en fleurs dans la serre, fin avril 2016.	29
Figure 13. L'extraction d'une portion des graines immatures d'une baie.	32

Tableau 1. La production de fleurs par plante selon la variété de pomme de terre et la variété du porte-greffe. 19

Tableau 2. Poids (g) des tubercules aériens produits dans les axes des feuilles des greffons selon la variété de pomme de terre et la variété du pied de tomate. 25

Tableau 3. Les résultats des analyses biomoléculaires des graines de la génération 2. 28

Tableau 4. Résultats des croisements entre des individus de la population HY1 et des individus des populations HY2, HY3 et HY4alt. 30

Tableau 5. Les résultats des analyses biomoléculaires des graines de la génération 3. 33

Tableau 6. Résultats des croisements entre des individus des populations HY5, HY6 et HY7alt et respectivement les variétés QP11005, GoldRush et QP11001 à QP11004. 34

Tableau 7. Les résultats des analyses biomoléculaires des graines de la génération 4, population HY9. 36

Tableau 8. Différences entre deux systèmes d'amélioration génétique. 37

DÉVELOPPEMENT ACCÉLÉRÉ DE NOUVELLES VARIÉTÉS DE POMME DE TERRE VIA L'UTILISATION DE GREFFES ET DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES

Introduction

Le mildiou, le virus Y et le nématode doré sont des ravageurs de grande importance pour l'industrie de la pomme de terre. La lutte génétique via le développement de cultivars résistants est une avenue prometteuse puisqu'elle ne demande aucune modification à la régie de culture tout en épargnant l'environnement. Souvent les gènes de résistance proviennent de variétés non agronomiques, voire d'espèces sauvages apparentées à la pomme de terre, qu'il est difficile de croiser avec la pomme de terre cultivée. De plus les gènes de résistance sont presque toujours associés à d'autres gènes ayant des effets indésirables d'un point de vue agronomique. Il faut faire plusieurs générations de rétrocroisements pour briser ces associations. Concrètement, avec l'approche classique on peut compter entre 15 et 20 ans sinon plus pour intégrer un gène de résistance dans un fond génétique agronomique, un délai beaucoup trop long. Il est primordial de développer de nouvelles approches pour raccourcir ce délai.

Rappel des objectifs

L'objectif du projet est de développer une méthode d'amélioration génétique accélérée pour travailler avec des génotypes récalcitrants et des hybrides interspécifiques de pomme de terre afin de faciliter l'introgression de gènes d'intérêt.

L'hypothèse est qu'il soit possible de mettre au point une méthode faisant appel aux greffes et aux marqueurs moléculaires pour accélérer le développement de nouvelles variétés de pomme de terre à partir de croisements impliquant des génotypes récalcitrants et des espèces sauvages apparentées.

Au total quatre générations de croisements seront faites sur deux ans.
La production accrue de graines issues des croisements et la réduction du temps requis par génération seront réalisées en agissant à quatre niveaux:

- 1) Greffe des parents femelles sur des plants de tomate pour accélérer la floraison, augmenter le nombre de fleurs et la mise à fruit.
- 2) Récolte des graines F1 immatures pour éviter qu'elles entrent en dormance.
- 3) Tests des plantules issues des croisements avec des marqueurs moléculaires pour ne conserver que celles qui ont les gènes de résistance provenant du parent donneur.
- 4) Greffe des plantes retenues sur la base des marqueurs pour qu'elles produisent rapidement des fleurs et faire la prochaine génération de croisements.

Revue de la littérature

De nombreux gènes d'intérêt présents chez des espèces sauvages apparentées à la pomme de terre sont difficiles à insérer dans le fond génétique tétraploïde de la pomme de terre cultivée, en raison de différences du nombre de chromosomes et de l'endosperme. L'hybridation somatique a été utilisée pour surmonter cette difficulté, en particulier pour introduire le gène de résistance à large spectre RB et d'autres gènes de résistance chez la pomme de terre cultivée (Helgeson et al., 1998; Naess et al., 2000; Song et al., 2003). Cependant des problèmes de fertilité des générations aneuploïdes BC1 et BC2 issues des rétrocroisements peuvent ralentir le travail dans les rétrocroisements subséquents et nuire au développement de variétés de pomme de terre améliorées porteuses du gène d'intérêt. De plus, des problèmes de fertilité mâle, de faible floraison et de faible mise à fruit sont fréquemment observés chez certains cultivars récalcitrants, notamment Russet Burbank, ce qui réduit les chances de réussir à développer des nouveaux cultivars lorsqu'on les utilise comme parent pour des croisements. Dans ce projet nous voulons mettre au point une méthode d'amélioration génétique accélérée pour travailler avec des cultivars récalcitrants et des hybrides interspécifiques de la pomme de terre dans le but de faciliter l'introgression rapide de gènes d'intérêt. Pour ce faire on combinera les greffes, la récolte hâtive des graines issues de croisements et la sélection assistée par marqueurs. Trois gènes d'intérêt, le gène Ryadg conférant la résistance au virus Y (Hämäläinen et al., 1998), le gène H1 conférant la résistance au nématode doré (Ellenby, 1952), et le gène RB conférant une résistance à large spectre au mildiou (Song et al., 2003) seront ciblés dans des croisements impliquant les cultivars Russet Burbank (recalcitrant aux croisements), GoldRush et Envol au moyen de la méthode d'amélioration génétique accélérée.

Raccourcir le temps par génération

L'amélioration génétique de la pomme de terre est un processus assez long qui nécessite typiquement quinze ans entre le croisement et l'arrivée d'une nouvelle variété sur le marché. La période de tests des clones avancés qui a lieu vers la fin du processus ne peut pas être réduite sans compromettre les résultats. Toutefois, plusieurs années au début du processus d'amélioration génétique peuvent être retranchées en faisant appel à des méthodes accélérées. De telles techniques sont particulièrement utiles lorsque plusieurs générations de croisements doivent être faites pour intégrer quelques gènes d'intérêt en même temps. Les générations de croisements peuvent ainsi être effectuées plus rapidement sans devoir passer par l'évaluation de la résistance en serre et au champ lorsqu'on utilise des marqueurs moléculaires pour identifier les génotypes porteurs des gènes d'intérêt. Le temps par génération de croisements peut aussi être réduit significativement lorsqu'on contourne les mécanismes naturels de dormance des graines en récoltant les fruits avant la maturité et en plantant les graines avant qu'elles ne commencent à se déshydrater (Jansky et al., 2012). Le temps par génération peut être diminué encore plus en greffant les tiges de pomme de terre sur des porte-greffes de tomate, ce qui empêche la formation de tubercules et induit une floraison abondante chez le greffon (Weinheimer et Woodbury, 1966). L'utilisation de greffes entre du matériel issu de la culture de tissus et des plantules de tomate permet également de faire des croisements à tout moment de l'année sans avoir à se préoccuper de la dormance des tubercules.

Augmenter la réussite des croisements impliquant des hybrides et des cultivars récalcitrants

Il a été démontré que la greffe de cultivars récalcitrants sur d'autres espèces du genre *Solanum* augmente la floraison et la mise à fruit (Weinheimer et Woodbury, 1966; Carson et Howard, 1945; Upadhyay et al., 1984). La greffe d'hybrides somatiques pomme de terre/tomate sur un porte-greffe de tomate a également été utilisée pour obtenir des fleurs et des graines chez cet hybride interspécifique (Helgeson et al., données non présentées).

Introgression de gènes liés à des marqueurs moléculaires

Des marqueurs moléculaires ont été développés pour les trois gènes de résistance qui seront introduits chez des cultivars de pomme de terre dans le cadre de ce projet. Le marqueur SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region) RYSC3 développé par Kasai et al. (2000) co-ségrège avec le gène Ryadg qui confère la résistance au virus Y. Dans ce travail les 103 clones de pomme de terre diploïde et tétraploïde d'origine diverse qui étaient porteurs de l'allèle résistant étaient bel et bien résistants au virus Y. Différents travaux ont rapportés avoir fait appel à ce marqueur pour suivre la résistance au virus Y dans des populations en ségrégation issues de programmes d'amélioration génétique (Ottoman et al., 2009; Whitworth et al., 2009; Ortega et Lopez-Vizcon, 2012). Nous avons utilisé les séquences de Kasai et collaborateurs (2000) pour faire le design de paires d'amorces légèrement différentes. Celles-ci ont été utilisées pour cibler notre banque de germoplasme (Naess et al., données non présentées). Pour le gène H1 nous criblons présentement la banque avec le marqueur SCAR 57R (Finkers-Tomczak et al., 2010). Pour le gène RB nous utilisons un marqueur mis au point par Colton et al. (2006).

Les trois gènes qui seront utilisés dans ce projet ne proviennent pas de la pomme de terre cultivée *Solanum tuberosum* spp *tuberosum*. Les gènes H1 et Ryadg proviennent tous deux de *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* alors que le gène RB provient de *Solanum bulbocastanum*. Le gène H1 a été utilisé par des phytogénéticiens depuis des décennies et est porté par de nombreux cultivars de pomme de terre, notamment Atlantic, sorti en 1976. On peut raisonnablement penser que ce gène de résistance n'est pas associé à des allèles ayant des effets indésirables (linkage drag). L'utilisation des gènes Ryadg et surtout du gène RB est beaucoup plus récente et il y a de fortes chances qu'ils soient liés à des allèles indésirables. Ici l'utilisation d'une approche pour accélérer les cycles de croisements afin de briser de tels liens indésirables chez les régions chromosomiques provenant des espèces sauvages sera essentielle. Au cours de ce projet nous allons évaluer l'association de chacun des trois gènes avec de nombreux caractères agronomiques d'intérêt comme le nombre de tubercules, le rendement, l'apparence générale, la profondeur des yeux, la couleur de la peau et de la chair ainsi que la densité relative. Forts de ces données nous pourrons déterminer si des cycles de rétrocroisements supplémentaires sont nécessaires afin de ramener les gènes de résistance dans un fond génétique acceptable avant de faire les croisements qui mèneront à l'enregistrement de variétés.

