

Document de Technologie Spécialisée 1

CULTURE DE TISSUS:
MICROPROPAGATION, CONSERVATION
ET EXPORTATION DU GERMOPLASME
DE LA POMME DE TERRE

1986

N. Espinoza, R. Estrada, P. Tovar, J. Bryan, J.H. Dodds

Centre International de la Pomme de Terre
B.P. 5969
Lima - Pérou

Tél. 366920
Télex 25672 PE
Cable CIPAPA-Lima

Les Documents de la Technologie Spécialisée

Dans les Documents de la Technologie Spécialisée du CIP, on décrit les technologies qui ont été développées et employées dans une investigation pour le CIP et les programmes nationaux collaborateurs. Ils ont été écrits de façon à promouvoir l'échange d'information entre les scientifiques, et sont très souvent actualisés afin d'assurer qu'il décrivent le stade le plus récent des technologies.

Traduit de l'Anglais par:
Laurent Kayitare, ISABU - Gisozi, B.P. 75, Bujumbura, Burundi

Espinoza, N., Estrada, R., Tovar, P., Bryan, J., Dodds, J.H. 1985. Culture de tissus: Micropropagation, conservation et exportation du germoplasme de la pomme de terre. Document de Technologie Spécialisée 1. Centre International de la Pomme de Terre, Lima, Pérou. 21 pp.

CULTURE DE TISSUS:
MICROPROPAGATION, CONSERVATION
ET EXPORTATION DU GERMOPLASME
DE LA POMME DE TERRE

- 1 Avantages des techniques de la culture des tissus
- 2 Isolement du méristème
- 3 Micropropagation
- 4 Conservation et stockage à long terme
- 5 Envoi in vitro
- 6 Milieux de culture
- 7 Bibliographie

Il est possible d'utiliser la technologie de la culture des tissus pour propager, conserver et exporter le germoplasme de la pomme de terre. La culture des tissus permet une propagation clonale rapide d'un grand nombre de plantules ainsi que la conservation du germoplasme de la pomme de terre en conditions contrôlées exigeant un espace et un temps réduits. Le fait que la plupart des cultures in vitro sont libres de maladies facilite grandement l'échange international de germoplasme.

Cette publication décrit les avantages, la méthodologie et le matériel des techniques de culture de tissus utilisées au Centre International de la Pomme de Terre (CIP) et analyse les techniques de l'isolement du méristème, de la micropropagation, du stockage à long terme et de l'exportation du germoplasme in vitro.

1 AVANTAGES DES TECHNIQUES DE LA CULTURE DE TISSUS

Le Centre International de la Pomme de Terre (CIP) conserve une collection de germoplasme de quelque 6000 clones de pomme de terre. Cette collection sert de source importante de diversité génétique pour la sélection dans les programmes d'amélioration de la pomme de terre. La conservation de cette collection en champ est coûteuse et sujette à plusieurs risques tels que les maladies ou les conditions climatiques défavorables. La conservation in vitro offre des avantages certains, à savoir:

- réduction des frais de main-d'oeuvre,
- élimination des risques d'infection en champ,
- élimination des changements brusques de climat tels que la grêle ou le gel,
- meilleure disponibilité du matériel pour la micropropagation,
- meilleure disponibilité du matériel pour l'épuration,
- disponibilité permanente du matériel pour la propagation et l'exportation.

Le transfert de la collection de germoplasme in vitro (culture de tissus) est certes en progrès mais prendra encore plusieurs années avant d'être complète.

Dans ce document nous suivrons le cheminement d'un clone de pomme de terre à travers la culture du méristème, la micropropagation, le stockage et l'exportation éventuelle comme le montre la Figure 1.

