

Université de Neuchâtel

Institut de Botanique

Laboratoire de Phanérogamie

**METHODES ET APPLICATIONS  
DE LA CULTURE *IN VITRO*  
AUX BESOINS AGRONOMIQUES**

Travail de thèse effectué à la Station fédérale de recherches en production végétale de Changins (Nyon) et présenté à la faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel pour l'obtention du grade de docteur ès sciences.

*Forme réduite*

**Công - Linh Lê**

1999

# IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Méthodes et applications de la culture *in vitro* aux  
besoins agronomiques

de M. Công-Linh Lê

---

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de  
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

MM. P. Küpfer (directeur de thèse), R. Tabbachi,  
G. Collet (Changins, Nyon) et K.H. Erismann (Berne)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 4 janvier 1999

Le doyen:



F. Stoeckli

## Liste des publications

- LÊ C. L., 1980 Microbouturage *in vitro* de l'*Aeschynanthus hildebrandii* Hemsl. *Rev. suisse Vitic, Arboric, Horti* 12 (5), 245-248.
- REUST W. et LÊ C. L., 1985. La multiplication rapide des pommes de terre par le microbouturage. *Rev. suisse Agric.* 17 (1), 11-18.
- LÊ C. L., 1985. Influence of temperature on *in vitro* root initiation and development of apple rootstock M26, *HortScience* 20 (3), 451-452.
- LÊ C. L., 1985. Multiplication clonale *in vitro* du pommier (*Malus domestica* Borkh., var. Gravenstein). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Horti* 17 (5), 311-315.
- LÊ C. L. et COLLET G. F., 1985. Assainissement de la variété de pomme de terre Sangema. Méthode combinant la thérapie *in vitro* et la culture de méristèmes. Premiers résultats. *Rev. suisse Agric.* 17 (4), 221-225.
- LÊ C. L., 1986. Régénération de la variété de pomme de terre Hermes par thérapie et culture de méristèmes. *Rev. suisse Agric.* 18 (6), 313-315.
- LÊ C. L., 1987. Multiplication *in vitro* de l'hysope (*Hyssopus officinalis* L.). *Rev. suisse Vitic. Arboric., Horti* 19 (6), 363-367.
- COLLET G. F. and LÊ C. L., 1987. Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. I. Etablissement et multiplication *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, M26, M27, MM106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. (A). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Horti* 19 (4), 253-259.
- COLLET G. F. and LÊ C. L., 1988. Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. II. Enracinement *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, 26, 27, MM106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. (A). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Horti* 20 (2), 131-138.
- LÊ C. L. et COLLET G. F., 1988. Conservation *in vitro* de l'assortiment suisse des variétés de Pomme de terre. *Rev. suisse Agric.* 20 (5), 277-281.
- LÊ C. L., 1988. Rapid clonal multiplication of *Uncaria gambir* through tissue culture. *Recherche agronom. en Suisse* 28 (3/4), 215-217.
- LÊ C. L., 1989. Microbouturage *in vitro* du thym (*Thymus vulgaris* L.). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Horti* 21 (6), 355-358.
- LÊ C. L., 1991. Aspects pratiques de la micropropagation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Rev. suisse Agric.* 23 (6), 357-358.
- LÊ C. L., PELET F. et PERKO J., 1989. Assainissement de l'échalote (*Allium ascalonicum* L.) 1. Semis et multiplication *in vitro*. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Horti* 21 (3), 163-167.

LÊ C. L., PELET F. et PERKO J., 1991. Assainissement de l'échalote (*Allium ascalonicum* L.). II Thermo-thérapie et culture de méristèmes. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* **23** (5), 329-332.

LÊ C. L. and COLLET G. F., 1991. Micropropagation de porte-greffe de pommier. III. Acclimatation de *Malus pumila* Mill. (M26, Mac9) et de *Malus domestica* Borkh. Cv. Golden delicious. *Rev. suisse Vitic. Arboric., Hortic* **23** (3), 201-204.

LÊ C. L. et COLLET G. F., 1991. The *in vitro* Culture of *Artemisia annua* L. *Recherche agronom. en Suisse* **31** (3), 111-116.

LÊ C. L., 1992. Micropropagation of *Nematanthus*. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. High-Tech and Micropropagation IV vol. **20** Ed. Y.P.S. Bajaj, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 213-222.

LÊ C. L., 1992. Multiplication *in vitro* du Châtaignier (*Castanea sativa* Mill.). 1. Etablissement et Multiplication *in vitro*. *Recherche agronom. en Suisse* **31** (2/3), 129-142.

LÊ C. L., 1993. Tubérisation *in vitro* de la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L. var. Bintje). *Rev. suisse Agric.* **25** (6), 365-367.

LÊ C. L., 1994. Multiplication clonale du Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* [Griseb.] Schinners). *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **26** (2), 133-136.

LÊ C. L., 1994. Apport de l'électrophorèse dans l'identification des variétés de pomme de terre cultivées en Suisse. *Rev. suisse Vitic. Arboric. Hortic.* **26** (6), 373-379.

COLLET G. F., NOWBUTH L. and LÊ C. L., 1994. Comparison of the easy-to-root Jork9 and Cepiland and the difficult-to-root EMLA9 and Lancep *Malus* M9 rootstocks *in vitro*. *Adv. Hort. Sci.*, **8**, 45-48.

LÊ C. L., 1996. Effet du thiosulfate d'argent sur la croissance de la pomme de terre cultivée *in vitro*. *Rev. suisse Agric.* **28** (1), 43-45.

LÊ C. L., NOWBUTH L., HEDIGER S and G. F. COLLET, 1997. Régénération *in vitro* de la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L.). *Revue suisse Agric.* **29** (3), 143-150.

LÊ CL, 1998. Culture *in vitro* du genépi blanc (*Artemisia umbelliformis* Lam.). *Revue suisse Vitic, Arboric., Hortic.*, vol **30** (3), 153-156.

LÊ C. L., 1998. *In vitro* clonal multiplication of *Arnica montana* L. In: Proc. Plant Biotechnology as a tool for the exploitation of mountain lands, Ed.S. Scannerini *et al.*, *Acta Hortic.*, **457**, 195-203.

LÊ C. L. and PAGE D., 1998. *In vitro* mass tuberization as a means to produce virus-free seed potatoes in Switzerland. In : COST 822 - Physiology and Control of plant propagation *in vitro* - Proceedings of the workshop held at Humboldt University, Berlin 1996, Edit. G. Reuther, Publ. European Commission, Luxembourg, 85-89.

*Le texte complet de cette thèse est déposé à la bibliothèque de l'Institut de Botanique de l'Université de Neuchâtel.*

## Résumé

Une étude concernant l'application des nouvelles **biotechnologies végétales**, notamment la **multiplication végétative conforme** (ou **Micropropagation**), la **culture de méristèmes** et la **conservation de génotypes cultivés** a été réalisée dans le cadre d'une station de recherches en production végétale.

La **multiplication conforme** des plantes cultivées par **micropropagation** constitue un moyen sûr, parfois incontournable, en mettant à la disposition des expérimentateurs du matériel important comprenant un grand nombre d'**espèces horticoles, maraîchères, arboricoles fruitières, aromatiques et médicinales**, pour permettre la réalisation des travaux portant sur :

- Clonage
- Sélection
- Amélioration
- Domestication
- Tests de contrôle
- Fabrication d'antiséras

La **culture de méristèmes** associée à un traitement à la chaleur (thermothérapie) *in vitro* permet également :

- la guérison des maladies virales sur la **pomme de terre** et sur l'**échalote**;
- la création rapide de matériel de base nécessaire aux travaux de sélection
- la contribution à l'amélioration de l'environnement de culture en diminuant ainsi les sources d'épidémies au champ.

La **conservation *in vitro*** confère à l'ensemble du matériel de base (espèces et variétés) une protection efficace contre les risques d'infection provoqués par la présence permanente de microorganismes pathogènes que comporte la culture traditionnelle.

Ces biotechnologies végétales constituent aussi un moyen efficace et nécessaire permettant d'apporter une aide directe dans les projets d'aide aux pays en développement, qui sont coordonnés par l'Agence de Coopération au Développement Suisse (DDC), notamment au **Népal**, au **Burundi** et au **Rwanda**.

# Microbouturage in vitro de l'*Aeschynanthus hildebrandii* H. Emsl.

C. L. LÉ

Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

## Introduction

La régénération des différentes Gesnériacées par la culture in vitro a été décrite pour l'*Achimenes* (GRUNEWALDT, 1977), pour l'*Episcia* (JOHNSON, 1978; BILKEY et Mc COWN, 1979), pour le *Gloxinia* (MURASHIGE, 1974; BIGOT, 1974), pour le *Kohleria* (HUGHES, 1978), pour le *Saintpaulia* (START et CUMMING, 1976; COOKE, 1977; BILKEY et al., 1978), pour le *Sinningia* (HARAMAKI, 1971; GRUNEWALDT, 1977), pour le *Smithiantha* (MONCOUSIN, 1978) et pour le *Streptocarpus* (APPELGREN et HEIDE, 1972; RAMAN, 1977).

Dans ce travail, nous avons tenté d'induire la formation des bourgeons adventifs sur les fragments de feuilles d'*Aeschynanthus* cultivés sur différents milieux artificiels et d'obtenir des plantes entières à partir des microboutures issues de l'organogenèse directe.

## Matériel et méthodes

Des feuilles prélevées sur des tiges florales d'*Aeschynanthus* élevées en conditions de serre sont utilisées dans nos essais. Celles-ci, après avoir été préalablement nettoyées à l'eau courante, sont trempées rapidement dans l'éthanol à 70% et désinfectées en surface à l'hypochlorite de sodium à 3% pendant 15 minutes. Ensuite elles sont rincées plusieurs fois à l'eau stérile et découpées en trois ou quatre portions de 1 cm<sup>2</sup> environ de façon que chaque fragment excisé possède une partie de la nervure principale (Fig. 1). Les fragments de feuille ainsi préparés ont été placés sur un milieu de culture de MURASHIGE et SKOOG (1962), additionné d'une solution de vitamines renfermant 0.1 mg/l de thiamine, 0.5 mg/l de pyridoxine, 0.5 mg/l d'acide nicotinique et 100 mg/l de myo-inositol. A ce milieu de base est ajouté du saccharose à raison de 30 g/l. Les régulateurs de croissance sont apportés à des concentrations variables allant de 0 à 1 mg/l pour l'acide  $\alpha$ -naphthalène-acétique (ANA) et de 0 à 10 mg/l pour la N<sup>6</sup>-Benzyladénine (BA). Une fois le pH ajusté à 5.7 avec de l'acide chlorhydrique ou de la



Fig. 1 a. Découpage d'une feuille après la désinfection en surface. (Photo Lè)

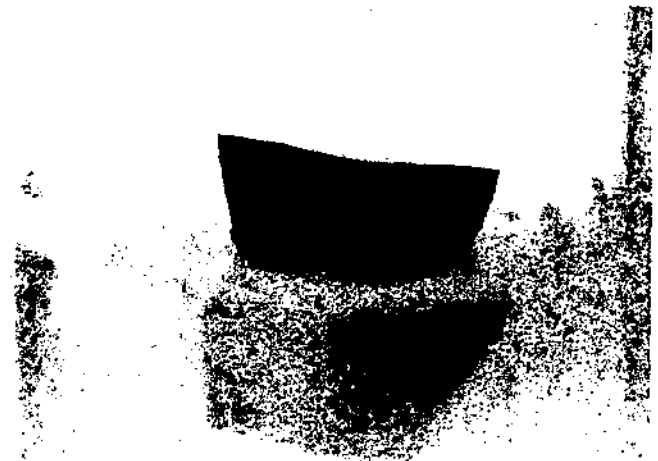


Fig. 1 b. Explantat fraîchement mis en place sur le milieu nutritif. (Photo Lè)



Fig. 2. Apparition des ébauches de bourgeon à la surface de l'explantat. (Photo Lé)

soûde, le milieu est solidifié par de la gélose à 0,8% (Difco Bacto Agar) et stérilisé à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C. Les cultures sont ensuite placées dans une enceinte climatisée à la température de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  de jour et de  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  de nuit, et éclairées pendant 16 heures à 5000 lux (tubes fluorescents Sylvania de type Cool White de 215 w). L'humidité relative a été maintenue à  $60 \pm 5\%$  pendant toute la durée de culture. L'enracinement des microboutures s'est effectué sur le milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) dilué de moitié avec 0,01 mg/l d'acide  $\alpha$ -naphthalène-acétique (ANA).

## Résultats

### Organogenèse

Toutes les parties de la feuille d'*Aeschynanthus* sont capables de se régénérer et donner naissance à des plantes entières en culture *in vitro*. L'initiation à la formation des organes sur les fragments excisés est stimulée par la présence des substances de croissance dans le milieu nutritif. Toutefois le devenir de l'organe est modulé par la quantité respective des auxines et cytokinines entrant dans la composition du milieu même (SKOOG et MILLER, 1957; SKOOG, 1971). Les premières réactions se sont manifestées dans la partie basale de l'explantat vers la fin de la deuxième semaine de culture; un cal léger, de couleur vert clair, apparu sur la ligne de coupe s'est développé assez rapidement pour former un tissu compact sur lequel vont émerger les primordias de bourgeons à la grandeur d'une tête d'épingle. Cependant les jeunes bourgeons adventifs ne sont visibles que vers la quatrième semaine sur l'ensemble de nos cultures (Fig. 2). Le développement total des jeunes pousses qui sont prêtes à être repiquées en milieu

d'enracinement a lieu à la fin de la huitième semaine de culture (Fig. 3). L'équilibre phytohormonal composé de 0,01 mg/l d'acide  $\alpha$ -naphthalène-acétique et de 0,1 mg/l de N6-Benzyladénine s'est montré le plus favorable à la production des bourgeons; de même que pour la combinaison de 0,01 mg/l d'acide  $\alpha$ -naphthalène-acétique et 1 mg/l de N6-Benzyladénine. Une augmentation à 10 mg/l de N6-Benzyladénine dans le milieu de culture n'induit que peu de formation de bourgeons, ceci se manifeste sur toutes les combinaisons avec de l'acide  $\alpha$ -naphthalène-acétique. Par contre, une prolifération de cal et de racines a été observée sur les milieux enrichis soit uniquement en acide  $\alpha$ -naphthalène-acétique, soit en association avec de faibles concentrations de N6-Benzyladénine. D'ailleurs, il convient de noter qu'une néoformation de bourgeons et de racines s'est produite sur le même explantat pour les combinaisons ayant un rapport auxines/cytokinines voisin ou égal à 1 (Fig. 4).