La recherche proposée dans ce projet comprend deux générations de rétrocroisements dans le but d'obtenir des clones qui ressembleront beaucoup aux parents récurrents possédant de bonnes qualités agronomiques. Un obstacle qui pourrait survenir est la perte de la vigueur hybride chez les génotypes obtenus des rétrocroisements. Bien que la perte de vigueur hybride soit fréquemment rapportée dans l'amélioration génétique de la pomme de terre, Mullin et Lauer (1966) ont conclu que trois ou quatre générations d'autofécondation peuvent avoir lieu avant qu'une réduction significative du rendement ou de la proportion ségréante à haut rendement dans les lignées issues de croisements soit observée. Bien que la base génétique de la pomme de terre cultivée aujourd'hui remonte à un nombre restreint de cultivars ancestraux, il y a beaucoup

d'exemples d'autofécondation dans le pedigree de cultivars contemporains. Ceux-ci ne sont pas moins hétérozygotes que des génotypes sauvages apparentés (Hirsch et al., 2013). Néanmoins, l'observation d'une réduction du rendement moyen chez une ou des populations BC2 (deuxième rétrocroisement) comparativement aux populations BC1 pourrait être un signe de la perte de vigueur hybride ou du manque de pression de sélection pour des caractères agronomiques (Sanford, 1979) lors des quatre générations de croisements proposées dans ce projet de recherche.

Description de la réalisation

Génération 1: volet expérimental

Les objectifs de la première génération étaient de (1) déterminer si le greffage des boutures de pomme de terre sur des pieds de tomate pouvait contribuer à raccourcir le temps entre des générations consécutives de croisements et de (2) faire l'introgression des gènes de résistance H1 et Ryadg dans le bagage génétique des variétés de pomme de terre performantes Russet Burbank, GoldRush et Envol ainsi que l'introgression du gène Ryadg dans des plantes avec le gène RB.

Les croisements prévus pour la génération 1 étaient les suivants :

HY1) RB BC3#2 x QP09159.20 (QP09159.20= Satina x NY Y73-49)

HY2) Russet Burbank x QP05007.10 (QP05007.10=Andover x LBR24)

HY3) GoldRush x QP05007.10

HY4) Envol x QP05007.10

Matériel végétal

Greffage

Greffons à partir des boutures de 4 variétés de pomme de terre

RB BC3 #2 (porteur du gène RB contre le mildiou)

Envol

GoldRush

Russet Burbank

Porte-greffes: 4 variétés de tomates dont 2 hâties et 2 tardives

Maxifort

MoneyMaker

Siderno

Stupice

Multiplication et greffage

La multiplication des boutures *in vitro* des parents femelles pour les fins de l'essai a été faite pendant l'été 2015. Un premier test pour bien synchroniser la plantation des boutures de pomme de terre provenant de la culture *in vitro* et le semage des graines de tomate pour le greffage nous a appris que le semage des graines devait suivre la plantation des boutures par une semaine.

Début septembre 2015 les boutures des quatre variétés de pomme de terre provenant de la culture *in vitro* ont été plantées dans des pots de 4 pouces contenant un substrat de pro-mix (Premier Tech). Des tubercules des deux génotypes mâles, QP05007.10 et QP09159.20, ont été plantés dans des pots de 6 litres la semaine suivante. Le semage des graines des quatre variétés de tomate servant de porte-greffes, s'est fait dans des pots de 2 pouces la semaine suivant la plantation des boutures des quatre variétés de pomme de terre. Deux semaines plus tard, les plantules de tomate

ont été transplantées dans des pots de 3 litres contenant du pro-mix avec mycorhizes. Le greffage des tiges de pomme de terre sur les racines des tomates s'est fait la semaine suivante, la semaine du 28 septembre. Un greffon d'environ 2 cm était coupé avec un angle d'environ 60° et attaché sur le porte-greffe qui était coupé sous les cotylédons avec le même angle. Les greffons sont tenus en place avec des pince-greffes de 1.5mm ou 2.1mm selon le diamètre du greffon. Dix greffes par variété de pomme de terre et de tomate ont été effectuées afin d'obtenir au moins 7 répétitions de chaque combinaison pour l'expérience.

Les plantes greffées et les témoins non-greffés ont été maintenus dans une chambre de croissance avec des températures moyennes de 20 à 25 °C et une photopériode de 18 heures. Les plantes ont été fertilisées une fois/semaine avec de l'engrais 20-20-20 (350 ppm) mélangé à une solution de 10 mM de CaCl₂ pour réduire la formation d'oedèmes sur les feuilles (Schabow et Palta, 2013).

À partir du 26 octobre 2015, (4 semaines après le greffage) des données sur la croissance en hauteur et la perte de chlorophylle (comme mesure de sénescence) ont été prises aux deux semaines pendant 8 semaines. Les stolons aériens ont été coupés régulièrement afin d'éviter qu'ils s'implantent dans le sol et produisent des tubercules.

Pollinisations

Une fois la floraison commencée, les croisements de la première génération ont été faits. Sur les deux grappes de fleurs d'une inflorescence, la première fleur a été enlevée afin de vérifier la production de pollen et son taux de germination. Ensuite, les deux prochaines fleurs ont été émasculées pour être pollinisées le lendemain. Les bourgeons restants ont été comptés et éliminés. Des données sur le nombre de fleurs, la mise à fruit et le nombre de graines par baie produit ont été prises. Les poids des tubercules produits par les témoins ainsi que les poids des tubercules aériens produits ont aussi été notés.

Dispositif expérimental et analyses statistiques

Le dispositif expérimental était une factorielle incomplète dont 4 variétés de pomme de terre récalcitrantes (Russet Burbank, GoldRush, Envol et RB BC3 #2) x 2 types de porte-greffes (hâtives vs tardives) x 2 variétés de tomate par type de tomate (Siderno et Stupice vs MoneyMaker et Maxifort) + les témoins des 4 variétés de pomme de terre sur leurs propres racines. Il y avait 7 répétitions par traitement.

Les données ont été analysées avec la procédure MIXED du logiciel SAS (SAS institut, 1999). Pour l'analyse des données à travers le temps nous avons utilisés un modèle mixte à mesures répétées.



Figure 1. Une greffe d'Envol bien prise sur un porte-greffe de tomate.

Résultats génération 1

La croissance en hauteur et l'indice de chlorophylle

Toutes les greffes ont bien pris (Fig. 1). Le greffage retardait la croissance en hauteur des plantes vis-à-vis les témoins non-greffés mais les plantes greffées finissaient par rattraper les témoins après 6 semaines (Fig. 2).

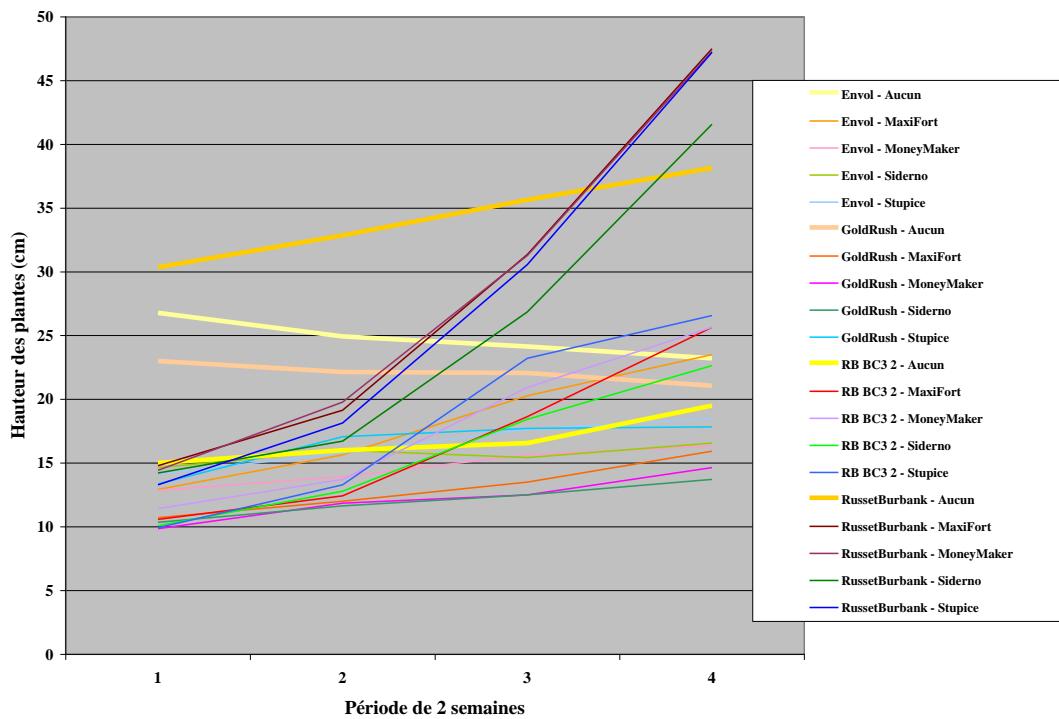


Figure 2. La croissance en hauteur des plantes selon la variété de pomme de terre et la variété du porte-greffe (variété de tomate) ou sur leurs propres racines (aucun).

Le greffage des variétés de pomme de terre sur des pieds de tomate avait un effet significatif ($P \leq .0001$) sur l'indice de chlorophylle dans les feuilles, indice utilisé comme mesure de la sénescence des plantes. Les plantes de pomme de terre sur leurs propres racines perdaient de la chlorophylle pendant les 8 semaines de mesures. Par contre, dans les plantes sur pied de tomate, nous observions une augmentation de l'indice de chlorophylle après une perte initiale (Fig. 3). L'augmentation de l'indice de chlorophylle était plus prononcée dans les plantes sur pieds des variétés indéterminées (MoneyMaker et Maxifort) que sur pieds des variétés hâties (Siderno et Stupice).