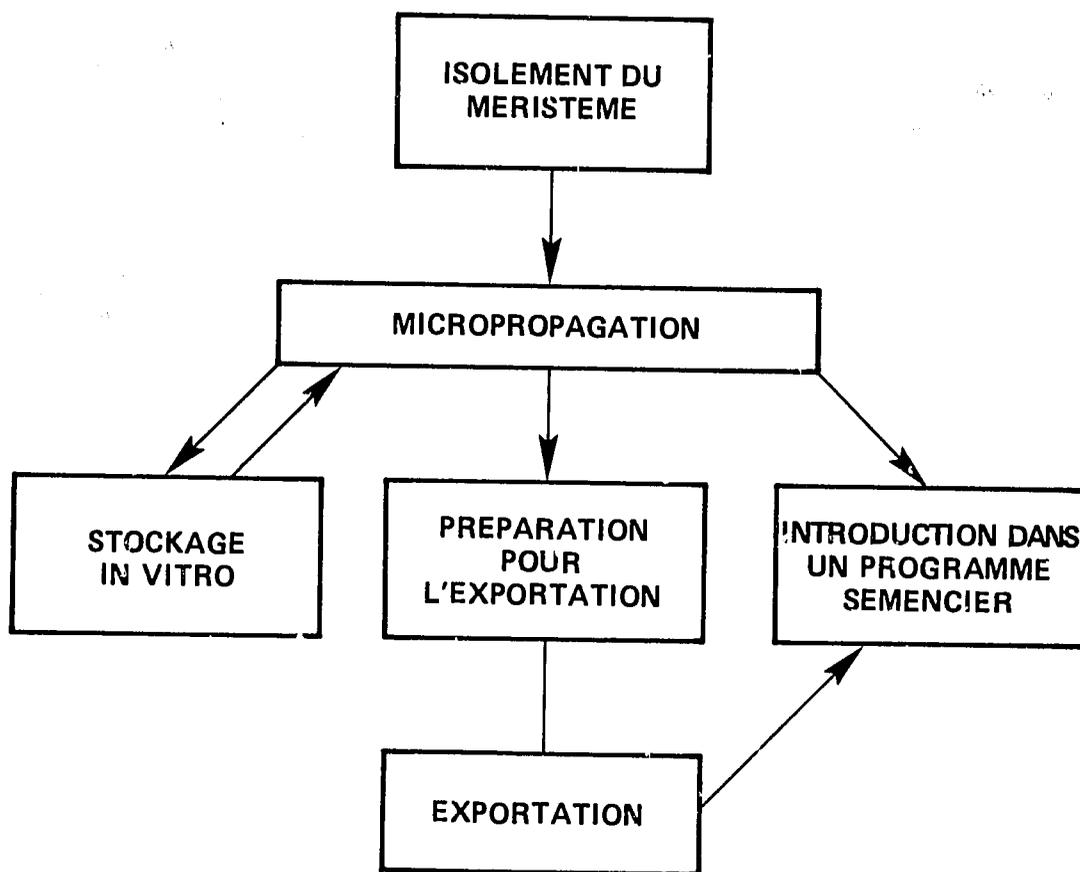


Fig. 1. Cheminement d'un clone de pomme de terre à travers la culture du méristème, la micropropagation, le stockage et l'exportation éventuelle.

2 ISOLEMENT DU MERISTEME

Le point de croissance active de la tige est le méristème. C'est un petit organe composé de cellules (mérismatiques) à division rapide. Il constitue pour la propagation des cultures de plantules de pomme de terre le matériel idéal de départ étant donné ses deux caractéristiques favorables suivantes:

- Dans le milieu de culture, le méristème isolé se développe d'une manière génétiquement stable, ce qui n'est pas le cas par exemple des cultures de callus qui montrent de grandes irrégularités génétiques.
- L'isolement du méristème réduit le niveau d'infection virale et peut être utilisé dans des conditions appropriées pour l'éradication complète des pathogènes.

Le bout du méristème apical contient les véritables cellules mérismatiques et est entouré par le primordium foliaire et les feuilles primaires. Puisque la différenciation des tissus vasculaires se fait à partir du méristème (vers les tissus plus âgés de la tige), les éléments vasculaires du primordium foliaire ne sont pas encore entrés en contact avec les tissus principaux du système vasculaire de la tige. C'est pourquoi les particules virales pouvant être présentes dans le système vasculaire ne peuvent atteindre la région mérismatique que par des mouvements de cellule à cellule. C'est une des principales raisons pour lesquelles la concentration en virus dans une plante diminue de manière acropétale vers les méristèmes apicaux comme vers les bourgeons axillaires. Cette situation est en principe identique pour toutes les cultures, la seule différence réside dans la forme du méristème et des deux primordiums foliaires.