### Enracinement

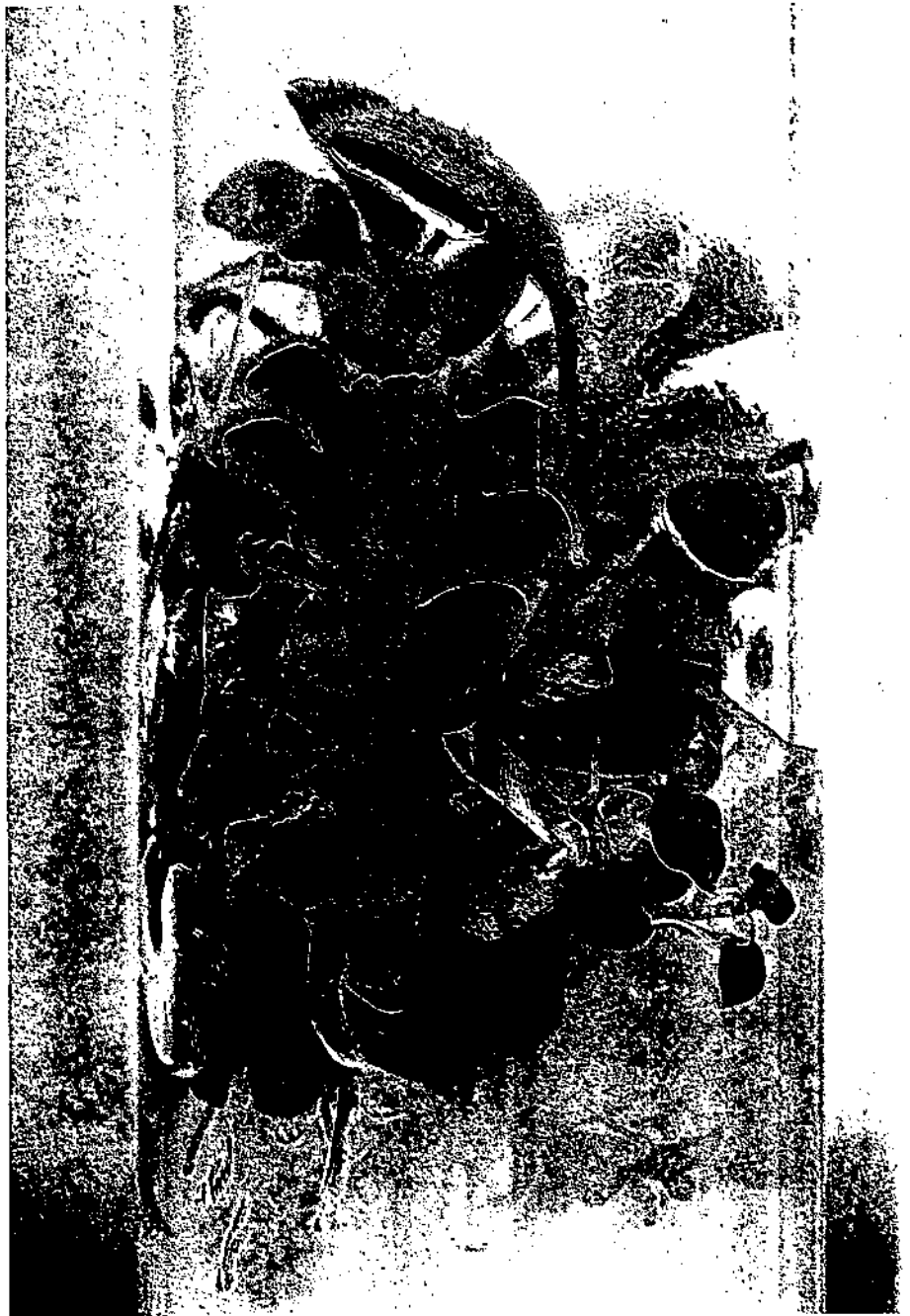
De jeunes pousses de taille de 0,5–1 cm obtenues lors de l'organogenèse sont soigneusement prélevées sur l'explantat et repiquées individuellement sur un milieu neuf (voir matériel et méthodes) pour favoriser le développement du système racinaire (Fig. 5). Les premières racines font leur apparition à la deuxième semaine de culture, mais il faut attendre jusqu'à la quatrième semaine pour que toutes les microboutures aient bien développé leur appareil racinaire (Fig. 6). Une réduction de l'intensité lumineuse et de la concentration en sucre pendant cette phase de préparation ne s'avère pas indispensable à l'initiation de la rhizogenèse comme l'ont remarqué START et CUMMING, 1976 et BILKEY et al., 1978 pour le *Saintpaulia*.

### Transfert en milieu naturel

Afin de permettre le transfert des jeunes plantules racinées en conditions naturelles avec un maximum de réussite, nous avons retiré les jeunes individus des récipients de culture, les avons rincés à l'eau tiède pour enlever toute trace d'agar restant sur les racines. Ensuite nous les avons repiqués sur un substrat composé de TKS 1 et de Perlite à raison de 10%, et les avons placés sous une atmosphère saturée d'humidité pendant 20 jours pour éviter une trop forte déshydratation qui pourrait compromettre leur croissance ultérieure. L'acclimatation s'est effectuée par la réduction progressive de l'humidité relative vers la fin de cette période. La température du local d'acclimatation est maintenue à  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  de jour et  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  de nuit avec un éclairage de 16 heures par jour à 2000 lux. Ainsi 95% des plantes acclimatées ont pu poursuivre leur croissance une fois transférées en conditions de culture de serre.

### Conclusion

La méthode microbouturage décrite dans ce travail a bien démontré l'obtention facile et rapide du matériel végétal d'*Aeschynanthus* par la technique de culture *in vitro* des fragments de feuille. Le grand pouvoir de régénération des explantats d'origine foliaire pourrait être intéressant dans une perspective de multiplication



*Fig. 3.* Développement des jeunes pousses après 8 semaines de culture dans un tube de terre de 25 mm de diamètre. (Photo Serra)



*Fig. 4.* Production de bourgeons et de racines sur le même explant. (Photo Lè)

1 cm



*Fig. 5.* Jeune microbouture à l'enracinement. (Photo Lè)



Fig. 6. Plante racinée après 12 semaines de culture. (Photo Lè)

accélérée de nouvelles variétés. Selon notre méthode une feuille d'*Aeschynanthus* donne en moyenne 50 plantules, par l'organogenèse directe, qui sont prêtes à être transférées en milieu naturel après 12 semaines de culture. Ainsi nous espérons mettre à la disposition des producteurs une nouvelle possibilité de multiplication qui pourrait leur permettre de réduire le temps et le coût de production en comparaison avec celle pratiquée actuellement en culture traditionnelle.

### Remerciements

Nos remerciements sont adressés à l'Office fédéral du personnel qui nous a permis de réaliser ce travail, au D<sup>r</sup> G. COLLET pour ses précieux conseils, à M. A. REIST pour ses nombreux renseignements, à M. C. STODMANN pour sa collaboration technique très appréciée.

### Résumé

La culture *in vitro* de fragments de feuille d'*Aeschynanthus* sur un milieu de base de MURASHIGE et SKOOG (1962), additionné de 0.1 mg/l de thiamine, 0.5 mg/l de pyridoxine, 0.5 mg/l d'acide nicotinique, 100 mg/l de myo-inositol, 0.01 mg/l d'acide  $\alpha$ -naphthalène-acétique, 0.1 mg/l de N6-Benzyladénine, 30 000 mg/l de saccharose et 0.8% d'agar a permis d'obtenir des bourgeons adventifs après 8 semaines de culture. Un nombre moyen de 15 à 20 jeunes pousses a été obtenu par fragment excisé. L'initiation à la rhizogenèse a été provoquée sur un milieu neuf dont la concentration en sels minéraux est réduite de moitié et ne contenant plus que 0.01 mg/l d'acide  $\alpha$ -naphthalène-acétique. L'acclimatation des jeunes plantes s'est effectuée, à la fin de la douzième semaine de culture, d'abord sous une atmosphère saturée d'humidité, ensuite en la réduisant progressivement. 95% des plantes ainsi préparées ont poursuivi leur croissance normalement en condi-

tions de culture sous verre. Cette méthode démontre l'avantage de la technique de culture *in vitro* pour la multiplication accélérée de nouveaux cultivars en comparaison avec celle effectuée par le bouturage classique.

### Zusammenfassung

*In vitro* Kultur von Blattstücken von auf einem Agarmedium nach MURASHIGE et SKOOG (1962) ergänzt mit 0.1 mg/l Thiamin, 0.5 mg/l Pyridoxin, 0.5 mg/l Nikotinsäure, 100 mg/l Myo-inositol, 0.01 mg/l Naphthalin-1-essigsäure, 0.1 mg/l N6-Benzyladenin, 30 000 mg/l saccharose und 0.8% Agar ermöglichte eine Adventivknospenbildung nach 8 Wochen. Jedes Blattstück ergab im Durchschnitt 15 bis 20 Stecklinge. Die Wurzelbildung wurde auf einem neuen Medium mit auf die Hälfte verringerter Mineralsalzkonzentration mit 0.01 mg/l Naphthalin-1-essigsäure hervorgerufen. Die Stecklinge wurden nach 12 Wochen zuerst in eine Feuchtigkeitsgesättigte Umgebung, die allmählich reduziert wurde, verpflanzt. 95% der Stecklinge haben sich im Gewächshaus normal weiterentwickelt. Diese Methode zeigt die Vorteilhaftigkeit der *in vitro* Kultur für eine beschleunigte Vermehrung neuer Sorten im Vergleich zur klassischen Vermehrung.

### Références

- APPELGREN, M. et O. M. HEIDE. 1972. Regeneration in *Streptocarpus* leaf disc and its regulation by temperature and growth substances. *Physiol. Plant.* 27, 417-423.
- BIGOT, C. 1974. Obtention de plantes entières à partir de pédoncules floraux de *Gloxinia hybrida* cultivés *in vitro*. *Z. Pflanzenphysiol.* 73, 178-183.
- BILKEY, P. C., B. H. MC COWN and A. C. HILDEBRANDT. 1978. Micropropagation of African Violet from petiole cross-sections. *HortScience* 13, 37-38.
- BILKEY, P. C. and B. H. MC COWN. 1979. *In vitro* Culture and Propagation of *Episcia* sp. (Flame Violet). *HortScience* 14, 109-114.
- COOKE, R. C. 1977. Tissue Culture Propagation of African Violets. *HortScience* 12, 549.
- GRUNEWALDT, J. 1977. Adventivknospenbildung und Pflanzenregeneration bei Gesneriaceae *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft* 42, 171-175.
- HARAMAKI, C. 1971. Tissue Culture of *Gloxinia*. *Internat. Plant. Prop. Soc. Proc.* 21, 442-448.
- JOHNSON, B. B. 1978. *In vitro* Propagation of *Episcia cupreata*. *HortScience* 13, 596.
- HUGHES, K. W. and B. BARNI. 1978. Regeneration of *Kohleria amabilis* (Gesneriaceae) from leaf and petiole explants. Symposium «Propagation of higher plants through tissue culture», April 16-19, Univ. of Tennessee, Knoxville.
- MONCOUSIN, C. 1978. Contribution à la mise au point d'un milieu de culture pour la multiplication *in vitro* de Gesnériacées. *Revue Horticole Suisse* 51, 295-301.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-479.
- MURASHIGE, T. 1974. Plant Propagation Through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166.
- RAMAN, K. 1977. Rapid multiplication of *Streptocarpus* and *Gloxinia* from *in vitro* cultured pedicel segments. *Z. Pflanzenphysiol.* 83, 411-418.
- SKOOG, F. and C. O. MILLER. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. Symposium Soc. Exp. Biol. 9, 118-131.
- SKOOG, F. 1971. Aspects of growth factor interactions in morphogenesis of tobacco tissue cultures. In «Les cultures de tissus de plantes» Colloques internes. CNRS, 193, 115-136.
- START, N. D. and B. G. CUMMINGS. 1976. *In vitro* Propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. *HortScience* 11, 204-206.

# La multiplication rapide des pommes de terre par le microbouturage

W. REUST et LE CONG-LINH<sup>1</sup>, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

## Introduction

La multiplication traditionnelle de la pomme de terre se caractérise par un taux de reproduction très faible, comparativement à toute autre espèce de plante cultivée. Une plante de pomme de terre produit annuellement 3 à 15 tubercules-plants. La micropropagation par boutures permet de réaliser un rapport de multiplication allant de un à plusieurs milliers. En France, les chercheurs de la Station d'Hanvec indiquent la production d'un million de boutures en sept mois à partir d'un seul germe (ANONYME, 1983).

La multiplication des espèces végétales par bouturage est pratiquée depuis l'ancien temps et largement répandue en horticulture. Pour la pomme de terre en revanche, le bouturage n'est appliqué sur une grande échelle que depuis une dizaine d'années environ. L'utilisation en routine de cette méthode a pris une extension considérable à partir de 1976. En effet, cette année-là, de graves problèmes de ravitaillement en plants ont surgi en Europe, à la suite d'une forte et brusque dégradation de la qualité sanitaire. Le bouturage a ainsi permis de multiplier très rapidement des variétés parfois menacées en raison de leur sensibilité aux maladies virales (ROSSION, 1977).

Dans notre pays, on ne pratique pas de création de variétés de pommes de terre et, par conséquent, il n'y a pas de sélection conservatrice. En revanche, une sélection sanitaire massive est effectuée pour toutes les variétés inscrites sur la liste officielle. Dans nos régions, les conditions de multiplication des plants sont, selon l'année, assez difficiles, en raison de l'apparition précoce des pucerons vecteurs de virus. Nous devons ainsi régulièrement renouveler notre matériel de base par des importations d'environ 1500 à 2000 tonnes de plants de multiplication par an. Il arrive parfois que l'approvisionnement en plants de base pose des difficultés pour des raisons sanitaires. C'est alors sur demande des organisations de producteurs de plants sélectionnés que nous pratiquons le bouturage, principalement pendant les saisons d'automne et d'hiver.

L'utilisation de boutures permet également de stocker du matériel géniteur dans un espace très limité. En Europe, une banque de gènes comprenant des variétés cultivées ainsi qu'un grand nombre d'espèces primitives est installée à Braunschweig (Allemagne)

dans la «Living Collection» (Mix, 1980 et 1981). Le matériel végétal peut être conservé *in vitro* pendant une durée indéterminée et à l'abri de toute contamination parasitaire. Un repiquage tous les six à vingt-quatre mois selon les variétés et les températures de végétation, semblerait suffisant pour assurer une bonne conservation (MADEC et FRANÇOIS, 1981).

Dans le travail ci-après, nous décrivons les méthodes de bouturage telles que nous les appliquons à Changins, ainsi que les résultats obtenus.

## Description des méthodes de bouturage utilisées

Le matériel végétal prévu pour une multiplication par clonage sera indemne de toutes maladies virales, bactériennes et fongiques afin d'éviter la transmission d'agents pathogènes. Le bouturage peut être pratiqué en éprouvette (*in vitro*) ou en terre. La multiplication d'une variété à partir d'un germe de pomme de terre exige un premier bouturage en principe effectué dans des conditions stériles *in vitro*. Cette technique peut aussi être appliquée pour assainir du matériel contaminé par les virus. Il s'agit de faire une ou plusieurs cultures successives à partir du méristème, combinée avec l'application d'inhibiteurs des virus et la thérapie (GRISON 1979, LE CONG-LINH, 1984).

### Bouture *in vitro*

Il s'agit d'abord de mettre en germination des tubercules exempts de maladies. Lorsque les germes atteignent quelques centimètres, ils sont prélevés des tubercules sous un flux d'air laminaire stérile. L'extrémité coupée du germe est obturée à la paraffine avant la désinfection afin d'éviter un éventuel dégât du tissu végétal par le produit désinfectant. Les fragments de germes ainsi préparés sont désinfectés en surface par

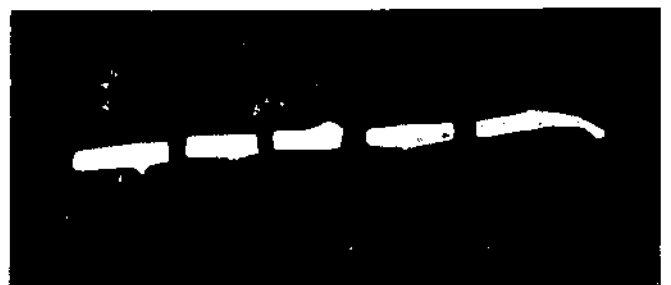


Fig. 1. Germe de pomme de terre coupé en segments pour la mise en culture *in vitro*.

<sup>1</sup> Avec la collaboration technique de J.-P. Dutoit et D. Thomas.