L'indice de chlorophylle variait aussi entre les variétés de pomme de terre ($P \leq .0001$). Pour les deux variétés Envol et GoldRush sur ses propres racines la perte de chlorophylle à travers le temps était plus grande que pour les variétés plus tardives, Russet Burbank et RB BC3 #2 (Fig. 4). Inversement, sur pied de tomate, l'augmentation de l'indice de chlorophylle après une perte initiale était plus prononcée pour les variétés Russet Burbank et RB BC3 #2 que pour les variétés Envol et GoldRush.

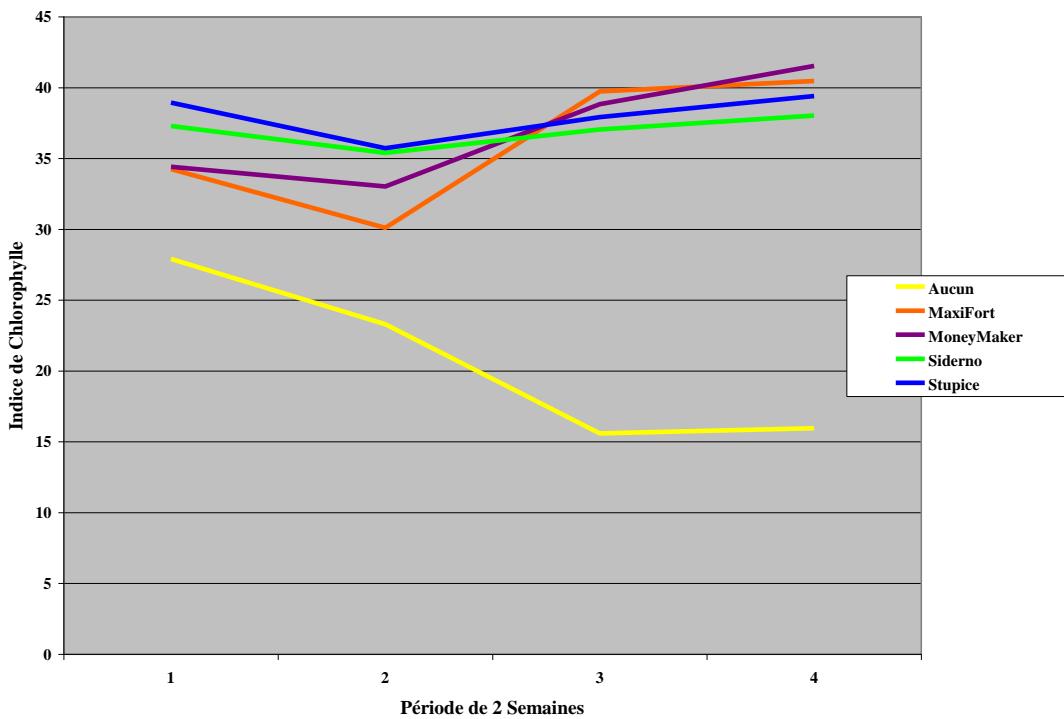


Figure 3. L'indice de chlorophylle des plantes de pomme de terre selon la variété du porte-greffe (variété de tomate) ou sur leurs propres racines (aucun).

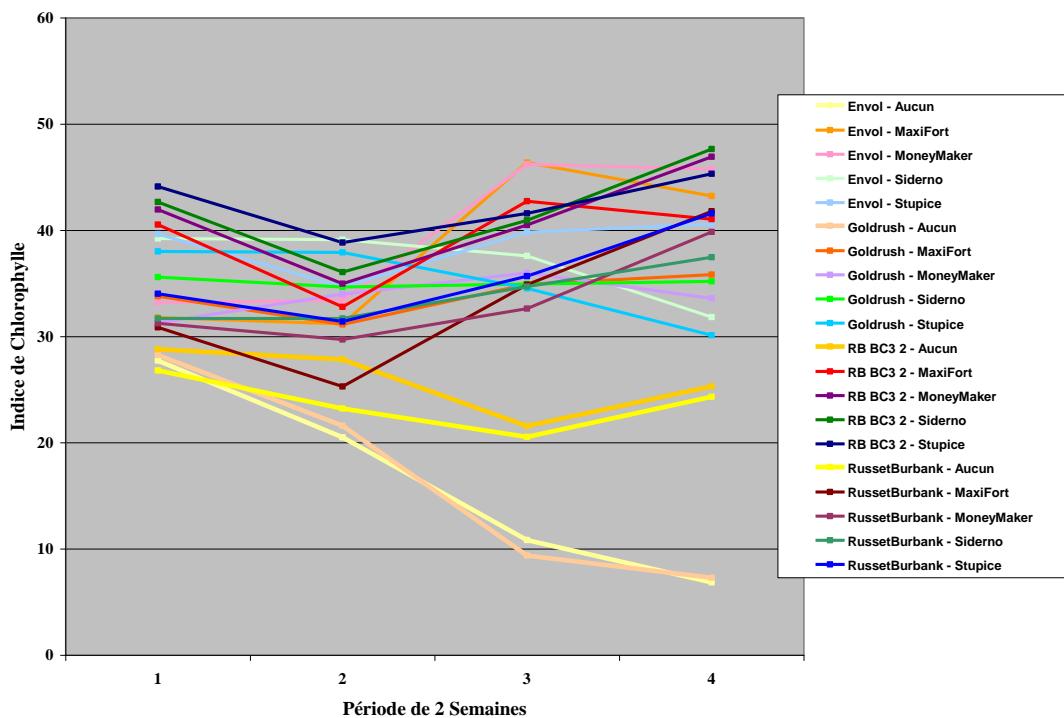


Figure 4. L'indice de chlorophylle des plantes selon la variété de pomme de terre et la variété du porte-greffe (variété de tomate) ou sur leurs propres racines (aucun).

Tableau 1. La production de fleurs par plante selon la variété de pomme de terre et la variété du porte-greffe.

Fleurs par plante						
		Variété de pomme de terre				
Pied de tomate	Envol	GoldRush	RB BC3 #2	Russet Burbank	Moyenne	
Stupice	0	0	60 a	27 a	22 a	
MoneyMaker	0	0	31 b	26 a	14 b	
Siderno	0	0	23 b	19 ab	11 bc	
Maxifort	0	0	23 b	14 b	9 c	
Aucun	0	0	5 c	0 c	1 d	

Les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents à $\alpha = 0.05$

La production de fleurs

Deux des variétés de pomme de terre dans l'expérience, Envol et GoldRush, n'ont pas fait de fleurs, ni sur ses propres racines et ni sur des pieds de tomate (Tableau 1). Pour les deux autres variétés, RB BC3 #2 et Russet Burbank, la production de fleurs était meilleure sur les plantes greffées que sur ses propres racines ($P \leq 0.0001$) (Tableau 1, Fig. 5). Russet Burbank n'a pas fait de fleurs sur ses propres racines et RB BC3 #2 a produit en moyenne 5 fleurs par plante sur ses propres racines versus 34 fleurs sur des plantes greffées sur pied de tomate. Il y avait aussi des effets de la variété de tomate utilisée comme porte-greffe sur la production de fleurs chez les deux variétés de pomme de terre ayant produits des fleurs. Chez les deux, les greffes sur la variété Stupice ont produit plus de fleurs que les greffes sur la variété Maxifort. En moyenne les greffes sur Stupice ont produit plus de fleurs que les greffes sur les trois autres variétés de tomate. Il n'y avait pas d'effet significatif du type de variété de tomate sur la production de fleurs du greffon.

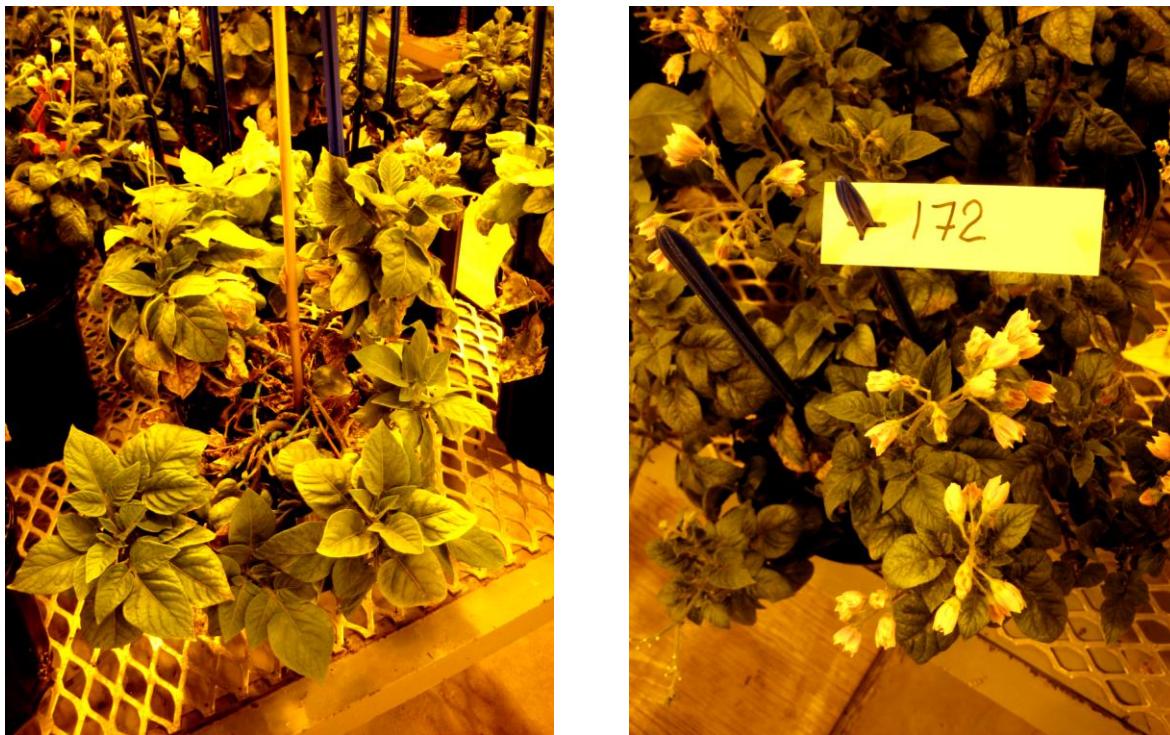


Figure 5. La production de fleurs sur une plante de RB BC3 #2 sur ses propres racines (à gauche) versus sur un pied de tomate (à droite).