Le fait que d'autres facteurs comme la production de substances inhibitrices des virus par les cellules méristématiques ou l'effet des hormones dans les milieux de culture puissent jouer un rôle dans l'élimination des virus par la culture des méristèmes n'a pas été prouvé.

L'isolement en conditions aseptiques de la partie apicale, appelée extrémité méristématique, et sa culture en milieu aseptique adéquat conduisent au développement d'une plantule. Ce développement suit en principe la même voie que celle de la plante entière: les cellules méristématiques se divisent et la différenciation des tissus continue. Le milieu de culture artificiel remplace la plante dans la nutrition de la partie sectionnée. Cette technique, appelée culture des méristèmes, a été appliquée pour la première fois il y a trente ans par Morel et Martin sur le dahlia (1952) et peut mener à obtenir des plantes exemptes de pathogènes.

La dissection aseptique du méristème est un processus délicat et exige plusieurs heures de pratique. La séquence de dissection est montrée sur les photographies de la figure 2 et s'effectue de la manière suivante: on coupe la tige en plusieurs segments, chacun d'eux devant avoir un noeud et un bourgeon axillaire. On enlève les feuilles avec précaution. On désinfecte les différentes parties à l'alcool à 70° pendant 30 secondes, puis on les met dans une solution d'hypochlorite de Ca à 2,5% pendant 15 minutes. On lave ensuite quatre fois à l'eau distillée stérilisée afin d'éliminer l'excès d'hypochlorite.

A l'aide d'un binoculaire, on enlève les petites feuilles entourant le point de croissance et on laisse seulement le dôme apical et le primordium foliaire. On cultive le dôme et deux feuilles primordiales dans le milieu de culture A (section 6). On change le milieu chaque semaine. Après six à huit semaines on met les plantules dans des tubes plus grands où elles continuent leur croissance. La micropropagation peut commencer quand les plants ont atteint 4 cm de haut.