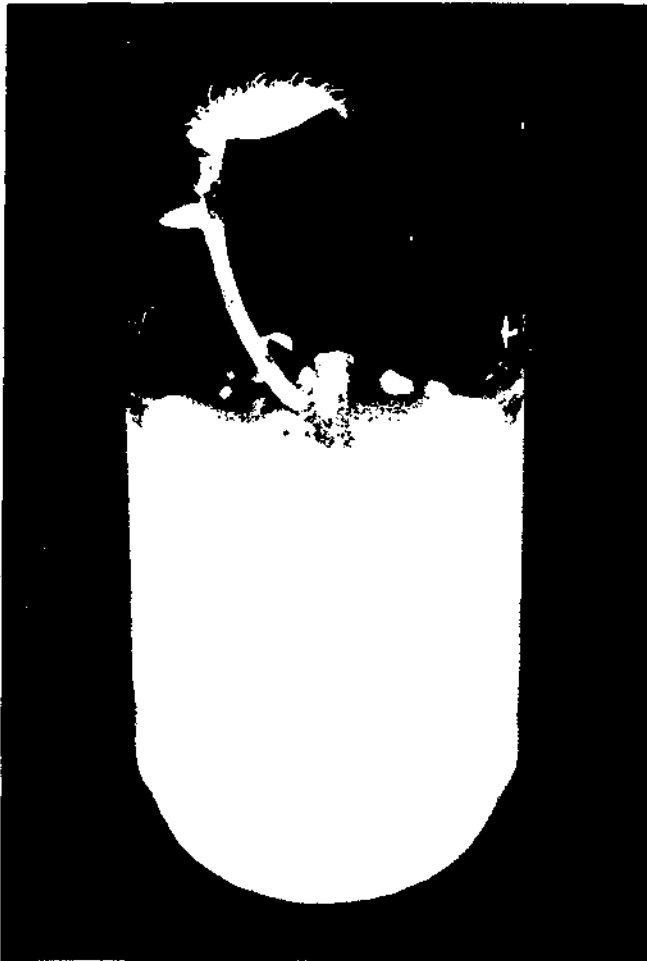


Fig. 2. Bouture *in vitro* après 1 semaine de végétation (gauche) et après 4-5 semaines (droite).

un passage rapide dans l'éthanol à 70%, suivi d'un double trempage dans l'hypochlorite de sodium à 0,5%, additionné de quelques gouttes de mouillant (Teepol) pendant dix minutes chacun. Ensuite les fragments sont rincés 3 à 4 fois à l'eau distillée stérile et séchés entre deux feuilles de papier filtre stérile. Les germes sont découpés en autant de tronçons de 1 cm de long environ (fig. 1) qu'il y a de nœuds; on place ces fragments dans des tubes de culture en verre de 25 × 150 mm, contenant chacun 15 ml de milieu nutritif CMS (COLLET, 1983) composé des substances suivantes (mg/l):

KNO <sub>3</sub>	(1213)
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	(708)
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	(370)
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(230)
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	(8,4)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	(6,2)
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	(2,87)
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	(0,25)
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	(0,25)
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	(0,025)
KI	(0,83)
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	(5,56)
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	(22,4)
Saccharose	(20000)

Le pH est ajusté à 5,7 avec de l'acide chlorhydrique ou de la soude caustique; le milieu de culture est solidi-

fié par de l'Agar (Difco Bacto Agar) à 0,7% et stérilisé à l'autoclave pendant quinze minutes à 121°C (1.1 kg/cm<sup>2</sup>).

#### Environnement de la culture

**Lumière:** Les conditions d'éclairage sont celles de la chambre de culture Weiss — type 12'E/14-PK; l'éclairage est assuré par des tubes fluorescents Sylvania de type Cool White de 215 W donnant 200 μW/cm<sup>2</sup> environ au niveau des plantes.

**Température:** La température est de 20 ± 1°C le jour, et de 16 ± 1°C la nuit.

**Hygrométrie:** Une humidité relative de 55 à 60% est maintenue dans l'enceinte de culture pendant toute la période d'expérimentation.

Après quatre à cinq semaines de culture, les premiers fragments de germe donnent naissance à de jeunes plantules (fig. 2). Celles-ci sont retirées des tubes et fragmentées à leur tour en 5 à 6 segments (micro-boutures) selon la technique proposée par NOZERAN *et al.* (1977), dans le but d'obtenir une reproduction rapide de clones de pommes de terre (fig. 3). Ces microboutures, contenant chacune un bourgeon axillaire, sont repiquées sur un milieu neuf de même composition que celui mentionné plus haut pour poursuivre leur croissance et servir de matériel de départ pour d'autres cycles de multiplication.

### Culture sur substrat artificiel

De même que pour le microbouturage *in vitro*, cette opération consiste à transférer des fragments de jeunes plantes (microboutures) obtenus *in vitro* sur substrat artificiel de type Grodan (laine de roche) disposé dans des enceintes de culture transparentes (fig. 4) et à favoriser le développement de nouvelles plantes moyennant un apport de substances nutritives. Cette solution nutritive est identique à celle utilisée en culture *in vitro*, mais réduite au quart de sa concentration initiale. Les conditions de culture sont les mêmes que celles pratiquées en microbouturage *in vitro*.

### Bouturage en terreau (*ex vitro*)

Contrairement au bouturage *in vitro*, on n'utilise pas le germe, mais une tige prélevée sur la plante-mère. Les pieds-mère proviennent soit de plantes obtenues *in vitro* et sevrées sur un milieu semi-stérile, par exemple laine de roche (voir ci-dessus), soit de plantes normales obtenues à partir d'un tubercule. Les fragments de tiges prélevés sur les plantes-mère sont piqués dans des presse-mottes, petits cubes de terreau d'environ 3,5 cm de côté. Les plateaux avec les nou-



Fig. 3. Plantule coupée en segments de tiges avec une feuille pour un nouveau repiquage.



Fig. 4. Repiquage sur substrat artificiel, genre Grodan (laine de roche).

veaux repiquages sont recouverts d'un film plastique transparent et mis en culture dans des chambres climatisées (fig. 5). Les températures sont de 24 à 25°C avec une intensité lumineuse d'environ 600  $\mu$ watt/cm<sup>2</sup>. Après quatre semaines de végétation, 4 à 5 nouvelles feuilles sont formées et un nouveau bouturage peut être entrepris.

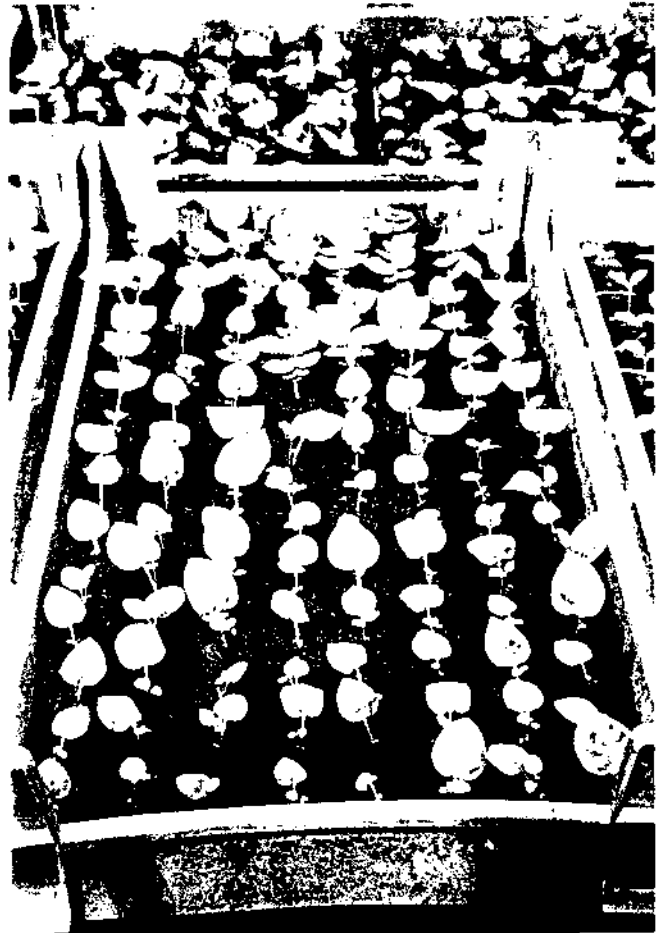


Fig. 5. Repiquages en presse-mottes fabriqués avec du terreau.

## Influence du type de terreau sur la reprise et la croissance des boutures

Dans un travail de bouturage en presse-mottes, décrit par AMAUDRUZ (1981), 4 terreaux ont été examinés :

- Terreau étranger avec un taux élevé de matière organique et très riche en matières nutritives.
- Terreau de serre de Changins, moins riche et moins équilibré que le premier.
- Un mélange contenant 1/3 (volume) de sable et 2/3 du terreau a.
- Un mélange contenant 1/2 (volume) de perlite et 1/2 du terreau a.

Tableau 1. Résultats de l'analyse des terreaux.

Terreaux	Mat. org. %	pH	mg/100 g de terreau sec					Salinité g/100 g
			N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sub>2</sub> O	Ca	Mg	
Belflor = a	35	4,3	224,0	80,0	210,0	82,5	41,6	1,496
Serre = b	25	7,2	24,8	5,6	56,7	30,0	4,7	0,182

Les résultats présentés dans la figure 6 montrent qu'il n'y a que très peu de différence dans le développement des boutures selon les terreaux (fig. 6 et tabl. 1). Le mélange de sable et terreau c semble un peu moins favorable à la croissance tandis que le mélange de perlite et terreau d semblerait mieux convenir ; les différences ne sont cependant pas significatives.

## Influence de l'intensité lumineuse sur la croissance des boutures

Des essais ont été effectués dans les chambres de croissance avec 3 intensités lumineuses et une photopériode de seize heures par jour :

- L<sub>1</sub> = 960 Lux = environ 170 μ watt/cm<sup>2</sup> ;
- L<sub>2</sub> = 1690 Lux = environ 300 μ watt/cm<sup>2</sup> ;
- L<sub>3</sub> = 2570 Lux = environ 500 μ watt/cm<sup>2</sup>.

L'importance d'une intensité lumineuse suffisante ressort de la figure 7. Une luminosité trop faible a pour conséquence un mauvais enracinement des boutures, ainsi que la formation de peu de feuilles par bouture tant pour la variété Bintje que pour Palma.

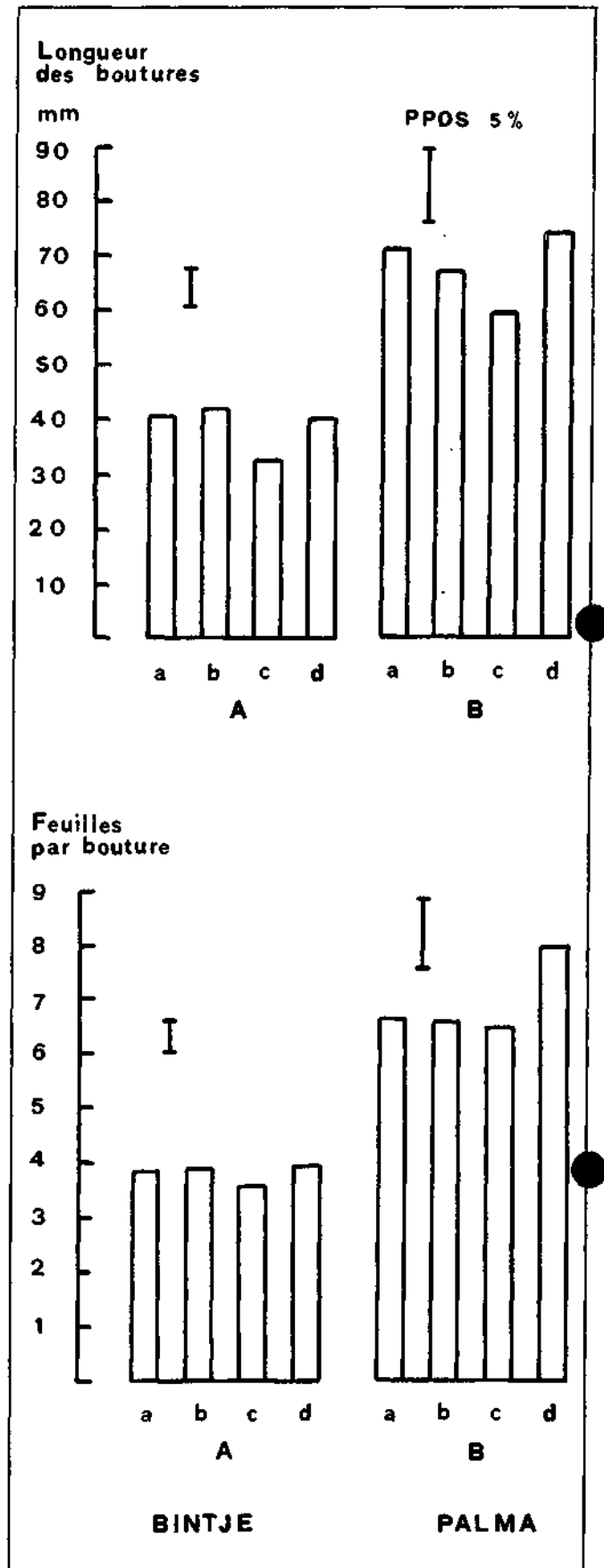


Fig. 6. Influence de la nature des terreaux sur la croissance des boutures : a = terreau Belflor, b = terreau de serre, c = 2/3 terreau Belflor + 1/3 sable, d = 1/2 terreau Belflor + 1/2 perlite A = après 15 jours de végétation B = après 30 jours de végétation.

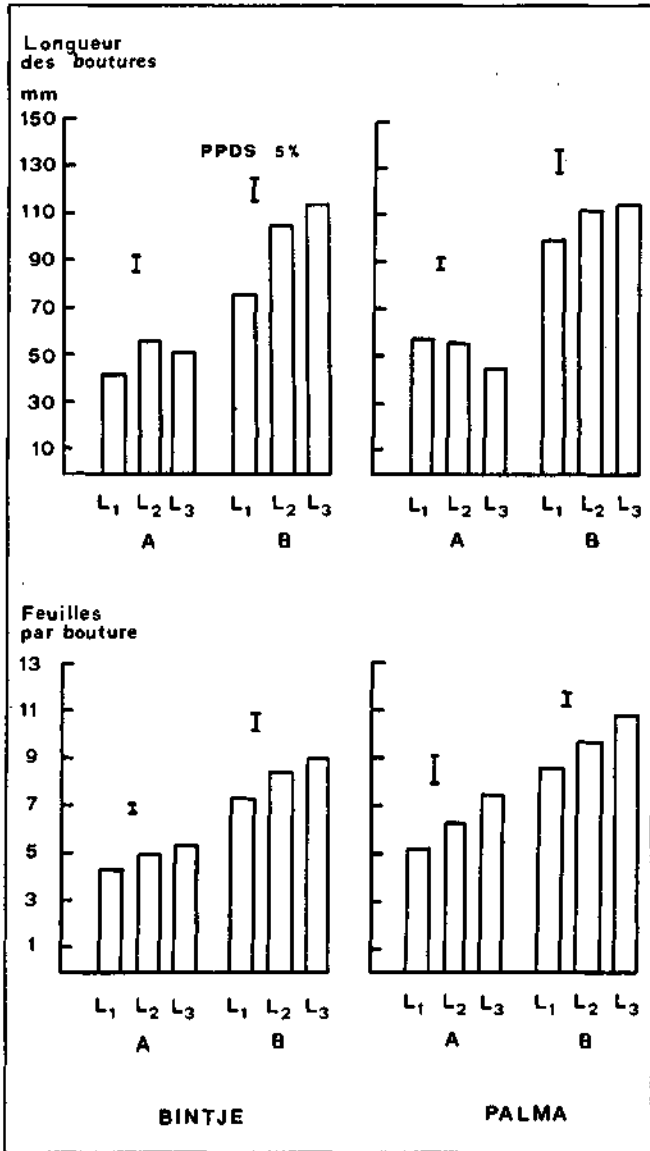


Fig. 7. Influence de l'intensité lumineuse sur la croissance des boutures :  
 L<sub>1</sub> = 960 Lux  
 L<sub>2</sub> = 1690 Lux  
 L<sub>3</sub> = 2570 Lux  
 A = après 15 jours de végétation  
 B = après 30 jours de végétation.

### Influence de la position des segments prélevés sur la plante-mère, sur la reprise et la croissance des repiquages

Selon sa position, le segment prélevé sur la plante-mère présente une différence d'âge. Les boutures prélevées à la base (proximales) d'une plante-mère ont un âge physiologique plus avancé que celles du sommet (distales). L'âge du tissu semble jouer un rôle important sur l'enracinement. Dans cet essai, seuls les fragments de tiges utilisables ont été prélevés, les feuilles partiellement jaunies étant éliminées. Les résultats présentés sur la figure 8 montrent que les segments prélevés dans les parties distales de la plante-mère ont une meilleure reprise et croissance que ceux de la partie proximale.