Malgré un départ tardif, les plantes sur pied de tomate ont commencé à fleurir aussi vite que les plantes sur ses propres racines (Fig. 6). Les premières fleurs ont été pollinisées le 25 novembre 2015, 8 semaines après le greffage. Pendant que la production de fleurs augmentait avec le temps sur les plantes sur pied de tomate, la production florale des plantes sur ses propres racines stagnait.

La variété du porte-greffe ainsi que la variété du greffon avaient des effets sur la période de floraison des plantes. Les greffons de Russet Burbank sur le porte-greffe Stupice étaient en fleurs 2 semaines avant les greffons sur les pieds de Siderno ou de Maxifort (Fig. 7) et les plantes de RB BC3 #2 étaient en fleurs 2 semaines avant les plantes de Russet Burbank indépendamment de la variété de tomate utilisée comme porte-greffe (Fig. 8).

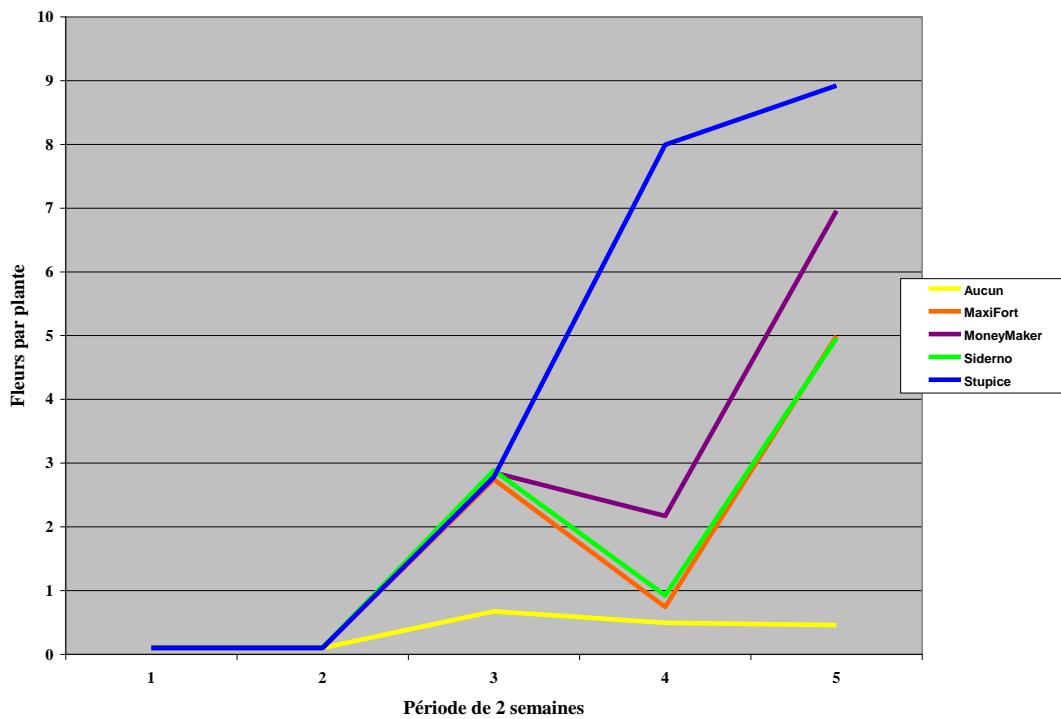


Figure 6. La production de fleurs des plantes sur leurs propres racines (aucun) et sur les pieds des quatre variétés de tomate sur 10 semaines.

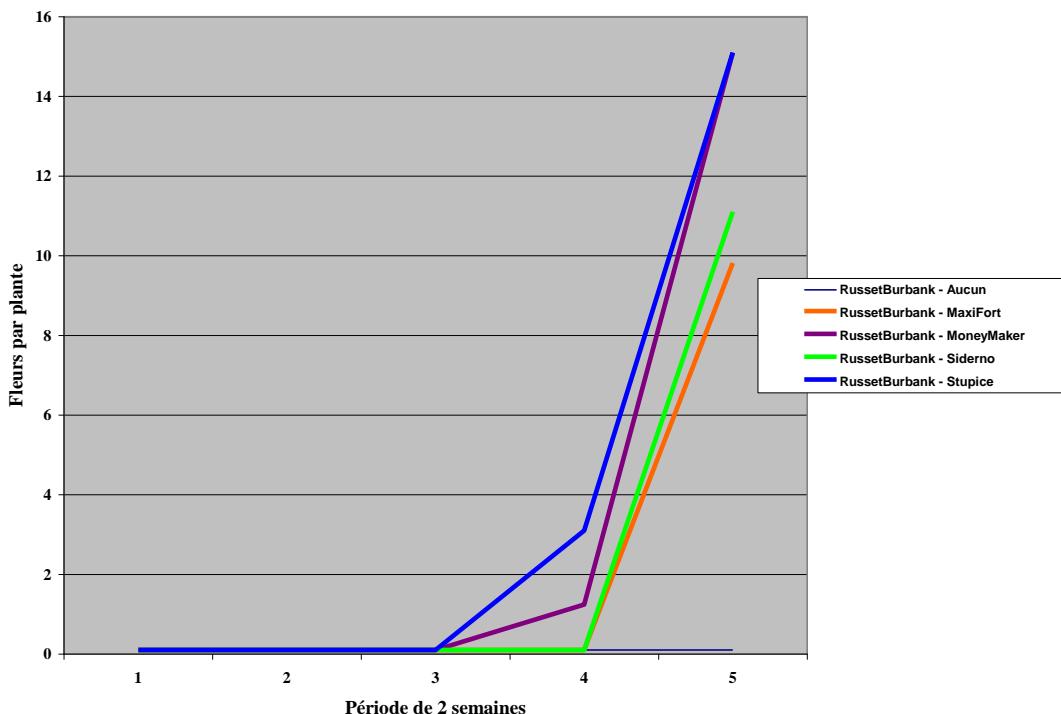


Figure 7. La floraison de Russet Burbank était plus hâtive sur le porte-greffe Stupice que sur les pieds des autres variétés de tomate.

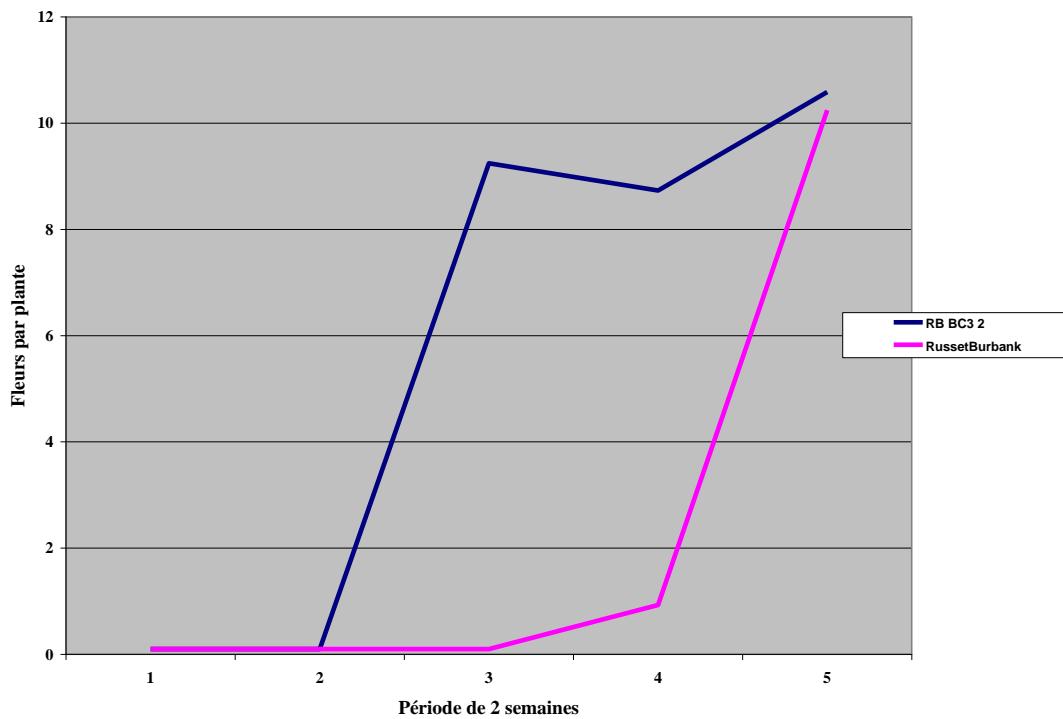


Figure 8. Les plantes de RB BC3 #2 étaient en fleurs 2 semaines avant les plantes de Russet Burbank indépendamment de la variété de tomate utilisée comme porte-greffe.

La production de pollen et son taux de germination

Aucune donnée sur l'effet des porte-greffes sur la production de pollen ou de son taux de germination n'a été obtenue. Deux des variétés de pomme de terre dans l'expérience, Envol et GoldRush, n'ont pas produit de fleurs. Les deux autres variétés, RB BC3 #2 et Russet Burbank n'ont pas produit de pollen.