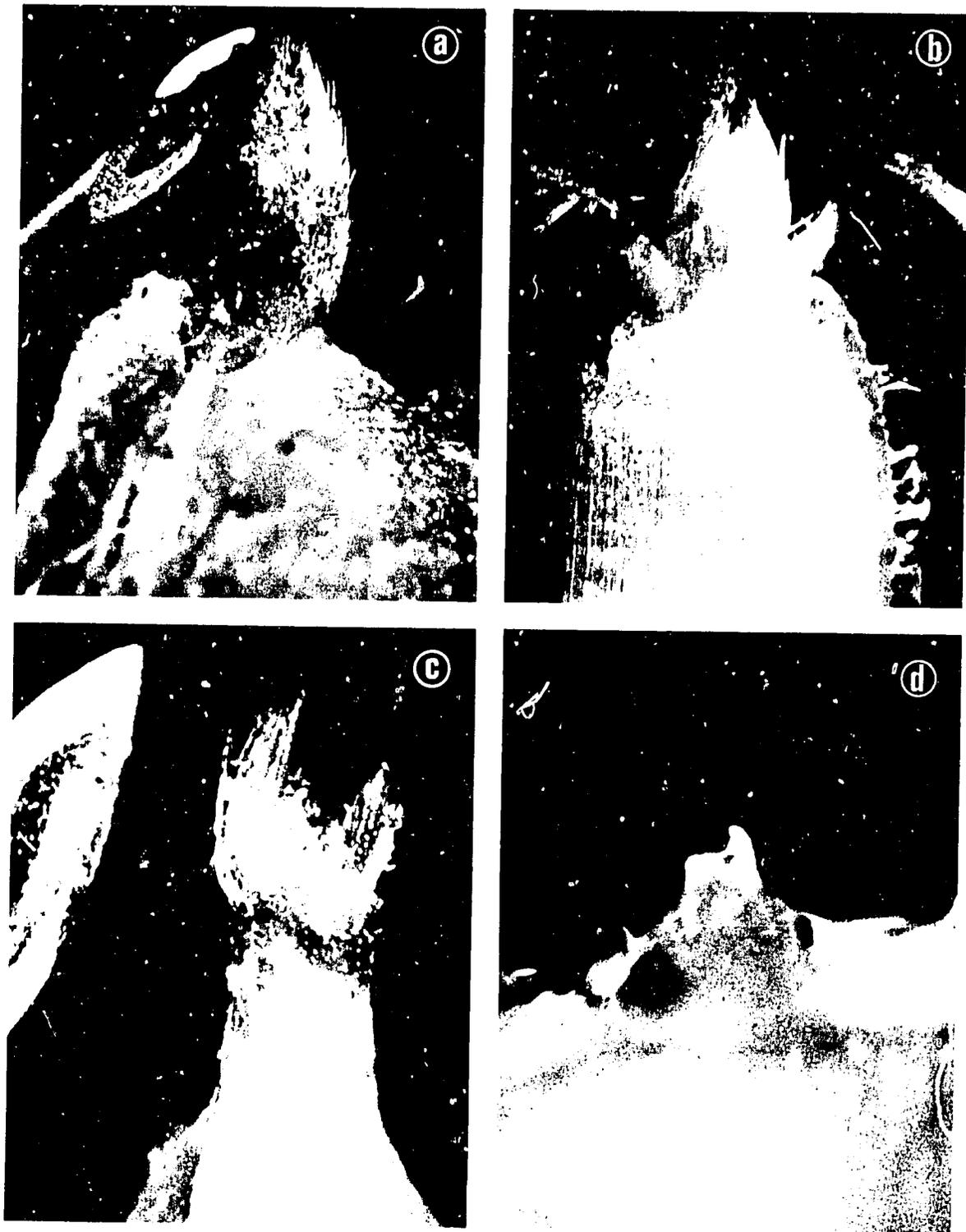


Fig. 2. Séquence photographique de la dissection du méristème:
a - Surface isolée et stérilisée du bourgeon.
b,c- Différentes étapes de la dissection où les feuilles primaires sont enlevées.
d - Méristème complètement disséqué avec deux feuilles primordiales.

3 MICROPROPAGATION

Le but de la micropropagation est d'obtenir de façon rapide un grand nombre de plants clonaux. Au CIP, la micropropagation de la pomme de terre est effectuée de deux façons différentes:

- noeuds pour les milieux d'agar et
- noeuds pour les milieux liquides.

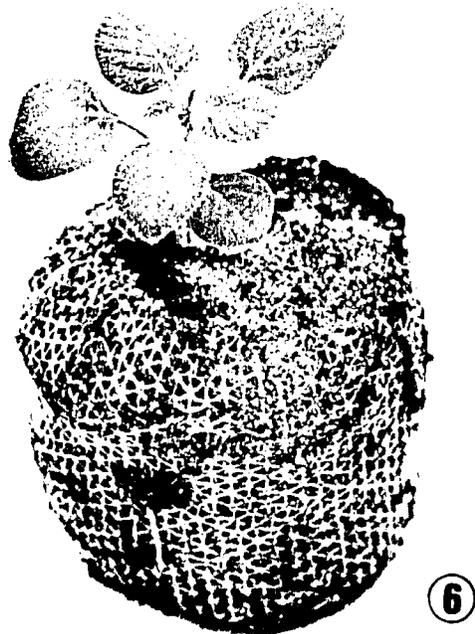
Dans les deux cas on utilise une illumination indirecte pendant 16 heures.

Noeuds pour les milieux d'agar. Des noeuds simples avec des feuilles sont coupés de petites plantules in vitro. Les grandes feuilles sont enlevées avec précaution. Le noeud est alors cultivé dans le milieu B d'agar solidifié. Le bourgeon axillaire va croître rapidement (Figure 3) et en trois ou quatre semaines, six ou sept nouveaux noeuds seront prêts à être transférés.

Noeuds pour les milieux liquides. Les plantules in vitro sont coupées en morceaux comprenant trois ou quatre noeuds et les grandes feuilles sont éliminées. Les segments nodaux sont placés dans 15 cm³ du milieu de culture F et le récipient est soumis à des vibrations (80 trs/min). Après deux à trois semaines une croissance très rapide commence (Figure 4) et chaque flacon pourra contenir de 60 à 70 noeuds.