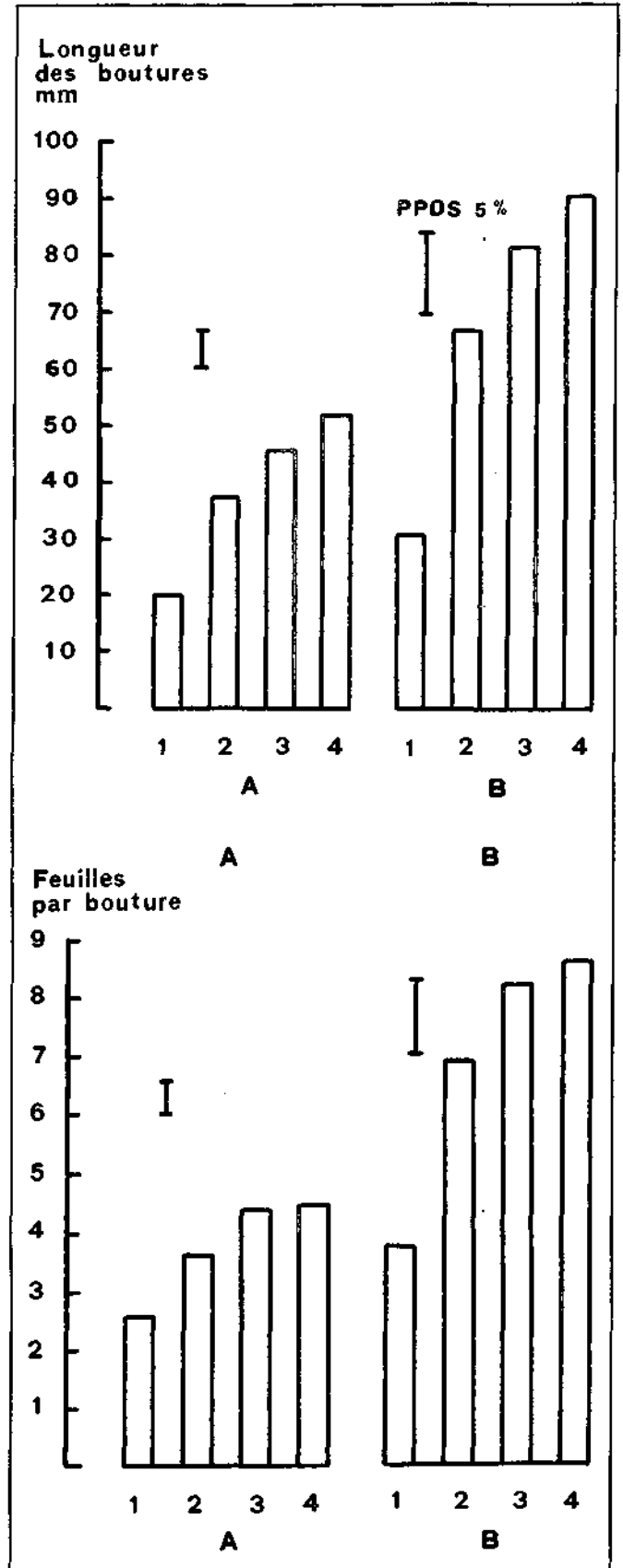


Fig. 8. Influence de la position des segments prélevés de la plante-mère sur la reprise des repiquages (valeurs moyennes obtenues des variétés Bintje, Palma et Aura):  
 1 = segment proximal  
 4 = segment distal  
 A = après 15 jours de végétation  
 B = après 30 jours de végétation.



Fig. 9. Récolte obtenue à partir d'un mini-tubercule plant d'environ 10 g (flèche) après 80 jours de végétation, variété Bintje.

## Production de tubercules à partir des boutures

La dernière étape consiste dans l'introduction des boutures dans le cycle normal de production. Deux possibilités sont offertes :

- une première multiplication en serre avec la production de tubercules qui seront transmis aux multiplicateurs ;
- la transplantation des boutures directement en pleine terre.

### Production en serre

Les boutures sont plantées en petits pots d'une contenance de 0,25 l de terreau. La durée de végétation est de trois mois environ. Lorsque les petits tubercules sont récoltés pendant la saison d'hiver jusqu'à la fin février, la plantation en plein champ peut alors être envisagée la même année encore.

Tableau 2. Effet de différents régulateurs de croissance appliqués chacun à deux doses différentes, sur la tubérisation des boutures de deux variétés de pommes de terre.

Traitements	Ukama		Nicola	
	tubercules/plante	g/plante	tubercules/plante	g/plante
T <sub>1</sub>	2,8	30,7	3,3	22,0
T <sub>2</sub>	4,4	20,2	2,9	13,7
C <sub>1</sub>	2,7	44,5	3,3	37,9
C <sub>2</sub>	2,9	47,0	3,2	37,1
B <sub>1</sub>	2,3	47,8	3,5	44,3
B <sub>2</sub>	3,4	48,5	3,2	35,5
O <sub>1</sub>	2,9	45,9	3,3	40,3
O <sub>2</sub>	2,9	37,3	3,1	34,8
non traité (témoin)	2,3	51,8	3,5	48,6

T <sub>1</sub> = Terpal (mépiquat-chlorure + éthéphon)	1,5	l/ha
T <sub>2</sub> = Terpal (mépiquat-chlorure + éthéphon)	3	l/ha
C <sub>1</sub> = CCC (chlorure de 2-chloroéthyle-triméthylammonium)	2	l/ha
C <sub>2</sub> = CCC (chlorure de 2-chloroéthyle-triméthylammonium)	4	l/ha
B <sub>1</sub> = B <sub>9</sub> (daminozide)	1	kg/ha
B <sub>2</sub> = B <sub>9</sub> (daminozide)	3	kg/ha
O <sub>1</sub> = Orthonil (PRB - 200 E <sub>50</sub> )	1,5	kg/ha
O <sub>2</sub> = Orthonil (PRB - 200 E <sub>50</sub> )	3	l/ha

Préalablement, la dormance des plants doit être levée par les moyens chimiques, tels que la rindite. Il est particulièrement important que plusieurs germes par plant se développent, afin de réaliser un taux de multiplication élevé. La plantation en plein champ peut être effectuée avec une planteuse semi-automatique, tout en respectant un semis superficiel et une densité qui devrait atteindre 80 000 à 100 000 plants/ha selon le nombre de germes formés par tubercule (fig. 9). L'objectif est de récolter un nombre maximum de tubercules par plantules ; dans cette optique et en se basant sur des travaux de MARINUS et BODLAENDER (1978), nous avons effectué des essais avec différents régulateurs de croissance appliqués sur les jeunes plantules en serre (JORDI, 1983).

Nous avons observé que l'époque de la mise en place des boutures en serre jouait également un rôle important. Les mois les moins favorables sont novembre, décembre et janvier, lorsque la luminosité naturelle est la plus faible dans notre région. L'apport de la lumière artificielle n'a pas permis de compenser ce déficit. Le nombre de tubercules par plantule peut varier du simple au double selon la saison de mise en culture.

L'efficacité de ces produits sur pommes de terre semble assez aléatoire et les doses élevées ont souvent provoqué des dégâts phytotoxiques. Des différences variétales ont été observées dans la sensibilité des plantes aux matières actives. Par exemple 3 l/ha de Terpal avaient un effet très défavorable sur la variété Nicola, tandis que pour la variété Ukama un effet favorable a été observé sur le nombre de tubercules par plantule. Le CCC et l'Orthonil provoquent

des troubles de la photosynthèse. Ces derniers sont cependant réversibles avec la croissance des plantes. Le B<sub>9</sub> est la seule substance qui n'entraîne pas d'anomalie de la croissance des plantes, mais son effet par rapport au témoin n'est pas toujours évident (tabl. 2).

### Production en pleine terre

Des plants mottés âgés de quatre semaines des variétés Christa, Palma et Erntestolz ont été plantés en pleine terre. Le peuplement a été de 50 000 plants par ha. La récolte eut lieu après 85 jours de végétation. Les résultats sont présentés dans le tableau 3. D'une manière générale, le nombre de tubercules par plante est assez faible (tige unique), mais en revanche leur taille est considérable, environ 80 g/tubercule. Bien que les rendements totaux soient inférieurs à ceux issus de plants normaux, cette méthode présente un intérêt économique certain. Cependant, certains risques culturels inhérents à cette méthode, par exemple gel, sécheresse, nous ont fait opter pour une première multiplication en serre.

Tableau 3. Rendements obtenus en plein champ avec des boutures mottées.

Variété	Nombre de tubercules/bouture (plant)	g/plante	Rendement q/ha
Christa	4,2	345	150
Palma	3,8	328	131
Erntestolz	4,5	344	138
Erntestolz (plants)	15,4	436	174

### Discussion

Les techniques de multiplication en laboratoire sont très exigeantes en travail et nécessitent un équipement en chambres climatisées ou de serres protégées contre les insectes. En l'absence d'installations qui permettent de travailler en conditions stériles *in vitro*, il s'agit alors d'élever des plantes indemnes de maladies sur lesquelles seront prélevées des tiges pour le bouturage en terreau. Cette pratique de bouturage pourrait aussi être effectuée par des organisations de multiplicateurs, à condition de disposer de serres ou tunnels en plastique.

Comme nous l'avons présenté dans ce travail, les conditions de l'environnement sont très importantes, surtout en période d'enracinement. La température influence la rapidité de croissance; elle se situera de préférence entre 20 et 25°C. Par ces méthodes, nous avons multiplié avec succès plusieurs variétés nouvellement inscrites dans la liste officielle suisse (Palma, Erntestolz, Nicola et Granola) et ainsi obtenu un petit stock de plants de base. Cette pratique permettrait au pays d'assurer une production de plants de base en cas de nécessité. Cela était inconcevable en travaillant uniquement avec les méthodes de multiplication traditionnelles.



Fig. 10. Culture de sélection comprenant 2 lignes de mini-plants (voir floraison en bordure de la ligne de séparation). Cette photo témoigne de la vigueur du plant de petit calibre.

### Résumé

Les méthodes de microbouturage telles qu'elles sont appliquées à la Station fédérale de Changins sont décrites dans ce travail.

En première phase, nous appliquons le bouturage *in vitro* à partir d'un germe de pomme de terre issu d'un tubercule indemne de toute maladie. Le fragment de germe est mis en culture dans des tubes contenant un milieu nutritif. Après 4 semaines, les jeunes plantules ont formé 4 à 5 feuilles et un nouveau bouturage peut être entrepris. Le repiquage est pratiqué dans un substrat artificiel (laine de roche) imbibé de solution nutritive. Les boutures passent ainsi d'un milieu stérile dans un milieu semi-stérile qui se contaminera naturellement pendant la végétation. Les repiquages suivants sont effectués dans des presse-mottes fabriqués avec du terreau. En dernière phase, les boutures sont plantées en petits pots ou dans des baches en serre pour la production de tubercules. Les tubercules plants ainsi obtenus ont un poids de 3 à 20 g. Ils sont transmis au multiplicateur pour la production de plants en plein champ.

Plusieurs variétés récemment inscrites dans la liste officielle des variétés de pommes de terre ont ainsi été multipliées au cours des dernières années. L'importance de l'intensité lumineuse de la nature du terreau et de la position des segments sur la plante-mère a également été examinée.

### Zusammenfassung

#### Schnellvermehrung der Kartoffel durch Mikrostecklinge

Die Stecklingsvermehrungsmethoden bei Kartoffeln, wie sie an der Forschungsanstalt Changins durchgeführt werden, sind in dieser Arbeit beschrieben.

Als Ausgangsmaterial wird ein Kartoffelkeim von einer gesunden Knolle im Reagensglas vermehrt. Nach 4 Wochen Wachstum haben die jungen Pflänzchen 4-5 Blätter gebildet und eine neue Vermehrung kann erfolgen.

Die neuen Stecklinge werden in einem sterilen Substrat, z.B. Steinwolle, piquiert und mit einer Nährlösung getränkt. Dieses Substrat wird im Verlauf der Vegetationsperiode auf einer natürlichen Weise befallen. Die folgenden Vermehrungen werden in Pressmotten aus Torf durchgeführt.

Als letzte Phase werden die Stecklinge in kleine Töpfe oder in Beeten im Treibhaus ausgepflanzt zur Knollenproduktion. Die so gewonnenen Knöllchen haben ein Gewicht von 3-20 Gramm. Diese werden an Vermehrer überreicht zur Saatgutproduktion im Felde.

Einige neue Sorten, welche in unserem Land angebaut werden, sind im Verlauf der letzten Jahre auf dieser Weise vermehrt worden.

Die Bedeutung der Lichtintensität, der Zusammensetzung des Torfs und der Lage der Stengelsegmente auf der Mutterpflanze wurde ebenfalls untersucht.

## Summary

### Rapid multiplication of potato with micropropagation

Rapid multiplication of potatoes by means of cuttings as used at the Federal Research Station Changins is described in this publication.

At the beginning, the propagation is made in glass tubes with sprout pieces of a healthy tuber. After 4 weeks *in vitro*, the plantlets have produced 4-5 new leaves and a new cutting can be started. The stem pieces are pricked again but in an artificial medium like stone wool wetted with a nutritive solution. The cutting passes from a sterile medium to a non sterile one during growth. Other planting out of this material are made in rootballs (presse-mottes). At the last stage, the cuttings are planted in small pots or hotbeds in glasshouses for tuber production. The obtained micro tubers weight about 3-20 grams. This material is then transmitted to the growers for normal seed production in the field.

Several new potato cultivars cultivated in our country have been multiplied with these methods in the last years.

The role of light intensity, mould composition and the localisation of the stem segments on the mother plants were also examined.

## Bibliographia

- AMAUDRUZ M., 1981. Mise au point d'une méthode de microbouturage de la pomme de terre à la RAC-Changins. Travail de semestre, Ecole polytechnique fédérale, Zurich (non publié).
- ANONYME, 1983. Culture *in vitro* et production de plants. *Cultivar* 166, 64-65.
- COLLET G., 1983. Communication personnelle. RAC, Changins.
- GRISON C., 1979. La guérison des pommes de terre atteintes de viroses par la culture de méristème. *La pomme de terre française* 393, 203-207.
- JORDI U., 1983. Influence de régulateurs de croissance sur la tubérisation de pommes de terre issues d'*in vitro*. Travail effectué à la RAC-Changins et présenté à l'Ecole d'ingénieurs horticoles de Lullier, Genève (non publié).
- LE CONG-LINH, 1984. Assainissement et multiplication par microbouturage de la variété de pomme de terre Sangema. Rapport interne RAC (non publié).
- MAOEC P. et FRANCOIS J., 1981. Une possibilité simple de conservation de longue durée des collections de pommes de terre cultivées *in vitro*. 8<sup>e</sup> conférence trisannuelle de l'Association européenne pour la recherche sur la pomme de terre. EAPR, Abstracts of Conference Papers, Munich, 1-2.
- MARINUS J. and BOOLAENDER K.B.A., 1978. Growth and yield of seed potatoes after application of gibberellic acid to the tubers before planting. *Neth. J. agric. Sci.* 26, 354-365.
- MIX G., 1980. Kartoffelsorten aus dem Reagensglas. *Der Kartoffelbau* 31, 9, 306.
- MIX G., 1981. Kartoffelsorten aus dem Reagensglas. Bedingungen zur Langzeitlagerung. *Der Kartoffelbau* 32, 7, 198-199.
- NOZERAN R., BANCILHON-ROSSIGNOL L. et GRENAN S., 1977. Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones sains de pommes de terre (*Solanum tuberosum* L.). *C.R. Acad. Sc. Paris*, série D, 285, 37-40.
- ROSSIGNOL P., 1977. 40 hectares plantés à partir d'une seule pomme de terre. *Science et vie*, n° 720, p. 71.

HORTSCIENCE 20(3): 451-452. 1985.