La mise à fruit et la production de graines

La mise à fruit était excellente. Sur les 389 fleurs pollinisées, 321 (82%) ont produit des baies. Il n'y avait pas d'effet des variétés de tomate utilisées comme porte-greffes sur la mise à fruit des plantes qui ont fleuri. Cependant, comme la variété Russet Burbank n'a pas produit de fleurs sur ses propres racines, l'effet du greffage comme tel n'a pas pu être examiné. La mise à fruit était meilleure chez la variété RB BC3 #2 que chez Russet Burbank. Russet Burbank, par contre, a produit plus de graines par baie que la variété RB BC3 #2 ($P \leq .0001$). Le nombre de graines produit en utilisant des variétés de tomate hâties comme porte-greffe pour les greffons de Russet Burbank était plus élevé qu'en utilisant des variétés de tomate tardives comme porte-greffe ($P = .001$) (Fig. 9). Finalement, la meilleure des quatre variétés de tomate essayées comme porte-greffe afin d'obtenir des graines était Stupice. Sur ce porte-greffe, les greffons de pomme de terre ont produit presque deux fois plus de graines que sur les autres porte-greffes (Fig. 10).

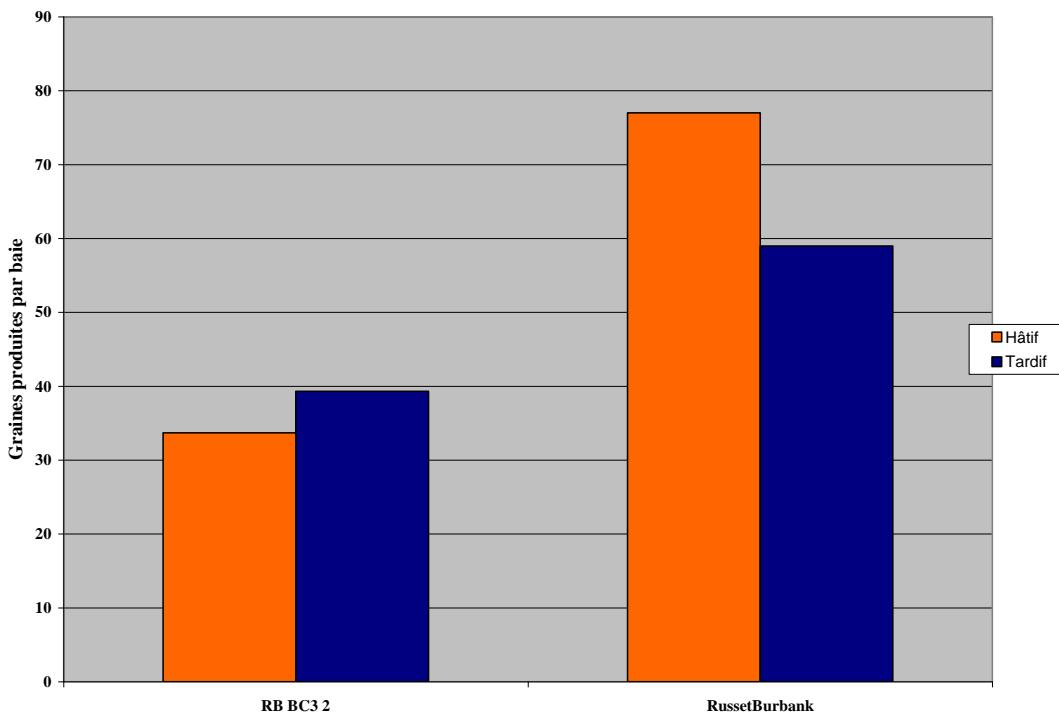


Figure 9. Le nombre de graines produit par baie des variétés de pomme de terre RB BC3 #2 et Russet Burbank selon le type de tomate, hâtif ou tardif, utilisé comme porte-greffe.

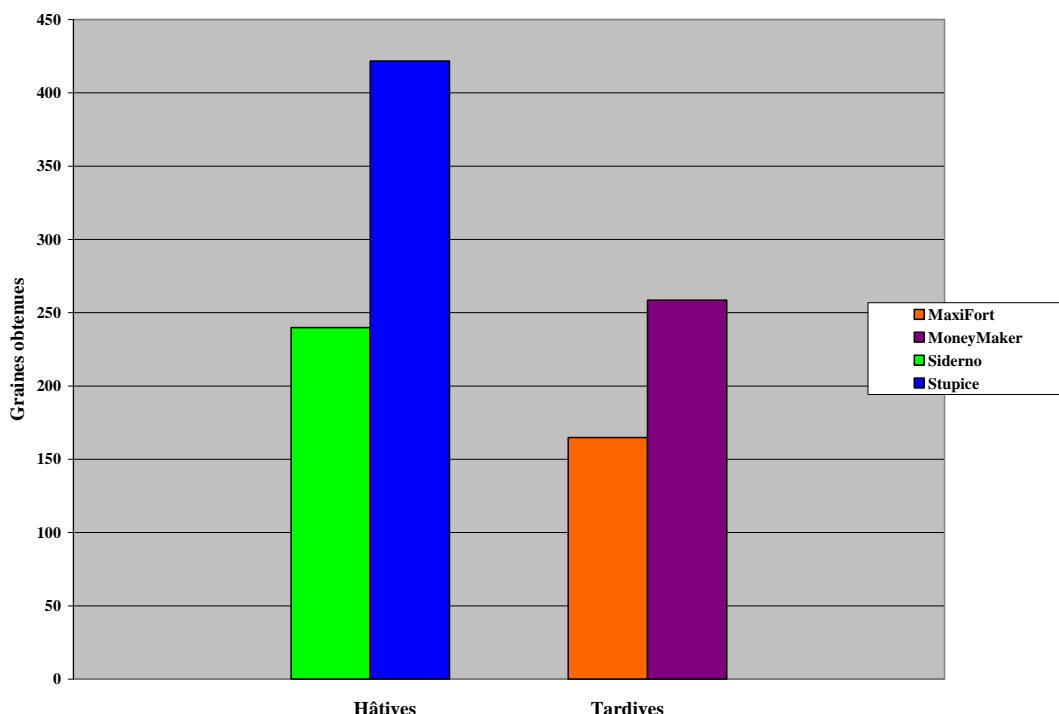


Figure 10. Le nombre de graines obtenu par plante selon la variété de tomate utilisée comme porte-greffe.



Figure 11. La production de tubercules aériens dans les axes des feuilles des plantes greffées.

La production de tubercules aériens

Deux des variétés de pomme de terre incluses dans l'expérience, soit Envol et GoldRush, n'ont pas produit de fleurs, ni sur leurs propres racines et ni sur les pieds de tomate. Dans les axes des feuilles des plantes greffées de ces deux variétés des tubercules aériens se sont formés (Fig. 11). La production de tubercules aériens était plus élevée sur le porte-greffe hâtif Siderno que sur le porte-greffe tardif Maxifort (Tableau 2).

Tableau 2. Poids (g) des tubercules aériens produits dans les axes des feuilles des greffons selon la variété de pomme de terre et la variété du pied de tomate.

Pied de tomate	Envol	Poids (g) des tubercules aériens					
		Variété de pomme de terre			Russet	Burbank	
		GoldRush	RB BC3 #2	#2		Moyenne	
Siderno	147	a	136	a	0	13	74 a
Stupice	136	a	134	a	0	0	68 ab
MoneyMaker	143	a	123	a	0	7	68 ab
Maxifort	109	b	123	a	0	0	58 b
Aucun	0	c	0	b	0	0	0 c
Moyenne	107		103		0	4	

Les chiffres suivis de la même lettre ne sont pas significativement différents à $\alpha = 0.05$

Conclusions génération 1

Le greffage des boutures de pomme de terre provenant de la culture *in vitro* sur des pieds de tomate nous permet d'obtenir des fleurs et des graines de plusieurs variétés incluant la variété récalcitrante Russet Burbank. Ceci nous libère des contraintes saisonnières imposées par la disponibilité de tubercules et la dormance des tubercules des parents dans un programme d'amélioration génétique. Le type de variété de tomate, mais surtout la variété spécifique utilisée comme porte-greffe sont importants. Dans notre cas, les greffons de pomme de terre sur la variété de tomate hâtive Stupice étaient les plus hâtifs et produisaient plus de fleurs et de graines que les greffons sur d'autres variétés de tomate. Pour les prochaines générations, nous poursuivrons avec le greffage des plantes de pomme de terre sur pied de tomate en utilisant seulement la variété Stupice comme porte-greffe.

La variété de pomme de terre aussi influençait les résultats obtenus. Deux des quatre variétés, soit Envol et GoldRush, n'ont pas fleuri, ni sur ses propres racines, ni comme greffon sur les pieds de tomate. Il y avait aussi un manque de synchronisation entre les périodes de floraison des deux variétés RB BC3 #2 et Russet Burbank. Ce manque de synchronisation aurait pu devenir un problème dans les prochaines générations dans lesquelles des croisements entre la progéniture de RB BC3 #2 et la progéniture de Russet Burbank se font. Pour la génération 2 nous avons dévié légèrement des protocoles prévus afin d'éviter ce problème.

Génération 2 : volet non-expérimental

L'objectif de la deuxième génération était d'assembler les trois gènes d'intérêt; RB, Ryadg et H1 dans des individus de trois populations soit une population descendant d'Envol (HY7alt), une population descendant de GoldRush (HY6) et une population descendant de Russet Burbank (HY5).

Les gènes RB et Ryadg issus du croisement HY1 sont introgressés dans les trois autres populations contenant Ryadg et/ou H1 en faisant les croisements suivants:

- HY5) HY1 x HY2 et croisements réciproques
- HY6) HY1 x HY3 et croisements réciproques
- HY7) HY1 x HY4alt et croisements réciproques

Pour les variétés GoldRush et Envol qui n'ont pas produit de fleurs sur ses propres racines ou sur les porte-greffes de tomate nous n'avons pas obtenu de graines pour poursuivre avec le HY3 ou HY4. Pour ces deux variétés nous avons pigé dans notre banque de graines et de tubercules au CRLB des années précédentes afin de continuer l'expérience comme prévu. Pour GoldRush nous avions le bon croisement dans notre banque de mini-tubercules et pour Envol nous avons choisi une famille alternative : Envol x NY141. Cette dernière avait le gène H1 de NY141 mais nous manquions le gène Ryadg contre le virus PVY. Cependant le gène Ryadg était en ségrégation dans la population HY1 nous permettant d'assembler les trois gènes de résistance dans des individus de la génération 3 pour les trois populations HY5, HY6 et HY7alt.