Quand un nombre suffisant de plantules a été produit, il faut leur faire prendre racine et les transférer dans un milieu non stérile.

Enracinement et transfert dans un milieu non stérile. On enlève les grandes feuilles des noeuds de plantules in vitro et ces noeuds sont cultivés dans un milieu B d'agar où ils croissent et font des racines. Quand les plantules ont atteint trois à cinq cm de haut et ont développé un bon système racinaire, elles sont prêtes à être repiquées (Figure 5) dans des pots ou sur des plate-bandes composées d'un mélange adéquat de compost (Figure 6). Il faut veiller à ne pas endommager les racines et s'assurer qu'il y a un bon contact entre les racines et le milieu de culture. Il faut également maintenir une humidité relative élevée pendant les premiers jours.



- Fig. 3. Croissance des boutures à un noeud en tubes d'essai.
- Fig. 4. Culture par vibration pour la propagation rapide. Le flacon montre des plantules prêtes à être utilisées pour des sous-cultures.
- Fig. 5. Boîte stérile contenant 25 plantules enracinées, prêtes pour le repiquage dans des conditions non stériles.
- Fig. 6. Plantules provenant de matériel in vitro, quelques jours après le repiquage.

4 CONSERVATION ET STOCKAGE A LONG TERME

Le matériel in vitro peut être gardé indéfiniment en culture si des soins suffisants sont apportés pour éviter la contamination et si les changements de milieux de culture sont effectués à intervalles appropriés. Un stock testé libre de pathogènes peut être gardé comme réserve pour une utilisation ultérieure si nécessaire.

Pour une conservation à court terme, les plants poussent dans des tubes dans le milieu B. Les tubes sont fermés par des bouchons en plastique stérilisés. Les bouchons en coton laissent facilement pénétrer les champignons et ne sont donc pas recommandés pour un stockage à moyen ou à long terme, alors qu'ils sont tout à fait indiqués pour une conservation à court terme.

La croissance dépend de la température d'incubation, de la composition du milieu de culture et de la variété de la plante. Il s'ensuit que pour un stockage à long terme, des modifications du milieu de culture et de la température d'incubation sont nécessaires.

Les deux milieux C et D exercent une pression osmotique et peuvent être utilisés pour un stockage à 25°C. La pression réduit la croissance et entraîne des entrenoeuds courts. Plusieurs noeuds sont ainsi disponibles lorsqu'il s'agit de propager le matériel stocké. Avec un stockage de ce genre, le matériel ne requiert qu'un seul transfert par an. Avec le milieu de culture C, la température peut être abaissée à 8°C. Le taux de croissance des plantules est alors considérablement réduit et ce procédé ne requiert un transfert du matériel que tous les deux ou trois ans.

Il est par conséquent possible de conserver la collection du germoplasme dans les conditions de stockage mentionnées ci-dessus. Lorsqu'il y a une demande d'exportation d'un génotype particulier, il peut être retiré du stock afin d'effectuer la micropropagation.

5 EXPORTATION IN VITRO

Le matériel de la collection testée libre de maladies peut être exporté vers d'autres pays sous forme de plantules in vitro. Des boutures à un noeud peuvent être obtenues à partir du matériel micropropagé et transférées dans des tubes contenant le milieu de culture E. Lorsque les plantules in vitro atteignent deux cm de haut et ont développé un bon système racinaire, les tubes sont soigneusement emballés (Figure 7) pour être expédiés par voie aérienne. Le destinataire est prévenu de l'heure d'arrivée et du numéro de vol par télex ou par télégramme afin qu'il puisse retirer rapidement le colis de la douane. A chaque colis sont jointes des instructions sur le maniement du matériel après réception ainsi qu'un certificat phytosanitaire et une carte à retourner au CIP avec des indications sur l'état d'arrivage du matériel.

Les plantules in vitro ainsi reçues peuvent être transplantées sur du compost en pot ou micropropagées.