## Influence of Temperature on in Vitro Root Initiation and Development of Apple Rootstock M<sub>26</sub>

C.L. Lê

Station Fédérale de Recherches Agronomiques de Changins (RAC,  
 CH-1260 NYON, Switzerland

Additional index words. tissue culture. *Malus*, micropropagation

There have been numerous reports on the use of aseptic methods for in vitro rooting of the apple seedlings (8), scion cultivars (7, 9, 13, 14), and rootstocks (1, 6, 9, 12, 15, 16). From these studies, researchers have pointed out that in vitro apple rooting is affected by different factors (2, 3, 5, 9, 13, 14). The effect of temperature on in vitro rooting in apple also has been investigated, but results have been contradictory (3, 8). The lack of information on the effect of temperature on in vitro rooting of apple in adult and juvenile growth phases prompted this investigation. This paper reports the quantitative response of apple rootstock M<sub>26</sub> in adult and juvenile growth phases to different temperatures applied during the root initiation phase.

The cultures of apple rootstock M<sub>26</sub> adult and juvenile growth phases used in these experiments were supplied by the Swedish Univ. of Agricultural Sciences, Dept. of Pomology, Alnarp, Sweden. Details for initiating these cultures were described previously (15). Shoot cuttings taken from the mother cul-

tures (14th subcultures) were transferred on a modified Murashige and Skoog's medium (10) supplemented with (per liter) 100 mg myo-inositol, 0.4 mg thiamine-HCl, 1.0 mg Benzylaminopurine, and 30 g sucrose. The medium was solidified with 6 g Difco Bacto-Agar. Thirty ml of medium at pH 5.2 were dispensed into each 125 ml jar and autoclaved at 121°C (1.1 kg/cm<sup>2</sup>) for 15 min. There were 4 shoots cuttings per jar. The cultures were maintained in a growth chamber at 22° ± 1°C with a 16 hr photoperiod at an irradiance intensity of 8.6 μmol s<sup>-1</sup>m<sup>-2</sup> using cool-white fluorescent tubes (Sylvania F 96 T 12/CW/VHO). For rooting investigations single axillary shoots taken from 30-day-old cultures proliferating shoots were placed in 25 x 150 mm test tubes containing 15 ml of half-strength Lepoivre formula medium (11). The medium was supplemented with (per liter) 100 mg myo-inositol, 0.4 mg thiamine-HCl, 0.3 mg indolebutyric-acid (IBA), 20 g sucrose, and 7 g Difco Bacto-Agar. The pH was adjusted to 5.2 and the medium autoclaved for 15 min at 121°C (1.1 kg/cm<sup>2</sup>). The effect of temperature-treatment on rooting was investigated by culturing shoot explants at 3 different day/night temperatures (22°/20°, 25°/23°, and 28°/26°) during the root initiation phase (auxin present). Culture tubes containing single shoots were kept in complete darkness for the first 5 days (15), and under illumination for the next 2 days to induce root formation. For the root emergence phase (auxin absent), explants were transferred to a Lepoivre medium described earlier but containing no IBA, and kept in a

climate chamber at 24°/22° day/night temperature with a light period of 16 hr. Each treatment was tested on 25 microcuttings, and the experiments were repeated (twice). The number of roots per explant and the percentage of rooted shoots were recorded after 11 days in the hormone-free medium during root emergence.

As shown in Table 1, temperature during the root initiation phase had a marked influence on rooting in juvenile and adult growth phases. When cuttings were maintained at 22°C, root development was not satisfactory: most cuttings had few or no roots. By increasing the temperature from 22° to 25°, rooting percentage and mean number of roots per rooted shoot were increased. The maximum percentage of rooted cuttings was 72% in adult and 50% in juvenile material. However, there was no significant difference in root proliferation among these growth phases when considering the number of roots per rooted shoot. At 28° temperature, the rooting of M<sub>26</sub> was reduced severely. These data contrast with those of other researchers. James observed no differences in rooting in apple rootstock M<sub>9</sub> at 22°, 25°, and 29° during the root initiation phase and the root emergence phase (3). Lane found that rooting of seedling apple shoots grown in vitro was enhanced at 28° and greatly reduced at 18° or 23° (8). Moreover, lower temperature induced anthocyanin formation and chlorosis in the cultures. In our experiments, such symptoms have not been observed at any temperature, but a small callus was produced at the cut end of the cuttings in most cultures. This callus seems to have no noticeable effect on root development. According to Welander, the composition of nutrient medium could play a role in callus formation when environmental conditions are unfavorable (15). Furthermore, the mean number of roots per rooted shoot at 28° also was reduced for both materials, suggesting that high temperature inhibits formation of adventitious roots of rootstock M<sub>26</sub>.

Our finding is unlike earlier results, probably due not only to the varying day/night temperature regimes used by Lane (8), which could reduce rooting capacity at low tem-

Received for publication 15 Oct. 1984. We express our thanks to Margareta Welander, Dept. of Pomology, Swedish Univ. of Agr. Sci., Alnarp, Sweden, for kindly providing the experimental material, and for her valuable discussion. This study was financially supported by the Swiss Federal Agr. Dept. The cost of publishing this paper was defrayed in part by the payment of page charges. Under postal regulations, this paper therefore must be hereby marked advertisement solely to indicate this fact.

Table 1. Effect of temperature during initiation phase on rooting of apple rootstock M26.

Growth phase	Temp treatment (°C)	Rooted shoots (%)	No. of roots per rooted shoot ( $\pm$ SE)
Juvenile	22	36	2.52 $\pm$ 1.0 a <sup>4</sup>
	25	50	4.03 $\pm$ 1.67 b
	28	16	2.75 $\pm$ 2.21 a
Adult	22	40	2.71 $\pm$ 2.05 a
	25	72	3.87 $\pm$ 1.95 b
	28	48	2.83 $\pm$ 2.02 a

<sup>4</sup>Mean separation within column by Duncan's multiple range test, 5% level.

perature, but also to the fact that, in our experiments, the transfer of cultures to hormone-free medium after a short period of IBA-treatment in complete darkness might be beneficial for root development (15). Also to be considered are the possible effects of different endogenous auxin levels and metabolism of exogenous auxin in both apple rootstocks M<sub>9</sub> and M<sub>26</sub> (4), and in apple seedlings. The different levels could explain the different rooting responses between these two apple rootstocks and seedling with respect to their sensitivity to temperature application.

#### Literature Cited

- James, D.J. and I.J. Thurbon, 1979. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M<sub>9</sub>. *J. Hort. Sci.* 54:309-311.
- James, D.J. and I.J. Thurbon, 1981. Phenolic compounds and other factors controlling rhizogenesis *in vitro* in the apple rootstocks M<sub>9</sub> and M<sub>26</sub>. *Z. Pflanzenphysiol.* 105:11-20.
- James, D.J. 1983. Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*) I. Factors affecting the length of the auxin-sensitive phase in M<sub>9</sub>. *Physiol. Plant.* 57:149-153.
- James, D.J. 1983. Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*) II. Uptake and distribution of indol-3yl-acetic acid during the auxin-sensitive phase in M<sub>9</sub> and M<sub>26</sub>. *Physiol. Plant.* 57:154-158.
- Jones, O.P. and S.G.S. Hatfield, 1976. Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. *J. of Hort. Sci.* 51:495-499.
- Jones, O.P., M.E. Hopgood, and D. O'Farrel, 1977. Propagation *in vitro* of M<sub>26</sub> apple rootstocks. *J. Hort. Sci.* 52:235-238.
- Jones, O.P., C.A. Pontikis, and M.E. Hopgood, 1979. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. *J. Hort. Sci.* 54:155-158.
- Lane, D.W. 1978. Regeneration of apple plants from shoot meristem tips. *Plant Sci. Let.* 13:281-285.
- Lane, D.W. and J.M. Mc Dougald, 1982. Shoot tissue culture of apple: Comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. *Can. J. Plant Sci.* 62:689-694.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Quoirin, M., P. Lepoivre, and P. Boxus, 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. *Compte rendu des recherches 1976-1977 et rapport de synthèse de la station des cultures fruitières et maraichères du Centre de recherches agronomiques de l'état B - 5800 Gembloux (Belgique).*
- Snir, I. and A. Frez, 1980. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. *HortScience* 15(5):597-598.
- Sriskandarajah, S. and C.M. Mullins, 1981. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 56:71-76.
- Sriskandarajah, S., G.M. Mullins, and Y. Nair, 1982. Induction of adventitious root *in vitro* difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Sci. Let.* 24:1-9.
- Welander, M. 1983. *In vitro* rooting of the apple rootstock M<sub>26</sub> in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiol. Plant.* 58:231-238.
- Werner, E.M. and A.A. Boe, 1980. *In vitro* propagation of malling 7 apple rootstock. *HortScience* 15(4):509-510.

# Multiplication clonale *in vitro* du pommier (*Malus domestica* Borkh., var. Gravenstein)

C. L. LÉ, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

## Introduction

Les cultures de tissus *in vitro* ont été développées chez le pommier (*Malus domestica* Borkh.) durant la dernière décennie comme moyen de reproduction par voie végétative (DUTCHER et POWELL, 1972; WALKEY, 1972; QUOIRIN *et al.*, 1974; ABBOTT et WHITELEY, 1976; JONES *et al.*, 1977, 1979; LANE, 1978; JAMES et THURBON, 1979; LUNDERGAN et JANICK, 1980; SNIR et EREZ, 1980; WERNER et BOE, 1980) en vue d'obtenir de façon sûre et praticable des individus conformes aux types parentaux, avec un taux de multiplication élevé.

Partant de matériel végétal de base (bourgeons dormants ou en croissance active), la culture *in vitro* du pommier suit en principe quatre étapes successives, à savoir :

1. L'installation du tissu initial en milieu axénique.
2. La multiplication du tissu établi par prolifération de bourgeons axillaires.
3. L'enracinement de jeunes pousses (microboutures) en vue de la régénération en plantes entières.
4. Le sevrage des microplantes par acclimatation aux conditions de la culture traditionnelle.

De nombreux facteurs portant sur les conditions de l'environnement, les caractéristiques physico-chimiques des milieux de culture, susceptibles d'exercer une influence sur le bon déroulement de ces différentes étapes, selon le type de matériel mis en culture (porte-greffe ou variétés), ont aussi été signalés par ces mêmes auteurs.

Dans ce travail, nous avons tenté de provoquer la prolifération de nouveaux bourgeons axillaires sur les apex du pommier (*Malus domestica* Borkh. cv. Gravenstein) et de les régénérer en plantes entières capables de poursuivre leur croissance en milieu de culture traditionnel, dans le but d'une reproduction accélérée *in vitro*.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre essai comporte des sujets de la variété de pommier Gravenstein, exempts de virus (type A), cultivés au verger-étalon de la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins/Nyon.

## Phase d'installation

Des extrémités de tige de 4 à 5 cm de longueur sont prélevées sur des rameaux-greffons en pleine croissance, au mois de juin. Les feuilles ayant été enlevées, les boutures sont désinfectées superficiellement par un trempage (5 à 10 secondes) dans de l'éthanol à 70%, suivi d'un double passage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,8%, pendant 12 minutes chacun, avec quelques gouttes d'un mouillant de type Teepol. Elles sont ensuite rincées trois fois à l'eau stérile et essuyées entre deux feuilles de papier filtre stérile. Les extrémités de tige ainsi préparées sont alors rafraîchies à leur base de façon à obtenir des explants (Apex) dont la taille n'exécède pas 1 cm de longueur, que l'on dispose sur le milieu nutritif, en respectant leur polarité.

Le milieu de culture de base se compose de sels minéraux de MURASHIGE et SKOOG (1962), avec du FeNaEDTA à la place de Na<sub>2</sub>EDTA et FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, à raison de 40 mg/l, renfermant diverses substances de croissance (tabl. 1). Le

Tableau 1. Milieux nutritifs de base utilisés dans différentes phases de culture *in vitro*.

	Murashige et Skoog (1962)	Lapovire (1977)	CMS (Collet, 1985)
<b>Macro-éléments (mM)</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20,6	5,0	—
KNO <sub>3</sub>	18,8	17,8	12
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,5	1,46	1,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25	2,0	—
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	—	2
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	—	—	3
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	3,0	—	—
<b>Micro-éléments (μM)</b>			
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	30	30	10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100	100	100
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	100	4,5	50
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,1	0,1	1,0
KI	5,0	0,5	5,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1,0	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,1	0,1	0,1
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	—	—	20
Na <sub>2</sub> EDTA	—	—	60
FeNa EDTA	100	100	—
<b>Vitamines (μM)</b>			
Thiamine HCl	3,0	3,0	—
Myoinositol	550	550	—
<b>Substances de croissance (μM)</b>			
Ac. β-indolyl-butyrique (AIB)	0,5	0-10	—
Benzyladénine* (BA)	4,5	—	—
	(Installat.)		
	0-50	—	—
	(Proliférat.)		
Ac. Gibbéréllique (GA <sub>3</sub> )	0,3	—	—
Saccharose	3%	2%	2%
Agar	0,7%	0,7%	0,7%

\* Pour la phase de prolifération, seule la Benzyladénine a été retenue dans le milieu de culture.

pH est ajusté à 6,0 avec du KOH à 0,1 N avant l'autoclavage. Les milieux sont stérilisés à l'autoclave pendant 15 minutes à 120°C (1,1 kg/cm<sup>2</sup> de pression).

Les récipients de culture sont placés dans une chambre de croissance où ils reçoivent une photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures. L'éclairage dont l'intensité est de 850  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> au niveau des cultures est fourni par des tubes fluorescents de 65 W (Mazda Aviva TF 65/AV1). La température est maintenue par un système de climatisation à 23±1°C le jour et 18±1°C la nuit, durant toute la période de l'essai.

### Phase de multiplication

La détermination du milieu de culture optimal favorable à la prolifération de nouveaux bourgeons est réalisée sur la base des réponses du matériel végétal, constitué d'extrémités de pousse (Apex) de 1 cm de longueur environ, sur un milieu nutritif de base (voir phase d'installation) contenant diverses concentrations d'une cytokinine, la Benzyladénine (BA) (tabl. 1 et 2). L'environnement de culture *in vitro* reste identique à celui de la phase précédente. L'estimation du nombre moyen de pousses axillaires développées en présence de substance de croissance s'effectue après 4 semaines de culture, en ne tenant compte que des pousses ayant atteint au moins une taille de 0,5 cm.

### Phase d'enracinement

Cette phase consiste à prélever des jeunes pousses de 1 à 3 cm de longueur en pleine croissance *in vitro* et à les placer sur un milieu de culture de base de LÉPOUVRE (1977) auquel sont ajoutées différentes concentrations d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) (tabl. 1 et 3).

Les cultures sont maintenues à l'obscurité pendant les sept premiers jours pour initier la formation de racines (phase d'induction), selon WELANDER (1983) et ensuite sont transférées à la lumière, sur un nouveau milieu nutritif CMS (COLLET, 1985) dépourvu de substance de croissance pour permettre l'émission de nouvelles racines adventives (phase de développement). Les conditions de culture de cette dernière phase sont les mêmes que celles mentionnées pour l'installation et la multiplication. Le pourcentage de microboutures enracinées ainsi que le nombre moyen de racines produites par explant sont relevés après 20 jours de culture.

### Sevrage

Les microplantules de pommier racinées sont repiquées en plaques multipots sur un substrat composé de TKS 180% et de Perlite 20%. Ces plaques multipots sont placées ensuite sous une atmosphère saturée d'humidité pendant 10 jours et progressivement ramenées à une aération normale afin de permettre aux jeunes plantes de s'adapter au nouvel environnement de culture en serre. Un traitement préventif contre les attaques cryptogamiques au moyen d'un fongicide du commerce (Zinèbe), à raison de 0,2%, a

**Tableau 2.** Action de la Benzyladénine sur la capacité de prolifération des pousses de pommier (*Malus domestica* Borkh. var. Gravenstein) en culture *in vitro*.