Déroulement génération 2

La deuxième génération a commencé au début de janvier 2016. Nous avons planté la deuxième génération dans la serre afin de voir si le problème de tubercules aériens sera moindre dans une serre que c'était dans la chambre de croissance. La photopériode naturelle couplée à celle artificielle (éclairage au sodium) totalisait 18 heures d'illumination. Les mini-tubercules des populations HY2 et HY3 ont été plantés dans des pots de 4 pouces.

Afin d'avoir du pollen en main pour la pollinisation des premières fleurs de la population HY1 le semage des graines de cette population était retardé de 2 à 3 semaines vis-à-vis la plantation des tubercules et graines des trois autres populations.

Les derniers fruits immatures de la population HY1 ont été récoltés quatre semaines après la pollinisation et ont muri pendant une semaine à la température pièce tel que décrit par Jansky et al., 2012. Ensuite, les graines extraites des baies ont été traitées avec du GA3 à 1500 ppm pendant 24 heures avant d'être semées dans des cubes de laine de roche « grodan » en hydroponie. Des graines de HY4alt de la banque de graines ont aussi été traitées avec du GA3 avant d'être semées. Des graines de tomate Stupice ont été semées à toutes les semaines afin de toujours avoir en main des plantes de la bonne grandeur pour le greffage.

Des bouts de tiges sortant des mini-tubercules des populations HY2 et HY3 ont été greffés sur des plantes de Stupice. Les plantes mères ont été gardées au cas où elles produiraient des fleurs.

Les cotylédons des plantules des populations HY1 et HY4alt ont été échantillonnés dès la sortie des premières feuilles et l'ADN a été extrait en utilisant nos protocoles standards. Ensuite la PCR avec des amorces ciblant les gènes RB, H1 et Ryadg nous a permis d'identifier les individus portant 1 ou 2 des gènes d'intérêt. Ces individus ont été greffés sur des plantes de Stupice dans des pots de 3 litres. Les autres plantules ont été jetées.

Rendue à la période de floraison, chaque inflorescence de fleurs femelles (HY1) a été divisée en 2 grappes de 4 fleurs. Afin de maintenir autant de diversité génétique possible dans nos populations, chaque fleur d'une grappe (si possible) a été pollinisée par le pollen d'un mâle différent (mais toujours du même groupe). Pour optimiser aussi la mise à fruit, les fleurs ont été pollinisées deux fois chaque – une fois par jour pendant deux jours consécutifs. Encore une fois, chaque fleur de la grappe a été pollinisée par le pollen d'un mâle différent, et si possible, du pollen d'un mâle différent que celui du premier jour. Les pollinisations ont continué jusqu'au temps où on pensait avoir assez de graines de chaque croisement pour poursuivre avec la prochaine génération. Nous estimions avoir besoin de 30 baies par croisement pour ce faire. Le nombre de pollinisations fait pour chaque croisement variait donc avec le taux de mise à fruit obtenu.

Les baies ont été récoltées quatre semaines après la pollinisation. Elles ont été laissées à température de la pièce pendant 1 semaine après quoi les graines (génération 3) ont été extraites, traitées avec du GA3 (1500 ppm) et semées comme décrit en haut pour les graines de la génération 2. Toujours afin de maintenir autant de diversité génétique que possible dans nos populations, le nombre de graines requis par population (500) a été divisé par le nombre de baies obtenu des croisements différents d'une même famille et ce nombre de graines a été récolté de chaque baie pour former la prochaine génération.

Résultats génération 2

Germination et PCR

Sur les 294 graines de HY1 semées seulement 75 (26%) ont germé. Un autre lot de 116 graines du même croisement a ensuite été semé dont 63 (54%) ont germé. La germination du croisement HY4alt était de 92%. Pour les deux autres populations : HY2 et HY3, des mini-tubercules provenant de l'année précédente ont été plantés et ont tous germé. Les résultats des analyses biomoléculaires sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Les résultats des analyses biomoléculaires des graines de la génération 2.

Population	Gène	Présence			χ^2	Probabilité	*
		Non	Oui	N			
HY1	RB	85	48	133	4.5	0.033	*
	Ryadg	27	24	51	0.09	0.765	NS
	H1	S/O	S/O	S/O			
HY2	RB	S/O	S/O	S/O			
	Ryadg	53	47	100	0.18	0.671	NS
	H1	27	29	56	0.04	0.850	NS
HY3	RB	S/O	S/O	S/O			
	Ryadg	68	44	112	2.6	0.107	NS
	H1	33	22	55	1.1	0.294	NS
HY4alt	RB	S/O	S/O	S/O			
	Ryadg	S/O	S/O	S/O			
	H1	78	99	177	1.2	0.264	NS

* Diffère significativement de la ségrégation 1:1, $\alpha=0.05$. NS : non significative S/O : sans objet

Des 133 graines germées de la population HY1 seulement 48 avait le gène RB. Il y avait donc une différence significative entre la proportion du gène RB dans la population et la proportion attendue étant donné une ségrégation indépendante de 50/50. Étant donné le taux de germination peu élevé de cette population, il est possible qu'un lien existe entre le taux de germination et le gène RB provenant d'une espèce sauvage. Pour les gènes Ryadg et H1 en ségrégation dans les autres populations aucune déviation significative du 50/50 n'a été observée.



Figure 12. La génération 2 en fleurs dans la serre, fin avril 2016.

Floraison, pollinisations et mise à fruit

Les premières fleurs des quatre populations apparaissaient 7 à 8 semaines après le greffage des plantes sur pieds de tomate et la période de pleine floraison est arrivée à 12 semaines (Fig. 12). La proportion de plantes qui a fait des fleurs varie de 78% pour la population HY1 à 35% pour la population HY3 (Tableau 4). Des quatre populations, les deux dont les greffons provenaient des tiges des mini-tubercules (HY2 et HY3) ont produit des tubercules aériens. La population HY4alt par contre, qui a Envol comme parent, n'a pas fait de tubercules aériens.

Aucune des plantes de la population HY1 qui ont fleuri n'ont produit du pollen. C'était donc impossible de faire les croisements réciproques prévus. Des trois autres populations, de 76 à 100% des plantes en fleurs ont produit du pollen. La mise à fruit variait entre 4 à 66% selon les populations impliquées dans les croisements. Pour la population HY3, il faut noter que seulement 4 plantes ayant les deux gènes requis (H1 et le Ryadg) ont fleuri. Le pourcentage de plantes ayant contribué à la génération 3 variait entre 6 % (HY3) et 78 % (HY1).

Tableau 4. Résultats des croisements entre des individus de la population HY1 et des individus des populations HY2, HY3 et HY4alt.

Population	N	Fleurs (%)*	Pollen (%)*	Mise à fruit (%)**	Géniteurs (%)*
HY1 (femelle)	36	28 (78)	0 (0)	77 (19)	28 (78)
HY2 (mâle)	57	37 (65)	28 (76)	29 (32)	12 (21)
HY3 (mâle)	52	18 (35)	17 (94)	10 (4)	3 (6)
HY4alt (mâle)	32	13 (41)	13 (100)	38 (66)	13 (41)

* Le nombre d'individus de la population

**Le nombre de baies produits et le pourcentage de mise à fruit.

Conclusions génération 2

En combinant la méthode de germination de graines prématurées de Jansky et al. (2012) et le greffage sur pied de tomate pour améliorer la floraison des plantules nous avons réussi à progresser du semage des graines de la génération 2 au semage des graines de la génération 3 en 18 semaines. Le décalage des plantations des populations HY2, HY3 et HY4alt vis-à-vis la population HY1 nous a permis d'obtenir des baies de tous les croisements prévus. Chaque population, même la population HY3 dont le pourcentage de plantes à fleurir était le moindre, a produit assez de fleurs et de baies pour la génération des 3 populations de plantes de la génération 3 ayant les 3 gènes de résistance recherchés.

Dans la génération 2 nos sélections sont faites à partir des résultats biomoléculaires précis. Cependant, d'autres forces sélectives non contrôlées se sont imposées sous la forme d'un taux de germination peu élevé pour la population HY1 et un taux de floraison peu élevé pour les populations HY2, HY3 et HY4alt. Ces forces sélectives ne sont pas nécessairement neutres. Il sera donc important de déterminer leurs effets et de les prévenir autant que possible.

Génération 3 : volet non-expérimental

L'objectif de la troisième génération était d'augmenter la proportion du bagage génétique des trois populations génération 4 qui proviendra des trois variétés performantes : Russet Burbank, GoldRush et Envol. Dans la génération 3 cette proportion est de $\frac{1}{4}$. En faisant des rétrocroisements entre les individus de la génération 3 et ces trois variétés nous augmenterons cette proportion à $\frac{5}{8}$.

Des trois variétés performantes seulement GoldRush produit du pollen.

Les croisements prévus étaient :

Russet Burbank x HY5

HY6 x GoldRush

Envol x HY7alt

Déroulement génération 3

Plus de 500 graines de chacune des populations HY5, HY6 et HY7alt ont été semées en juin 2016 utilisant les mêmes méthodes décrites en haut pour la génération 2. Les cotylédons des plantules ont été échantillonnés dès les premières feuilles sorties et l'ADN a été extrait en utilisant nos protocoles standards. Ensuite la PCR avec des amorces ciblant les gènes RB, H1 et Ryadg nous a permis d'identifier les individus portant les 3 gènes d'intérêt. Des boutures de ces individus ont été greffées sur des pieds de tomate de la variété Stupice dans des pots de 3 litres. Les restants des plantules ont été transplantés dans des pots de 3 litres afin qu'ils produisent des tubercules pour l'avenir. Les autres plantules, n'ayant pas les trois gènes requis, ont été jetées.