Actuellement tous les envois in vitro se font sous la forme de plantules de deux cm de haut, mais des recherches sont en cours afin de compléter ou remplacer cette méthode par un envoi de tubercules in vitro (Figure 8). Ceux-ci sont très petits, aseptiques, libres de maladies et peuvent être mis en culture. Ils sont plus facilement manipulables par le destinataire et plus faciles à transporter que dans le cas des tubes d'essai.

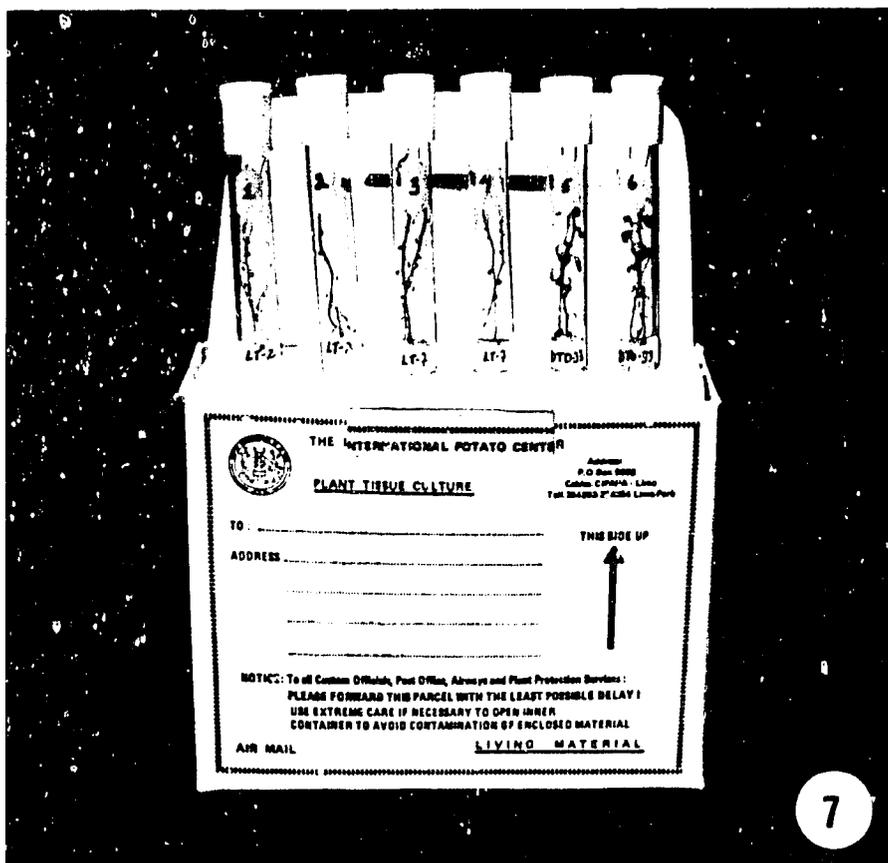


Fig. 7. Colis de plantules in vitro pour l'exportation.

Fig. 8. Echantillon de tubercules in vitro après le stockage montrant les germes en croissance. La boîte de Pétri mesure 9 cm et donne une idée de la dimension moyenne des tubercules.

6 MILIEUX DE CULTURE

Tous les milieux de culture utilisés pour ce travail sont basés sur les sels de Murashige et Skoog (1962). Les solutions concentrées sont normalement préparées en quatre parties différentes:

- Sels
- $MgSO_4$
- Fer
- Vitamines

Les sels chacun d'eux se prépare dans un verre de 200 cm³ d'eau distillée.

- NH_4NO_3	35	g
- KNO_3	40	g
- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	9	g
- KH_2PO_4	3.5	g
- H_3BO_3	0.1	g
- $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.5	g
($MnSO_4 \cdot H_2O$)	0.4	g)
- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	g
($ZnSO_4 \cdot H_2O$)	0.1	g)
- KI	0.02	g
- $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.005	g

Dissoudre 5 mg (0.005 g) des sels suivants dans 10 ml d'eau; ajouter 1 ml de cette solution à 200 ml d'eau la solution concentrée.



Mélanger les dix solutions de sels individuelles afin d'obtenir 2000 ml de solution concentrée.