BA ( $\mu$ Mole/l)	N° pousses/traitements	Formation de cal <sup>2</sup>
0	0	—
0,05	0	—
0,5	1,38 ± 0,50 d <sup>1</sup>	—
2,5	2,94 ± 1,40 c	+
5,0	4,88 ± 1,71 b	+
7,5	5,71 ± 1,84 b	+
10,0	4,73 ± 1,05 b	++
50,0	8,31 ± 0,97 a	+++

<sup>1</sup> Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p = 0,05$ ), selon le test de Duncan.

<sup>2</sup> Le nombre de signes + indique l'intensité relative de la formation du cal. (— : aucun; + : faible; ++ : moyen; +++ : fort.)

été également appliqué au cours du sevrage. Les cultures sont régulièrement fertilisées avec une solution nutritive renfermant un équilibre N-P-K (2 : 3 : 18).

## Résultats et discussion

### Installation

En ce qui concerne l'infection des cultures par des microorganismes pathogènes au cours de l'établissement, il est intéressant de relever que selon notre procédé de désinfection (cf. Matériel et Méthodes), le taux de contamination représente, dans le cas présent, un faible pourcentage (5 à 8%) et que l'infection elle-même est de nature fongique.

Au cours des essais préliminaires, nous avons pu observer le phénomène du brunissement de l'explant et du milieu nutritif dû probablement à une oxydation des composés phénoliques libérés dans le milieu par le tissu végétal fraîchement implanté. Ce genre de conditionnement du milieu provoque dans le cas présent un ralentissement dans le développement de l'organe mis en place et très souvent un arrêt de croissance éventuellement suivi de nécroses mortelles.

Pour parer à cet inconvénient, nous avons simplement maintenu les apex de pommier à l'obscurité pendant les trois premiers jours de culture afin d'évi-

**Tableau 3.** Action de diverses concentrations de l'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) sur la formation des racines adventives chez le pommier (*Malus domestica* Borkh., var. Gravenstein) en culture *in vitro*.

AIB ( $\mu$ Mole/l)	% Enracinement <sup>1</sup>	N° racines/explant <sup>1</sup>	Qualité de l'enracinement
0	8	1,30 ± 0,50 d <sup>2</sup>	Racines fines
0,05	35	2,20 ± 1,05 d	Racines fines
0,5	40	2,80 ± 1,12 d	Racines fines
1,25	50	3,10 ± 1,50 cd	Racines fines et hétérogènes
2,50	50	3,25 ± 2,03 cd	Racines fines et hétérogènes
5,00	80	6,70 ± 3,07 b	Racines hétérogènes
10,00	80	9,57 ± 3,20 a	Racines longues et homogènes
20,00	60	5,00 ± 3,79 bc	Racines fines et hétérogènes, formation d'un cal léger

<sup>1</sup> L'évaluation du pourcentage d'enracinement et du nombre moyen de racines adventives est réalisée sur la base de 20 explants/traitement. L'expérience a été répétée au moins trois fois.

<sup>2</sup> Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%, selon le test de Duncan.

ter toute possibilité de brunissement du milieu nutritif à la suite de la libération et l'oxydation des substances de type phénolique. Ce mode d'intervention, sans recourir au moyen chimique, nous a permis d'éviter fortement les risques de pollution du milieu nutritif, et ainsi d'augmenter le taux de réussite à plus de 90% sur l'ensemble de nos cultures au terme de la phase d'établissement. Aussi, avons-nous appliqué ce mode de préparation à chaque nouvelle mise en culture d'apex de pommier pour la suite de nos travaux.

WERNER et BOE (1980) ont remarqué que le brunissement des explantats initiaux a rendu difficile l'établissement du pommier porte-greffe M 7 et que la réduction de la concentration en sels minéraux du milieu de base de Murashige et Skoog a permis d'obtenir des cultures ne présentant pas ou peu de trace d'oxydation. MOSELLA *et al.* (1979) font également mention de l'action favorable du diéthylthiocarbamate de sodium (DIECA) sur la diminution de l'effet toxique des polyphénols sur la croissance des apex de pêcher (*Prunus persica* Batsch.).

La production de pousses feuillées demeure pour cette phase encore modeste; au bout de 5 à 6 semaines de culture, nous avons pu obtenir, en moyenne, 1 à 3 nouvelles pousses par explantat. Celles-ci, en raison de leur contraction au niveau des entre-nœuds, se développent en de petites rosettes de 6 à 8 feuilles qui, transférées ultérieurement sur un milieu de multiplication, ne tardent pas à former de nouvelles pousses axillaires.

### Multiplication

Comme le montre le tableau 2, la présence de la Benzyladénine (BA) dans le milieu de culture s'est révélée déterminante pour provoquer le développement de nouvelles pousses chez la variété Gravenstein. L'absence totale de substance de croissance, tout comme la présence de très faible quantité de Benzyladénine ( $0,05 \mu\text{M/l}$ ) dans le milieu nutritif ne permettent pas la formation de primordia caulinaire. Le meilleur développement, dans nos conditions, a été obtenu avec les traitements renfermant 5,0 à  $10,0 \mu\text{M/l}$  de BA, ce qui augmente de manière significative le taux de prolifération de nouvelles pousses feuillées (fig. 1). Ces faits semblent être en parfait accord avec les résultats des travaux antérieurs (LANE, 1978; JAMES et THURBON, 1979; LANE et Mc DOUGALD, 1982 et OCHATT et CASO, 1983) qui ont mis en évidence les besoins en BA chez bon nombre de porte-greffe et variétés de pommier pour assurer une production optimale de pousses feuillées. De faibles concentrations de BA ( $0,05$  à  $2,5 \mu\text{M/l}$ ) s'avèrent être peu ou pas efficaces pour induire l'activité morphogénétique des extrémités de pousses (Apex) durant toute la période de culture. Cela nous laisse supposer que la variation des teneurs en substances de croissance endogènes de divers types d'organes, notamment les apex de tige feuillée, pourrait être à l'origine de cette faible prolifération, comme l'a démontré JONES (1967) dans ses travaux portant sur l'effet bénéfique de la Benzyladénine sur la croissance des pousses de pommier porte-



Fig. 1. Développement de nouvelles pousses sur milieu de Murashige et Skoog (1962) contenant  $7,5 \mu\text{M/l}$  de Benzyladénine (BA), après 4 à 5 semaines de culture. La barre représente une longueur de 1 cm.

greffe M 26. Par contre, en augmentant la teneur en BA à  $50,0 \mu\text{M/l}$  dans le milieu de base, nous avons observé un effet favorable de celle-ci sur la prolifération de pousses. Les explantats initiaux ont bien réagi à la présence de forte concentration de Benzyladénine en formant de nombreux bourgeons axillaires. Toutefois, ces jeunes bourgeons sont généralement peu développés ( $0,2$  à  $0,4$  cm de hauteur) et groupés en massifs, avec un fort développement de cal à leur base; cela rend difficile leur prélèvement soit pour les opérations de multiplication, soit pour les travaux d'enracinement, malgré leur supériorité en nombre de pousses produites par explantats. LUNDERGAN et JANICK (1980) ont aussi remarqué le phénomène de raccourcissement des pousses sur les cultures de la variété Golden Delicious lorsqu'ils apportent dans le milieu de base la Benzyladénine aux concentrations allant de  $13$  à  $22 \mu\text{M/l}$ . Après avoir obtenu le développement de nouvelles pousses feuillées sur le milieu favorable à la prolifération, nous avons effectué encore plusieurs cycles de multiplication de façon à disposer de suffisamment de matériel végétal pour réaliser nos essais d'enracinement ultérieurs. Au cours de ces repiquages successifs sur le milieu de prolifération, nous avons observé une augmentation du nombre moyen de pousses produit par explantat,



Fig. 2. Microplante racinée après 4 semaines de culture sur milieu nutritif renfermant  $10 \mu\text{M/l}$  d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB). La barre représente une longueur de 1 cm.

ainsi que de leur vigueur qui se stabilisent après 5 à 6 repiquages (subcultures). Cette observation semble être en désaccord avec celle rapportée par SRISKANDARAJAH *et al.* (1982) dans leurs travaux sur les variétés Jonathan et Golden Delicious.

### Enracinement

L'examen des résultats du tableau 3 montre que l'aptitude à l'enracinement des microboutures de Gravenstein est fortement influencée par la présence de l'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) dans le milieu de culture. Cette action favorable de l'AIB à la prolifération des racines adventives s'accroît de manière significative à mesure que l'on augmente sa concentration dans les traitements de base. Ainsi, nous avons pu obtenir, dans nos conditions d'expérimentation, l'optimum de réponse rhizogénique sur les cultures enrichies de  $10 \mu\text{M/l}$  d'AIB (fig. 2). Dans ce milieu, les ébauches racinaires sont apparues après une dizaine de jours de traitement, à la taille d'une tête d'épingle, et ont continué leur croissance de façon régulière pour donner naissance à des racines longues et homogènes. Des résultats comparables, avec la même teneur en AIB, ont été rapportés par JAMES et THURBON (1979), SRISKANDARAJAH et MULLINS (1981) et OCHATT et CASO (1983) sur les porte-greffe M4, M9 et la variété Granny Smith.

L'augmentation de l'AIB à  $20 \mu\text{M/l}$  et plus a par contre provoqué non seulement une diminution importante

de nouvelles racines, mais encore l'apparition d'un cal à la base des explantats tendant à inhiber la croissance des microboutures. Cet effet défavorable à la formation des racines adventives, dû à la présence de forte concentration d'AIB, a été également signalé par ZIMMERMAN et BROOME (1981) et WELANDER (1983) qui ont effectivement fait état de malformations de racines occasionnées par le développement intense de cal lorsque l'AIB a été apporté à des concentrations élevées. Ces auteurs ont ainsi réussi l'enracinement des variétés Northern Spy, Stayman, Summer Rambo, Orzak Gold et du porte-greffe M26, en réduisant sensiblement l'apport de l'AIB à des doses allant de  $0,05$  à  $0,5 \mu\text{M/l}$ . Dans nos essais, de telles concentrations en AIB ainsi que l'absence totale de l'auxine dans le milieu nutritif semblent ne pas permettre la mise en place, de façon convenable, de nouvelles racines chez la variété Gravenstein.

### Sevrage

L'acclimatation selon notre procédé (cf. Matériel et Méthodes) a permis à plus de 95% de plantes sortant des tubes de continuer leur cycle de croissance à chaque opération de transplantation sur substrat traditionnel (fig. 3). Il est important de noter que ces plantes ainsi sevrées n'ont présenté aucune modification morphologique notable après 6 mois en conditions de culture de serre.

### Conclusions

A partir d'explantats composés d'extrémités de pousses (Apex) de *Malus domestica* Borkh. var. Gravenstein, nous avons montré, pour la première fois pour cette variété, par un contrôle du processus organogénétique de diverses étapes de la multiplication *in vitro* (MURASHIGE, 1974) au moyen d'un équilibre phytohormonal précis, qu'il est possible de provoquer rapidement le développement de méristèmes axillaires préformés, qui après induction à l'enracinement évoluent en plantes entières capables de poursuivre leur croissance en milieu de culture traditionnel.

Nos résultats démontrent également l'avantage de la technique de multiplication *in vitro* permettant tout au long de l'année d'envisager la production accélérée de clones de pommier intéressants, non seulement avec la certitude d'obtenir des individus exempts de maladies, mais encore avec l'assurance d'une grande homogénéité des descendants au cours de multiples cycles de reproduction.

### Remerciements

Nous tenons à remercier M<sup>me</sup> C. BERNEY et M. D. THOMAS pour leur collaboration à la culture *in vitro*, M. D. PIVOT pour ses travaux d'acclimatation menés à Conthey, MM. F. PELET et R. SAUGY pour la fourniture du matériel végétal sain, exempt de virus, indispensable à nos essais.

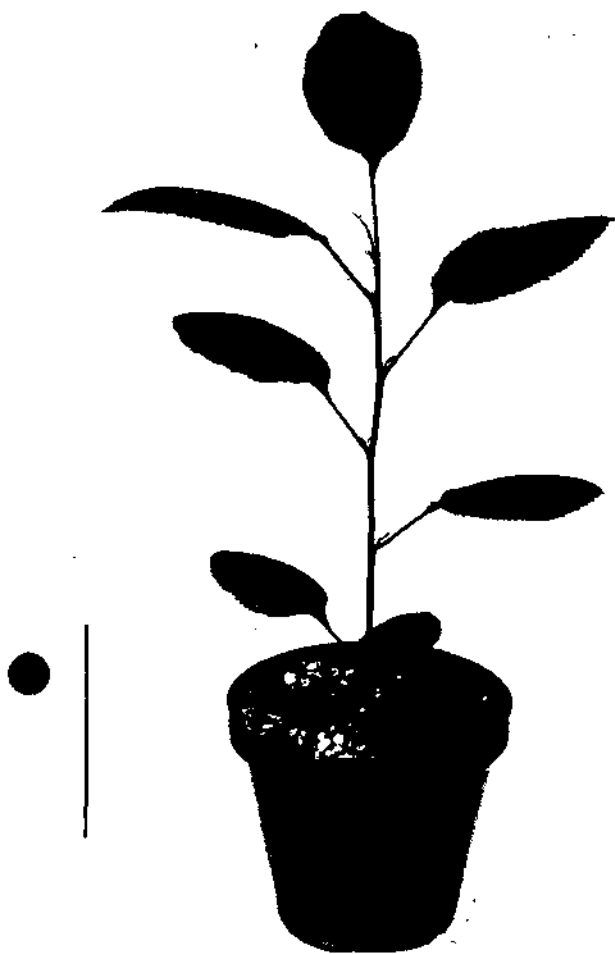


Fig. 3. Jeune plante de Gravenstein sevrée depuis 8 semaines en serre. La barre représente une longueur de 10 cm.

## Résumé

Des cultures de tissus de la variété de pommier Gravenstein (*Malus domestica* Borkh.) ont été réalisées à partir d'extrémités de pousses sur un milieu nutritif de base de MURASHIGE et SKOOG (1962) modifié, contenant 7,5 µM/l de benzyladénine (BA). La formation des racines adventives a été obtenue en cultivant les jeunes pousses en phase de croissance active sur un milieu de LEPOIVRE (1977) renfermant 10 µM/l d'acide indolylbutyrique (AIB) pendant une semaine et en les transférant par la suite sur un milieu nutritif CMS (COLLET, 1985) dépourvu d'AIB. Des plantes enracinées ont ainsi été acclimatées avec succès sur substrat de culture traditionnel.

## Zusammenfassung

Gewebekultur von der Äpfelsorte Gravenstein (*Malus domestica* Borkh.) wurde mit Triebspitzenkultur auf einem veränderten MURASHIGE & SKOOG-Basal-Medium (1962) mit 7,5 µM/l Benzyladenin (BA) durchgeführt. Die Adventivwurzelbildung wurde hervorgerufen durch Subkultur von jungen aktiven Sprossen auf einem LEPOIVRE-Medium (1977) mit 10 µM/l 3-Indolylbuttersäure (IBA) während einer Woche und danach in einer CMS (COLLET, 1985) Nährlösung ohne IBA. Bewurzelte Pflanzen wurden mit Erfolg in gärtnerische Substrate verpflanzt.

## Summary

Tissue cultures of an apple cultivar (*Malus domestica* Borkh. cv. Gravenstein) was achieved by culturing shoot tips explants on a modified MURASHIGE and SKOOG (1962) basal medium supplemented with 7.5 µM/l Benzyladenine (BA). Adventitious roots formation was induced by subculturing young actively growing shoots on a LEPOIVRE medium (1977) with 10 µM/l indolebutyric acid (IBA) for a week and then transferring them to the CMS hormone-free medium (COLLET, 1985). Rooted plantlets were successfully established in soil.