Ni Envol, ni GoldRush n'ayant produit des fleurs sur pieds de tomate, des tubercules de ces deux variétés ont été plantés dans des pots de 6 litres. Des boutures de Russet Burbank provenant de la banque *in vitro* ont été greffées sur pied de tomate comme décrit pour la génération 1.

Les plantes ont été maintenues dans une chambre de croissance. Nous avons augmenté le nombre d'heures de la photopériode de 18 à 20 heures par rapport à la génération 1 afin d'augmenter si possible le pourcentage de plantes des trois populations qui allaient fleurir.

Les fleurs des plantes de la population HY6 ont été pollinisées avec le pollen de la variété GoldRush comme prévu. Pour les deux autres populations dont c'était prévu d'utilisé le pollen nous étions obligés de modifier les protocoles car aucune des populations HY5, HY6 ou HY7alt n'ont produit du pollen. La population HY5 a été pollinisée avec un mélange de pollen de QP11005 (3/4 Russet Burbank). Malheureusement, la famille QP11005 qui était au champ en 2016 n'a pas produit assez de fleurs ou de pollen pour pouvoir polliniser toutes les fleurs produites par la population HY5. La population HY7alt a été pollinisée avec un mélange de pollen des familles QP11001, QP11002, QP11003 et QP11004 (3/4 Envol). Les individus génération 4 de ces deux populations auront donc $\frac{1}{2}$ de leur bagage génétique des variétés performantes au lieu de $\frac{5}{8}$.

Rendues à la période de floraison, deux fleurs de chaque grappe de fleurs ont été pollinisées. Afin de maintenir autant de diversité génétique possible dans la génération 4 il fallait faire des croisements sur tous les individus des populations HY5, HY6 et HY7alt qui ont fleuri. Pour optimiser la mise à fruit, les fleurs ont été pollinisées deux fois chaque – une fois par jour pendant deux jours consécutifs. Les pollinisations ont continué jusqu'à ce qu'il n'y avait plus d'individus en fleurs non-pollinisées.

Les baies de la population HY6 ont été récoltées quatre semaines après la pollinisation. Elles ont été laissées à température de la pièce pendant 1 semaine après quoi les graines (génération 4) ont été extraites, traitées avec du GA3 (1500 ppm) et semées comme décrit en haut pour les graines de la génération 2. Toujours afin de maintenir autant de diversité génétique que possible dans nos populations, le nombre de graines requis par population (500) a été divisé par le nombre de baies obtenu des croisements différents d'une même famille et ce nombre de graines a été récolté de chaque baie pour créer la prochaine génération (Fig. 13) Les baies des populations HY5 et HY7alt ont été récoltées après 6 semaines et les graines matures extraites sont sauvegardées pour le programme normal du CRLB puisque pour ces deux populations de la génération 4 (HY8 et HY10 alt) nous ne pensions pas avoir du pollen disponible pour la poursuite des rétrocroisements avant l'été 2017.



Figure 13. L'extraction d'une portion des graines immatures d'une baie.

Résultats génération 3

Germination et PCR

Le taux de germination était de 69, 62 et 71 % respectivement pour les populations HY5, HY6 et HY7alt. Les résultats des analyses biomoléculaires sont présentés dans le Tableau 5.

Tableau 5. Les résultats des analyses biomoléculaires des graines de la génération 3.

Population	Gène	Présence		N	χ^2	Probabilité	NS
		Non	Oui				
HY5	H1	262	220	482	1.8	0.176	NS
HY6	H1	141	142	283	0.002	0.966	NS
HY7alt	H1	282	331	613	1.96	0.162	NS
GEN3	H1	685	693	1378	0.02	0.879	NS
HY5	Ryadg	102	134	236	2.2	0.140	NS
HY6	Ryadg	82	86	168	0.48	0.827	NS
HY7alt	Ryadg	178	171	349	0.07	0.791	NS
GEN3	Ryadg	362	391	753	0.56	0.455	NS
HY5	RB	76	51	127	2.5	0.113	NS
HY6	RB	53	35	88	2.04	0.153	NS
HY7alt	RB	92	80	172	0.42	0.517	NS
GEN3	RB	221	166	387	3.9	0.048	*

* Diffère significativement de la ségrégation 1:1, $\alpha=0.05$. NS : non significative

Pour les deux gènes H1 et Ryadg, il n'y avait aucune déviation significative d'une ségrégation indépendante de 50/50 dans aucune des populations de la génération 3. Encore une fois, cependant, nous observions une légère mais significative déviation pour le gène RB dont seulement 43% des graines germées portaient le marqueur pour ce gène.

Greffage

Le taux de réussite du greffage pour les populations HY5, HY6 et HY7alt était respectivement de 50%, 79%, et 66%. Pour la plupart des greffons morts, la plante mère était toujours en vie. Nous avons fait des croisements sur les plantes greffées et aussi sur les plantes mères afin de maintenir la diversité génétique dans nos populations génération 4.

Floraison, pollinisations et mise à fruit

Les plantes de la génération 3 ont commencé à fleurir 8 semaines après le greffage et étaient en pleine floraison 11 semaines après le greffage. Respectivement 31%, 57% et 49% des plantes des populations HY5, HY6 et HY7alt ont fleuri (Tableau 6). Aucune des plantes des trois populations n'ont produit du pollen. Pour la population HY6 dont le partenaire était GoldRush ceci n'était pas un problème car GoldRush, même s'il ne produit pas beaucoup de fleurs produit beaucoup de pollen par fleur. Pour les populations HY5 et HY7alt les partenaires prévus étaient respectivement Russet Burbank et Envol qui ne produisent pas de pollen. Ces deux variétés ont été remplacées par des rétrocroisements les impliquant. La mise à fruit était très bonne variant entre 18 et 68%. Le nombre de géniteurs contribuant à la génération 4 variait de 7 pour la population HY5 (dont on a manqué du pollen) à 26 pour la population HY7alt. Respectivement 530, 2202 et 2073 graines des populations HY8, HY9 et HY10alt ont été produites pour la plantation en serre au printemps 2017 (500 graines de chaque population).

Tableau 6. Résultats des croisements entre des individus des populations HY5, HY6 et HY7alt et respectivement les variétés QP11005, GoldRush et QP11001 à QP11004.

Population	N	Fleurs (%)*	Pollen (%)*	Mise à fruit (%)**	Géniteurs (%)*
HY5	49	15 (31)	0 (0)	10 (18)	7 (14)
HY6	42	24 (57)	0 (0)	42 (68)	18 (43)
HY7alt	82	40 (49)	0 (0)	59 (37)	26 (32)

* Le nombre d'individus de la population

**Le nombre de baies produites et le pourcentage de mise à fruit

Conclusions génération 3

Les 500 graines prévues pour chaque population HY8, HY9 et HY10alt ont été produites. Dans chacune de ces populations, étant donné une ségrégation normale, 62 individus (1/8) auront les trois gènes recherchés H1, Ryadg et RB, 125 (1/4) auront deux des trois gènes recherchés, 250 (1/2) auront 1 des trois gènes recherchés et 62 (1/8) individus n'auront aucun des trois gènes recherchés. Pour la population HY9 ces trois gènes seront incorporés dans un bagage génétique à 5/8 GoldRush. Pour les deux autres populations cette proportion sera de ½ Russet Burbank et de ½ Envol à cause des modifications nécessaires dues au manque de pollen des hybrides HY5 et HY7alt.

Génération 4: volet non-expérimental

Le but de la génération 4 est d'augmenter encore la proportion du bagage génétique des trois populations qui vient des trois cultivars performants Russet Burbank, GoldRush et Envol toujours en maintenant les trois gènes de résistance incorporés. Avec un dernier rétrocroisement cette proportion atteindra 13/16 ou 81% pour la population HY12 et ¾ (75%) pour les populations HY11 et HY13alt.

Les croisements prévus étaient :

HY11: Russet Burbank x HY8

HY12: HY9 x GoldRush

HY13alt: Envol x HY10alt

Déroulement génération 4

Plus de 500 graines de la population HY9 ont été semées en novembre 2016 utilisant les mêmes méthodes décrites en haut pour la génération 2. Les graines des deux autres populations, HY8 et HY10alt ont été gardées pour plus tard en prévision d'avoir du pollen disponible pour les pollinisations futures (pour le cas où le pollen de ces populations s'avère encore stérile). Les cotylédons des plantules ont été échantillonnés dès les premières feuilles sorties et l'ADN a été extrait en utilisant nos protocoles standards. Ensuite la PCR avec des amores ciblant les gènes RB, H1 et Ryadg nous a permis d'identifier les individus portant les 3 gènes d'intérêt. Des boutures de ces individus ont été greffées sur des pieds de tomate de la variété Stupice dans des pots de 3 litres. Le reste des plantules étêtées ont été transplantées dans des pots de 4 pouces afin qu'ils produisent des tubercules pour l'avenir. Les autres plantules, n'ayant pas les trois gènes requis, ont été jetées.

Des tubercules de GoldRush ont été plantés en pots de 6 litres afin d'assurer la disponibilité du pollen avant la période de floraison des plantules de la population HY9.

Les plantes sont maintenues dans la serre avec une illumination supplémentaire pour obtenir une photopériode de 20 heures.

Rendues à la période de floraison, les fleurs des plantes de la population HY9 seront pollinisées avec le pollen de GoldRush jusqu'à l'obtention des baies pour chaque plante en fleurs.

Résultats génération 4

Germination et PCR

En moyenne 56 % des graines semées ont germé. Le taux de germination variait entre 32 et 82% selon la plante mère et des échantillons de graines d'une même plante mère. Les résultats des analyses biomoléculaires sont présentés dans le Tableau 7. Pour la population HY9 il y avait une déviation significative d'une ségrégation 50/50 pour le gène H1. Encore une fois, cette déviation pouvait être en lien avec un taux de germination des graines faible mais dans les générations et populations antérieures c'était le gène RB qui était sous représenté et non le gène H1. Dans la population HY9 la ségrégation des gènes RB et Ryadg ne dévie pas du 50/50.

Tableau 7. Les résultats des analyses biomoléculaires des graines de la génération 4, population HY9.