MgSO₄ (solution concentrée)

- MgSO₄.7H₂O 3,7 g dans 100 ml d'eau distillée

Fer (solution concentrée)

- Na₂ EDTA 0,75 g
- FeSO₄.7H₂O 0,55 g

Dissoudre FeSO₄.7H₂O dans 20 ml d'eau distillée; Na₂ EDTA dans 20 ml d'eau distillée tout en chauffant. Mélanger FeSO₄.7H₂O et Na₂ EDTA, laisser refroidir et ajouter de l'eau jusqu'à obtenir 100 ml.

Vitam es (solution concentrée)

- Thiamine HCL 40 mg dans 100 ml d'eau distillée

Préparation des milieux de culture. Un litre du milieu de base MS (Murashige et Skoog) est préparé en mélangeant les solutions concentrées ci-dessus dans les proportions suivantes:

Sels	100 ml
MgSO ₄	10 ml
Fer	5 ml
Vitamines	1 ml
Inositol	100 mg

Les hormones correspondantes et la saccharose (voir plus loin) y sont ajoutées, et les milieux, avec ou sans agar, sont stérilisés dans un autoclave pendant 15 minutes.

Les éléments ajoutés au milieu de base MS pour la préparation de milieux spécifiques sont les suivants:

Milieu	Milieu MS + les éléments suivants		
A	0,25	ppm	Acide gibbérellique
	2,00	ppm	Acide pantothénique Ca
	3,0	%	Saccharose
	0,6	%	Agar
B	0,25	ppm	Acide gibbérellique
	2,00	ppm	Acide pantothénique Ca
	3,0	%	Saccharose
	0,8	%	Agar
C	4,0	%	Mannitol
	3,0	%	Saccharose
	0,8	%	Agar
D	4,0	%	Mannitol
	0,5	%	Saccharose
	0,8	%	Agar
E	0,25	ppm	Acide gibbérellique
	2,00	ppm	Acide pantothénique Ca
	3,0	%	Saccharose
	1,0	%	Agar
F	0,40	ppm	Acide gibbérellique
	0,50	ppm	Benzylamino purine
	0,01	ppm	Naphtalène acide acétique
	2,00	ppm	Acide pantothénique Ca
	2,0	%	Saccharose

7 BIBLIOGRAPHIE

- Conger, B.V. 1981. Cloning agricultural plants via in vitro techniques. CRC Press, Boca Ratón, USA.
- Henshaw, G. 1975. Technical aspect of tissue culture storage for genetic conservation. In: Frankel, O.H., Hawkes, J.G. (eds.). Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 349-358.
- Hu, C.Y., Wang, P.J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. In Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., Yamada, Y. (eds.). Handbook of plant cell culture I. MacMillan, New York. pp. 177-227.
- Hussey, G. 1983. In vitro propagation of horticultural and agricultural crops. In: Smith, H. (ed.). Plant Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 111-138.
- Morel, G. 1975. Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. In: Frankel, O.H., Hawkes, J.G. (eds.). Crops Genetic Resources for Today and Tomorrow. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 327-332.
- Morel, G., Martin, G. 1952. Guérison de dahlias atteintes d'une maladie à virus. Comp Rend 235: 1324-1325.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Reviews Plant Physiology 25: 135-166.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays of tobacco tissue cultures. Physiological Plantarum 15: 473-497.
- Roca, W.M., Bryan, J.E., Roca, M.R. 1979. Tissue culture for the international transfer of potato genetic resources. Amer. Potato J. 56: 1-11.
- Roca, W.M., Espinoza, N.O., Roca, M.R., Bryan, J.F. 1978. A tissue culture method for rapid propagation of potatoes. Amer. Potato J. 59: 691-701.
- Schilde-Rentschler, L., Espinoza, N.O., Estrada, R., Lizárraga, R. 1982. In vitro storage and distribution of potato germplasm. Proc. 5th International Plant Tissue Culture Congress, Tokio pp. 781-782.
-

Wilkins, C.P., Dodds, J.H. 1982. The application of tissue culture techniques to plant genetic conservation. *Science Progress* 68: 281-307.

Withers, L.A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. Technical Report. IBPGR, Rome. 22 pp.

Impression par le Departement de Capacitation et Communication, CIP
Mai 1986 Tirage: 300