## Bibliographie

- ABBOTT A. J., WHITELEY E., 1976. Culture of *Malus* tissues *in vitro*. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Scientia Horticulturae* 4, 183-189.
- COLLET G. F., 1985. Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Rev. suisse Vitic., Hort., Arboric.* 17, (4) 259-263.
- DUTCHER R. D., POWELL L. E., 1972. Culture of apple shoots from buds *in vitro*. - *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 97, 511-514.
- JAMES D. J., THORSON I. J., 1979. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M9. *J. Hort. Sci.* 54 (4), 309-311.
- JONES O. P., 1967. Effect of Benzyladenine on isolated apple shoots. *Nature* 215, 1514-1515.
- JONES O. P., HOPGOOD M. E., O'FARRELL D. O., 1977. Propagation *in vitro* of M26 apple rootstocks. *J. Hort. Sci.* 52, 235-238.
- JONES O. P., PONTIKIS C. A., HOPGOOD M. E., 1979. Propagation *in vitro* of five apple scion cultivars. *J. Hort. Sci.* 54 (2), 155-158.
- LANE W. D., 1978. Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips. *Plant Science Letters* 13, 281-285.
- LANE W. D., Mc DOUGLAS J. M., 1982. Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. *Can. J. Plant. Sci.* 62, 689-694.
- LUNDERGAN C. A., JANICK J., 1980. Regulation of apple shoot proliferation and growth *in vitro*. *Hort. Res.* 20, 19-24.
- MOSELLA L. Ch., RIEDEL M., JONARO R. et SIGNORET P. A., 1979. Développement *in vitro* d'apex de pêcher (*Prunus persico* Batsch.): possibilités d'application. *C. R. Acad. Sc. Paris, série D.* 289, 1335-1338.
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-479.
- MURASHIGE T., 1974. Plant Propagation through Tissue Cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166.
- OCHATT S. J. and CASO O. H., 1983. *In vitro* meristem culture of M4 apple (*Malus pumila* Mill.). I. Optimal nutrient medium. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 2, 39-48.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE Ph. et BOXUS Ph., 1974. Premiers résultats obtenus dans la culture *in vitro* de méristème apical de sujets porte-greffe de pommier. *Bull. des Recherches agronomiques de Gembloux* 9, 189-192.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE Ph. et BOXUS Ph., 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. *Compte rendu des recherches 1976-1977 et rapports de synthèse de la Station des cultures fruitières et maraîchères - Centre de recherches agronomiques de l'Etat. B 5800 Gembloux (Belgique).*
- SNIR I. and EREZ A., 1980. *In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks. *HortScience* 15 (5), 597-598.
- SRISKANDARAJAH S., MULLINS M. G., 1981. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. *J. Hort. Sci.* 56 (1), 71-76.
- SRISKANDARAJAH S., MULLINS M. G., NAIR Y., 1982. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Science Letters* 24, 1-9.
- WALKEY D. G., 1972. Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Can. J. Pl. Sci.* 52, 1085-1087.
- WELANDER M., 1983. *In vitro* rooting of the apple rootstock M26 in adult and juvenile growth phase and acclimatization of the plantlets. *Physiol. Plant.* 58, 231-238.
- WERNER E. M., BOE A. A., 1980. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. *HortScience* 15 (4), 509-510.
- ZIMMERMAN R. H., BROOME O. C., 1981. Photoglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 106 (5), 648-652.

# Assainissement de la variété de pomme de terre Sangema

## Méthode combinant la thermothérapie *in vitro* et la culture de méristèmes. Premiers résultats

C. L. LÊ et G. F. COLLET, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

### Introduction

Depuis que MOREL et MARTIN (1955) ont montré pour la première fois la possibilité de régénérer des clones de pomme de terre (*S. tuberosum* L.), atteints de maladies à virus, par la culture *in vitro* des extrémités de pousses (méristèmes), de nombreux travaux ont confirmé l'efficacité de cette nouvelle technique d'assainissement qui est alors devenue une méthode de choix pour la reconstitution de nombreuses variétés de pomme de terre porteuses de virus (KASSANIS, 1957; MOREL *et al.*, 1968; PENNAZIO et REDOLFI, 1974; GREGORINI et LORENZI, 1974; MARANI et PISI, 1977).

Toutefois, la réussite de l'élimination des agents pathogènes viraux sur la pomme de terre s'est avérée être fortement influencée d'une part par le type de virus à éradiquer (MOREL *et al.*, 1968; STACE-SMITH et MELLOR, 1968; PENNAZIO, 1971) et d'autre part par l'importance de la taille des méristèmes prélevés sur les plantes malades. Le risque de contamination des fragments de tissus végétaux par les virus s'accroît rapidement avec l'augmentation de la taille des explants mis en culture (HOLLINGS, 1965; STACE-SMITH et MELLOR, 1968; KASSANIS et VARMA, 1967; SIP, 1972; PENNAZIO et REDOLFI, 1974; MARANI et PISI, 1977).

Afin d'améliorer le taux de guérison de plantes atteintes de maladies à virus, certains auteurs ont recours à l'utilisation de substances antimétaboliques permettant ainsi l'inhibition du pouvoir infectieux des virus (NORRIS, 1954; THOMSON, 1956; QUAK, 1961; PENNAZIO, 1973), d'autres ont cherché à associer le traitement à la chaleur (thermothérapie) des plantes mères à la culture de méristèmes (THOMSON, 1956; STACE-SMITH et MELLOR, 1968; MOREL *et al.*, 1968; MELLOR et STACE-SMITH, 1970; SIP, 1972; Mc DONALD, 1973; PENNAZIO, 1971; PENNAZIO et VECCHIATI, 1978; FACCIOLI et RUBIES-AUTONELL, 1982), ou ont pratiqué la thermothérapie soit sur des microboutures cultivées en tube (NOZERAN *et al.*, 1977), soit sur les méristèmes établis *in vitro* (PENNAZIO *et al.*, 1979).

Dans ce travail nous avons tenté de régénérer la variété Sangema infestée de virus X et S de la pomme de terre (PVX et PVS) par la culture de méristèmes provenant de microplantes cultivées *in vitro* avec et sans traitement préalable à la chaleur (thermothérapie), dans le but de créer un stock de base de matériel sain disponible à toute éventuelle diffusion.

Le présent travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'Institut des sciences agronomiques du Burundi (ISABU), le Centre international de la pomme de terre (CIP) et les Sections de virologie et de biologie végétale de la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins.

### Matériel et méthodes

#### Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre essai consiste en tubercules de la variété de pomme de terre Sangema en provenance de Burundi (Afrique centrale); ces tubercules sont, d'après le test immuno-enzymatique ELISA, totalement infectés par les virus X et S de la pomme de terre. Nous avons fait germer quelques tubercules et les avons cultivés en conditions de serre pour constituer des plantes de base servant de matériel de départ à l'ensemble de nos essais.

#### Production de microplantes pour la thermothérapie (Microbouturage *in vitro*)

Des extrémités de pousses feuillées de Sangema prélevées sur des plantes cultivées en serre à la température de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , avec un apport supplémentaire de lumière de  $700 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  (tubes fluorescents AVIVA de Mazda/TF 65 AVI), au niveau des cultures, ont été désinfectées en surface par un passage rapide dans de

**Tableau 1. Composition du milieu CMS pour les pommes de terra (mg/l).**

Macro-éléments		Oligo-éléments		Organiques			
KNO <sub>3</sub>	(1212)	MnSO <sub>4</sub> .1 aq.	(8,4)	KI	(0,83)	Myo-inositol	(100)
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4 aq.	(710)	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	(6,2)	CuSO <sub>4</sub> 5 aq.	(0,25)	Thiamine HCl	(1,0)
MgSO <sub>4</sub> 7 aq.	(370)	ZnSO <sub>4</sub> 7 aq.	(2,87)	NaMoO <sub>4</sub> .2 aq.	(0,25)	Saccharose	20 000
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	(230)	FeSO <sub>4</sub> .7 aq.	(5,56)	CoCl <sub>2</sub> .6 aq.	(0,025)	Agar	7 000
		Na <sub>2</sub> EDTA	(22,4)				

Le pH est ajusté à 5,7 avant autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

l'éthanol à 70%, suivi d'un double trempage de 10 minutes chacun dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5%, additionné de quelques gouttes d'un mouillant de type Teepol. Elles sont ensuite rincées 3 à 4 fois à l'eau stérile et essuyées entre deux feuilles de papier filtre stérile.

Les fragments de tige ainsi préparés sont découpés en tronçons de 1 cm environ (fig. 1), que l'on place dans des tubes de culture de 25 × 150 mm, recevant 15 ml d'un milieu nutritif approprié (CMS, COLLET, 1985) inspiré de celui de MURASHIGE ET SKOOG (1962) (tabl. 1).

Les tubes de culture sont placés dans une chambre de croissance (type Weiss-12'E/IU-PK) où les conditions de photothermopériodicité sont: 16 heures de lumière (1800 μW/cm<sup>2</sup> [tubes fluorescents Sylvania Cool White F96 T12/CW/WHO/235/1] de 215 W chacun) au niveau des tubes de culture par cycle de 24 heures; une température de 23 ± 1°C le jour et de 18 ± 1°C la nuit.

Après 4 semaines de culture, les jeunes microplantes développées à partir des premiers fragments (fig. 2) sont retirées des tubes et fragmentées à leur tour en 5 ou 6 segments, chacun pourvu d'un bourgeon axillaire (microboutures) qui sont repiqués sur un milieu nutritif neuf et de même composition que celui mentionné plus haut afin de poursuivre leur croissance et

ainsi fournir du matériel pour d'autres cycles de reproduction (NOZERAN *et al.*, 1977), cela en vue d'obtenir rapidement un stock de plantes de base nécessaires à l'opération de traitement à la chaleur *in vitro*.

### Thermothérapie *in vitro*

Les microboutures fraîchement repiquées renfermant chacun un bourgeon axillaire sont cultivées en enceinte climatisée (cf. Microbouturage *in vitro*) pendant deux semaines jusqu'au stade de 3 à 4 feuilles et sont ensuite transférées dans un incubateur de taille réduite (104 × 48 × 84 cm) dont la température initiale est de 26 ± 1°C, puis graduellement élevée pendant une semaine jusqu'à 37 ± 0,5°C au niveau des microboutures (mesures effectuées à l'aide d'un thermo-



Fig. 1. Explant initial prélevé sur une pousse de pomme de terre. (Photo Lè)

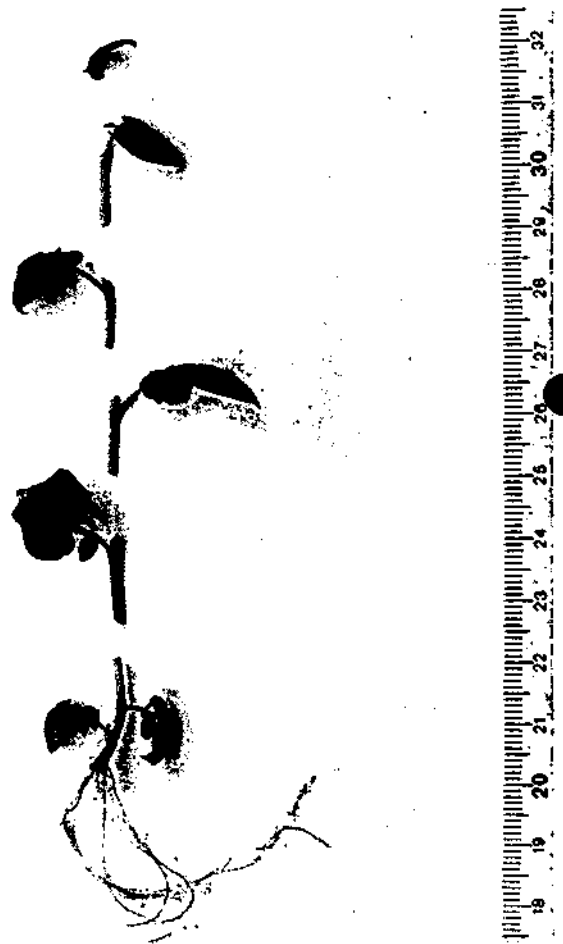


Fig. 2. Microplante de pomme de terre coupée en segments pour un nouveau repiquage. (Photo Lè)

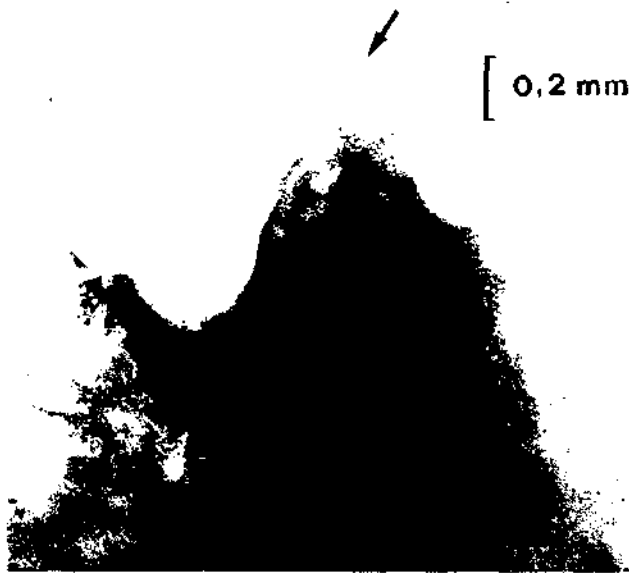


Fig. 3. Bourgeon apical montrant le dôme méristématique (flèche) entouré de deux ébauches foliaires. (Photo Lè)

couple placé à l'intérieur des tubes de culture). Cette température est maintenue pour une durée allant de 0 à 18 jours, périodes nécessaires à l'inhibition du pouvoir infectieux des agents pathogènes, tandis que se poursuit la croissance végétale. Les cultures sont éclairées à raison de 16 heures/jour ( $1200 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , tube fluorescent Philips de type blanc : TL E32W/33). L'humidité relative de 70% dans l'incubateur est assurée.

### Culture de dômes méristématiques

A la sortie du traitement à la chaleur, on procède à l'extraction des dômes méristématiques (apicaux et axillaires) sur les microboutures et à leur culture *in vitro* :

- sous une loupe binoculaire (grossissement 25 fois), éclairée au moyen de fibres optiques, on élimine d'abord les très jeunes feuilles enveloppantes du bourgeon avec une fine aiguille afin de dégager le méristème qui apparaît sous la forme d'un dôme réfringent (fig. 3) ; puis à l'aide d'un scalpel muni d'une lame chirurgicale (N° 11), on isole la partie extrême du bourgeon, avec en général une ou deux ébauches de feuille, dont la dimension varie entre 200 et 300  $\mu$ , en pratiquant deux entailles en forme de V vers la base du dôme méristématique. Ensuite on transfère rapidement le morceau de tissu dans un tube de culture de 10 x 100 mm contenant un milieu nutritif composé des macro-éléments de MOREL et MULLER (1964), des micro-éléments de MURASHIGE et SKOOG (1962), de Thiamine (0,1 mg/l) de Pyridoxine (0,5 mg/l), d'acide Nicotinique (0,5 mg/l), de Myo-inositol (100 mg/l), d'acide Gibbéréllique (0,1 mg/l), de 2% de saccharose et de 0,6% d'Agar (Difco Bacto Agar). Le pH du milieu est à 5,7 avant autoclavage ;

- après 8 à 10 semaines de cultures, les massifs méristématiques ont donné naissance à des plantules de 1 à 2 cm de hauteur que l'on a pris soin de repiquer sur le milieu nutritif CMS afin de leur permettre de se régénérer complètement.

### Sevrage et culture en serre

De jeunes microboutures issues des méristèmes de 1 à 2 cm de longueur environ sont repiquées dans des mottes, petits cubes de 3 cm de côté renfermant un mélange de terreau du commerce et de sable dans une proportion de 4 : 1. Les mottes ainsi préparées sont disposées dans des caisses à raison de 70 à 80 pièces chacune. Un traitement anticryptogamique au moyen du fongicide M 555 à la concentration de 0,2% a été également appliqué sur l'ensemble des microboutures avant leur mise à l'étouffée pour une durée de 72 heures. La température est de 25°C de jour et de 20°C de nuit avec un éclairage de 680  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  (tubes fluorescents Mazda Aviva TF 65 AV1) pendant 14 heures par jour.

Lorsque les plantes atteignent une taille de 8 à 10 cm environ, on les transfère dans des pots de 8 cm de diamètre et on les place en serre pour leur permettre de poursuivre leur cycle complet de végétation.