Population	Gène	Présence			χ^2	Probabilité	
		Non	Oui	N			
HY9	RB	45	36	81	0.5	0.48	NS
	Ryadg	42	56	98	1.0	0.32	NS
	H1	231	95	326	29.7	0.00001	***

*** Diffère significativement de la ségrégation 1:1, $\alpha=0.001$. NS : non significative

Discussion et conclusions

Le greffage des boutures de pomme de terre provenant de la culture *in vitro* sur des pieds de tomate nous permet d'obtenir des fleurs et des graines de plusieurs variétés incluant la variété récalcitrante Russet Burbank. Ceci nous libère des contraintes saisonnières imposées par la disponibilité de tubercules et la dormance des tubercules des parents dans un programme d'amélioration génétique. Le type de variété de tomate, mais surtout la variété spécifique utilisée comme porte-greffe sont importants. Dans notre cas, les greffons de pomme de terre sur la variété de tomate hâtive Stupice étaient les plus hâtifs et produisaient plus de fleurs et de graines que les greffons sur d'autres variétés de tomate. Pour les prochaines générations, nous poursuivrons avec le greffage des plantes de pomme de terre sur pied de tomate en utilisant seulement la variété Stupice comme porte-greffe.

La variété de pomme de terre aussi influençait les résultats obtenus. Deux des quatre variétés, soit Envol et GoldRush, n'ont pas fleuri, ni sur ses propres racines, ni comme greffon sur les pieds de tomate. Il y avait aussi un manque de synchronisation entre les périodes de floraison des deux variétés RB BC3 #2 et Russet Burbank. Ce manque de synchronisation aurait pu devenir un problème dans les prochaines générations dans lesquelles des croisements entre la progéniture de RB BC3 #2 et la progéniture de Russet Burbank se font. Pour la génération 2 nous avons dévié légèrement des protocoles prévus afin d'éviter ce problème.

En combinant la méthode de germination de graines prématurées de Jansky et al. (2012) et le greffage sur pied de tomate pour améliorer la floraison des plantules nous avons réussi à progresser du semage des graines de la génération 2 au semage des graines de la génération 3 en 18 semaines. Le décalage des plantations des populations HY2, HY3 et HY4alt vis-à-vis la population HY1 nous a permis d'obtenir des baies de tous les croisements prévus. Chaque population, même la population HY3 dont le pourcentage de plantes à fleurir était le moindre, a

produit assez de fleurs et de baies pour la génération des 3 populations de plantes de la génération 3 ayant les 3 gènes de résistance recherchés.

Dans la génération 2 nos sélections sont faites à partir des résultats biomoléculaires précis. Cependant, d'autres forces sélectives non contrôlées se sont imposées sous la forme d'un taux de germination peu élevé pour la population HY1 et un taux de floraison peu élevé pour les populations HY2, HY3 et HY4alt. Ces forces sélectives ne sont pas nécessairement neutres. Il sera donc important de déterminer leurs effets et de les prévenir autant que possible.

Les 500 graines prévues pour chaque population HY8, HY9 et HY10alt ont été produites. Dans chacune de ces populations, étant donné une ségrégation normale, 62 individus (1/8) auront les trois gènes recherchés H1, Ryadg et RB, 125 (1/4) auront deux des trois gènes recherchés, 250 (1/2) auront 1 des trois gènes recherchés et 62 (1/8) individus n'auront aucun des trois gènes recherchés. Pour la population HY9 ces trois gènes seront incorporés dans un bagage génétique à 5/8 GoldRush. Pour les deux autres populations cette proportion sera de ½ Russet Burbank et de ½ Envol à cause des modifications nécessaires dues au manque de pollen des hybrides HY5 et HY7alt.

Les différences entre un système de sélection normal et le système de sélection accéléré sont résumés en tableau 8. En moins de 2 ans nous avons réussi à faire 4 générations de croisements consécutives en utilisant une récolte de graines F1 immatures jumelée au greffage des plantes de pomme de terre sur des pieds de tomate. La sélection basée seulement sur les résultats des analyses biomoléculaires nous permettait de progresser d'une génération à la prochaine sans l'implication d'une étape de tubérisation. La nouvelle méthode accélérée était presque 8 fois plus rapide que la méthode standard (Tableau 8).

Tableau 8. Différences entre deux systèmes d'amélioration génétique.

	Système	
	Normal	Accéléré
Matériel végétal	Tubercules	Tubercules/Boutures/Graines
Période de l'année	Printemps	Toute l'Année
Pots	6 litres	3 litres
Dormance Graines	Oui	Non
Sélections Biomoléculaires au Stade Plantule	Non	Oui
Sélections sur l'Apparence des Tubercules	Oui	Non
Temps Requis par Génération	156 semaines	20 semaines

Les graines produites à la fin de l'expérience rentreront dans le programme normal d'amélioration génétique du Centre de recherche Les Buissons dès le printemps 2017. Ces génotypes, issus des quatre cycles de croisements, combineront des gènes de résistance au mildiou, au virus Y et au nématode doré dans un fond génétique intéressant. Ils seront plantés au champ pour la première fois en 2018.

Bibliographie

- Carson, G.P., et H.W. Howard (1945). Note on the inheritance of the King Edward type of colour in potatoes. *Journal of Genetics* 46: 358-360.
- Colton, L.M., Groza, H.I., Wielgus, S.M. et J. Jiang (2006). Marker-assisted selection for the broad-spectrum potato late blight resistance conferred by gene RB derived from a wild potato species. *Crop Sci.* 46: 589-594.
- Ellenby, C. (1952). Resistance to the Potato Root Eelworm, *Heterodera rostochiensis* Wollenweber. *Nature* 170: 1016.
- Finkers-Tomczak, A., Bakker, E., de Boer, J., van der Vossen, E., Achenbach, U., Golas, T., Suryaningrat, S., Smant, G., Bakker, J. et A. Goverse (2010). Comparative sequence analysis of the potato cyst nematode resistance locus H1 reveals a major lack of co-linearity between three haplotypes in potato (*Solanum tuberosum* ssp.) *Theor. Appl. Genet.* 122: 595-608.
- Hämäläinen, J.H., Sorri, V.A., Watanabe, K.N., Gebhardt, C. et J.P.T. Valkonen (1998). Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyviruses in potato. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1036-1043.
- Helgeson, J.P., Pohlman, J.D., Austin, S., Haberlach, G.T., Wielgus, S.M., Ronis, D., Zambolim, L., Tooley, P., McGrath, J.M., James, R.V. et W.R. Stevenson (1998). Somatic hybrids between *Solanum bulbocastanum* and potato: a new source of resistance to late blight. *Theor. Appl. Genet.* 96: 738-742.
- Hirsch, C.N., Hirsch, C.D., Felcher, K., Coombs, J., Zarka, D., Van Deynze, A., De Jong, W., Veilleux, R.E., Jansky, S., Bethke, P., Douches, D.S. et C.R. Buell (2013). Retrospective view of North American potato (*Solanum tuberosum* L.) breeding in the 20th and 21st centuries. *Genes, Genomes, Genetics* 3: 1003-1013.
- Jansky, S., Hamernik, A. et X. Cai (2012). Rapid cycling with true potato seed. *Seed Sci. and Technology* 40: 43-50.
- Kasai, K., Morikawa, Y., Sorri, V.A., Valkonen, J.P., Gebhardt, C. et K.N. Watanabe (2000). Development of SCAR markers to the PVY resistance gene Ry_{adg} based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome* 43: 1-8.
- Mullin, R., et F.I. Lauer (1966). Breeding behavior of F1 and inbred potato clones. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* 89: 449-455.
- Naess, S.K., Bradeen, J.M., Wielgus, S.M., Haberlach, G.T., McGrath, J.M. et J.P. Helgeson (2000). Resistance to late blight in *Solanum bulbocastanum* is mapped to chromosome 8. *Theor. Appl. Genet.* 101: 697-704.
- Ortega, F., et C. Lopez-Vizcon (2012). Application of Molecular Marker-Assisted Selection (MAS) for Disease Resistance in a Practical Potato Breeding Programme. *Potato Research* 55 (1): 1-13.

Ottoman R.J., Hane, D.C., Brown, C.R., Yilma, S., James, S.R., Mosley, A.R., Crosslin, J.M. et M.I. Vales (2009). Validation and implementation of marker-assisted selection (MAS) for PVY resistance (Ry_{adg} gene) in a tetraploid potato breeding program. Am. J. Pot. Res. 86: 304-314.

Sanford, L.L. (1979). Effect of random mating on yield and specific gravity in two *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* populations. Am. Potato J. 56(12): 597-607.

SAS (1999). SAS/STAT User's Guide, Version 8, Cary, NC: SAS Institute Inc.

Schabow, J.E. et J.P. Palta (2013). Oedema/intumescence injury on the leaves of potato plants is mitigated by calcium nutrition. Dans: 97th annual meeting of the Potato Association of America program p 56.

Song, J., Bradeen, J.M., Naess, S.K., Raasch, J.A., Wielgus, S.M., Haberlach, G.T., Liu, J., Kuang, H., Austin-Phillips, S., Buell, C.R., Helgeson, J.P., et J. Jiang (2003) Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. PNAS 100 (16): 9128-9133.

Upadhyaya, M.D., Thakur, K.C., Juneja A. et M.S. Kadian (1984). True potato seed production: flowering quality and economics In: Innovative methods for propagating potatoes. CIP, Lima Peru, pp.117-147.

Weinheimer, W.H. et G.W. Woodbury (1966). Effects of grafting and Solanum understocks on flower formation and abscission of flowers and fruits in the Russet Burbank potato. Am. Potato J. 43: 453-457.

Whitworth J.L., Novy, R.G., Hall, D.G., Crosslin, J. M. et C.R. Brown (2009) Characterization of broad spectrum potato virus Y resistance in a *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*-derived population and select breeding clones using molecular markers, grafting, and field inoculations. Am. J. Pot.Res 86: 286-296.