### Contrôle virologique

La détermination de la présence des virus X et S dans le matériel végétal régénéré est réalisée à différents stades de croissance (plantes en tube ; plantes adultes ; tubercules) au moyen des contrôles effectués au microscope électronique et du test immunoenzymatique ELISA, mis au point par GUGERLI (1978, 1979).

### Résultats et discussion

Les premiers résultats obtenus au cours de différentes tentatives de guérison viennent confirmer en partie les données des travaux antérieurs. En effet, comme le montre le tableau 2, lorsque les microboutures ne sont pas soumises à une période de haute température, aucun des échantillons issus de ces méristèmes ne permet la reconstitution de plantes saines. Ce manque d'efficacité contre les agents pathogènes a

Tableau 2. Influence du traitement par thermothérapie sur l'élimination des virus X et S par culture de méristèmes de la variété de pomme de terre Sengema.

Nombre de jours à 37,5°C	Méristèmes* mis en culture	Plantes* développées	Plantes* débarrassées de virus			
			X %	S %	%	%
0	10	5	-	0	-	0
6	14	8	2	25	-	0
14	12	7	4	57	2	30
18	16	7	7	100	7	100

\* Moyenne obtenue au cours de deux essais.



Fig. 4. Plant de pomme de terre Sangema assaini (à gauche) et infecté de virus X et S (à droite). (Photo Lè)

aussi été remarqué par MOREL et MARTIN (1968) qui ont fait état de l'impossibilité de régénérer des clones de pomme de terre atteints de virus X et S (moins de 1% de réussite) par un prélèvement direct des méristèmes sur des sujets malades ou par une simple thermothérapie du matériel infecté. Aussi ont-ils suggéré l'association d'un traitement de thermothérapie à la culture *in vitro* des méristèmes afin de permettre l'obtention d'un plus fort pourcentage de plantes indemnes de viroses.

Existe-t-il des conditions limites garantissant le succès dans cet assainissement ? Une comparaison de nos premiers résultats à ceux de la bibliographie montre qu'une température minimale est requise indépendamment de la durée. Ainsi une marge de température entre 33 et 37°C, même après 6 à 8 semaines, ne permet pas un assainissement complet (STACE-SMITH et MELLOR, 1968 : 88% de son cultivar « White Rose » sont débarrassés du virus X, 63% du virus S).

SIP (1972) constate aussi sur 2 autres variétés « Jara » et « Raika » que dans ces conditions 125 jours ne suffisent pas à l'élimination complète du virus S. PENNAZIO (1971) entre 33 et 35°C sur un 4<sup>e</sup> cultivar « Piatellina » n'a que 6% de succès après 20 jours dans l'élimination de ces viroses. Craignant des températures supérieures à 35°C, qui diminuent le pourcentage de méristèmes survivants, PENNAZIO en 1979 préconise une durée plus longue (42 jours) à 32°C seulement, mais n'enregistre que 22% de réussite. Par contre Mc DONALD (1973) prétend éradiquer les virus X et S des variétés « Duke of York » et « Royal Kidney » en 23 jours à 32-35°C, mais sans donner un taux de réussite, tandis que FACCIOLO *et al.* (1982) débarrassent pour 92% de leurs cultures les cultivars « Kennebec » et « Majestic » de leur virus X en 27 jours à 35°C. S'il n'est pas impossible qu'il faille aussi tenir compte de différences variétales, ce qui est en cours de vérification, il semble bien qu'une combinaison critique d'une température suffisante et d'une certaine durée assure une nette amélioration du taux de guérison de tissus maintenus en croissance malgré la haute température (37,5°C) et les fortes pertes qui en résultent (50%) (tabl. 2). Ces premiers résultats montrent qu'après 18 jours, 7 plantes sur 7 sont débarrassées de

leurs viroses (PVX et PVS). Etant donné la grande facilité de multiplication *in vitro* des pommes de terre, ce modeste résultat nous a permis d'assurer l'assainissement du cultivar Sangema (fig. 4), dont plus aucun exemplaire n'était indemne des viroses PVX et PVS, dans le respect de sa conformité contrôlée par des cultures en pleine terre.

## Conclusion

Au cours de ces essais, il nous est permis de considérer que :

- l'action exercée par l'élévation de la température sur la plante mère a pour effet d'inhiber la prolifération des agents pathogènes (virus X et S) sans pouvoir les éliminer ;
- seules les parties nouvellement formées pendant le traitement à la chaleur en sont dépourvues ;
- notre technique comprenant la régénération *in vitro* de plantes à partir des méristèmes prélevés sur des microplantes ayant subi préalablement un traitement de thermothérapie est une contribution pratique et commode pour l'assainissement des clones de pomme de terre gravement atteints de maladies à virus.

Des travaux ultérieurs effectués sur d'autres variétés de pomme de terre (Hermès, Andigena) sont en cours de réalisation afin de vérifier l'efficacité de notre procédé d'assainissement.

## Remerciements

Nos remerciements sont adressés au Dr P. GUGERLI pour ses travaux de contrôle virologique du matériel végétal régénéré, à M<sup>me</sup> C. BERNEY et M. D. THOMAS pour leur collaboration à la culture *in vitro*, à M. C. STAUDMANN pour ses opérations de sevrage et de culture des plantes en serre.

## Résumé

Dans cet article nous décrivons une technique d'élimination de virus X et S des plantes de pomme de terre par la culture des méristèmes prélevés sur des microplantes qui ont subi préalablement un traitement à la chaleur *in vitro*. Il est possible d'envisager, en utilisant cette méthode, l'obtention du matériel sain, de façon commode, dans le but de constituer un stock de plantes de la variété Sangema exemptes de virus.

## Summary

A technique for freeing potato plants from potato virus X and S (PVX, PVS) by culturing meristem tips excised from *in vitro* heat treated minicuttings is described. Using the method it is possible to obtain pathogen-free material in order to produce virus-free stock of the potato variety Sangema.

## Zusammenfassung

Eine Methode zur Eliminierung der X- und S-Viren (PVX, PVS) durch Kultur von Kartoffelmeristemspitzen von *in vitro* wärmebehandelten Micropflanzen wird beschrieben. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich virusfreies Material zu gewinnen zur Schaffung eines virusfreien Bestandes der Kartoffelsorte Sangema.

## Bibliographie

- COLLET G. F., 1985. Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Rev. suisse Vitic., Hortic., Arboric.* 17. Sous presse.
- FALCIOLI G., RUBIES-AUTONELL C., 1982. PVX and PVY distribution in potato meristem tips and their eradication by the use of thermotherapy and meristem tip culture. *Phytopath. Z.* 103, 66-76.
- GREGORINI G., LORENZI R., 1974. Meristem-tip culture of potato plants as a method of improving productivity. *Potato Res.* 17, 24-33.
- GUGERLI P., 1978. The detection of two potato viruses by enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). *Phytopath. Z.* 92, 51-56.
- GUGERLI P., 1979. Le test immuno-enzymatique (ELISA) et son application pour le diagnostic rapide des viroses de la pomme de terre. *Rev. suisse Agric.* 11 (6), 253-260.
- HOLLINGS M., 1965. Disease control through virus-free stock. *Ann. Rev. Phytopath.* 65, 367-396.
- KASSANIS B., 1957. The use of tissue cultures to produce virus-free clones from infected potato varieties. *Ann. Appl. Biol.* 45, 3, 422-427.
- KASSANIS B., VARMA A., 1967. The production of virus-free clones of some British potato varieties. *Ann. Appl. Biol.* 59, 447-450.
- MARANI F., PISI A., 1977. Meristem tips culture and vegetative propagation in potato. *Acta Horticulturae* 78, 415-424.
- MC DONALD D. M., 1973. Heat treatment and meristem culture as a means of freeing potato varieties from viruses X and S. *Potato Res.* 16, 263-269.
- MELLOR F. C., STACE-SMITH R., 1970. Virus strain differences in eradication of potato viruses X and S. *Phytopath.* 60, 1587-1590.
- MOREL G., MARTIN C., 1955. Guérison de pommes de terre atteintes de maladies à virus. *C. R. Acad. Agric. France* 44, 472-474.
- MOREL G., MARTIN C., MULLER J.-F., 1968. La guérison des pommes de terre atteintes de maladies à virus. *Ann. Physiol. Vég.* 10, 2, 113-139.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- NORRIS D. O., 1954. Development of virus-free stock of green mountain potato by treatment with malachite green. *Austr. J. Agric. Res.* 5, 658-663.
- NOZERAN R., BANCILHON-ROSSIGNOL L., GREANAN S., 1977. Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *C. R. Acad. Sc. Paris, Série D.* 285, 37-40.
- PENNAZIO S., 1971. Terapia di virosi della patata (*Solanum tuberosum* L.): coltura di apici meristematici abbinata a termoterapia. *Riv. ortoflorofruit.* 55, 446-452.
- PENNAZIO S., 1973. Effects of four antimetabolites on PVX inhibition in infected potato tips cultured on artificial substrate. *Riv. Potol. veg.* 9, 3-10.
- PENNAZIO S., REDOLFI P., 1974. Potato virus X eradication in cultured potato meristem tips. *Potato Res.* 17, 333-335.
- PENNAZIO S., VECCHIATI M., 1978. Potato virus X eradication from potato meristem tips held at 30°C. *Potato Res.* 21, 19-22.
- PENNAZIO S., VECCHIATI M., DE VIRGILIO A., 1979. Eliminazione del virus X della patata mediante termoterapia abbinata alla coltura di apici vegetativi. *Riv. ortoflorofruit. It.* 63, 103-113.
- QUAK F., 1961. Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus-free plants. *Adv. Hort. Sci. Appl.* 1, 144-148.
- SIP V., 1972. Eradication of potato viruses A and S by thermotherapy and sprout tip culture. *Potato Res.* 15, 270-273.
- STACE-SMITH R., MELLOR F. C., 1968. Eradication of PVX and PVS by thermotherapy and axillary bud culture. *Phytopath.* 58, 199-203.
- THOMSON A. D., 1956. Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potatoes from virus Y. *Nature* 177, 709.

## Chroniques

### Stock grainier dans le sol

Dans une culture annuelle, plus de 80% des adventices sont des plantes annuelles, c'est-à-dire des espèces qui bouclent leur cycle biologique de la graine à la graine en une année, voire moins. Certaines pratiques particulières comme le « non-labour » ou la monoculture de maïs favorisent une augmentation des espèces bisannuelles ou pérennes, mais il ne s'agit que d'un aspect marginal qui modifie encore peu le spectre biologique global de nos cultures.

Une espèce annuelle c'est d'abord une énorme masse de semences enfouies dans le sol dont une proportion très restreinte, souvent moins de 10%, peut s'exprimer chaque année. Ce que l'on voit n'est en quelque sorte que le sommet de l'iceberg, et ne représente qu'une phase éphémère de la vie de la plante: la majeure partie de la biomasse se situe sous terre et représente un potentiel d'infestation considérable, puisqu'un champ labouré renferme facilement 50 à 100 millions de graines viables par hectare.

La lutte contre les mauvaises herbes est une nécessité que ne conteste personne, pas même le plus convaincu des écologistes. Toutefois, une lutte raisonnée ne consiste pas à utiliser l'herbicide le plus performant au moment le plus opportun. D'après une enquête récente menée en Allemagne, les désherbages des céréales d'automne sont souvent inoppor-

tuns, et dans le seigle les traitements ne sont souvent pas rentables dans la moitié des cas. On peut donc légitimement, dans ces situations, se poser la question de l'opportunité du désherbage ou de l'intensité de la lutte qui est faite aux mauvaises herbes. Cependant, ces observations sont faites a posteriori, et s'il est possible de dire à la récolte que le traitement n'aurait pas été nécessaire, il est beaucoup plus difficile de prendre, au début de la culture, la décision de ne pas traiter. Dans certains cas, il est possible cependant de choisir une voie médiane, et de renoncer à un traitement en prélevée pour n'intervenir qu'en post-levée lorsque cela paraît indispensable. Là encore cependant, la décision est difficile à prendre, car elle suppose que l'on connaît des seuils de nuisibilité applicables pour chaque culture en fonction des diverses adventices présentes. On connaît bien sûr certaines valeurs expérimentales de seuils de nuisibilités obtenues sur des modèles simples d'infestation monospécifique. Or, une infestation n'est en principe pas monospécifique, et si elle l'est, c'est qu'une erreur antérieure a été commise! Dans la plupart des cas pratiques, il est donc bien difficile d'avoir à disposition des chiffres précis permettant de prendre, avec une sécurité absolue, la décision de ne pas traiter. Une telle décision repose sur une bonne connaissance de la parcelle pour l'ensemble de l'assolement et ne peut certainement pas être prise de cas en cas, en ne raisonnant que sur un seul élément d'un ensemble complexe. C'est à ce niveau que l'étude des stocks grainiers peut apporter une information complémentaire intéressante.

# Régénération de la variété de pomme de terre Hermes par thermothérapie et culture de méristèmes

C. L. LÉ, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

## Introduction

Dans un article précédent (LÉ et COLLET, 1985), nous avons montré que la culture de méristèmes apicaux de microplantes de pomme de terre qui ont subi préalablement un traitement à la chaleur *in vitro* a permis de reconstituer des clones sains de la variété Sangema, infectée de virus X et S (PVX, PVS) de la pomme de terre.

Afin de vérifier la validité de la technique, l'étude a été reprise sur la variété de pomme de terre Hermes qui a été récemment introduite dans l'assortiment suisse (GEHRIGER, 1985), et dont l'état sanitaire des plants de base à l'importation n'a pu donner satisfaction durant ces dernières années (REUST, 1985).

## Techniques expérimentales

Des tubercules de la variété de pomme de terre Hermes en provenance d'Autriche, contaminés par le virus S de la pomme de terre (PVS) d'après le test préliminaire immuno-enzymatique ELISA, ont été utilisés dans cet essai.

La production de microplantes *in vitro* servant de matériel de base pour l'ensemble de nos essais ainsi que le procédé d'assainissement sont effectués selon la technique décrite précédemment (LÉ et COLLET, 1985). Les microboutures de pomme de terre au stade de 3 à 4 feuilles sont d'abord placées dans un incuba-

teur dont la température initiale est de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , puis progressivement élevée pendant une semaine jusqu'à  $37 \pm 5^\circ\text{C}$  (température observée à l'aide d'un thermocouple placé à l'intérieur des tubes de culture). Cette température est ensuite maintenue pendant une période de 0 à 18 jours, durée nécessaire à l'inhibition du pouvoir infectieux de l'agent pathogène, alors que se poursuit la croissance des jeunes plantes.

L'appréciation de l'état sanitaire des plantes assainies est réalisée à différents stades de développement (plantes régénérées *in vitro*, plantes adultes) au moyen du test immuno-enzymatique ELISA mis au point par GUGERLI (1979).

## Résultats et discussion

### Survie des méristèmes

A l'exception des échantillons qui ne sont pas soumis à l'action exercée par l'élévation de la température où l'on enregistre un taux de croissance élevé, tous les autres traitements présentent une forte diminution du taux de survie des méristèmes avec l'augmentation de la durée de traitement à la chaleur (cf. tabl. 1). On constate en effet qu'après 7 jours, 52% des méristèmes installés *in vitro* sont incapables de se développer

Tableau 1. Influence de la durée de traitement par la chaleur (thermothérapie) sur l'élimination du virus S (PVS) par culture de méristèmes de la variété de pomme de terre Hermes.

Nombre de jours à $37,5^\circ\text{C}$	Méristèmes établis* <i>in vitro</i>	Plantes développées*		Plantes non développées*		Plantes exemptes* de virus S	
0	20	15	(75%)	5	(25%)	0	(0%)
7	25	12	(48%)	13	(52%)	7	(60%)
14	25	10	(40%)	15	(60%)	8	(80%)
18	25	8	(30%)	17	(68%)	8	(100%)

\* Moyenne obtenue au cours de deux essais.

pour former de jeunes plantules. Cette perte de la capacité de régénération augmente (60%) lorsqu'on prolonge la période de haute température au-delà de sept jours. Ces observations sont confirmées par les travaux de PENNAZIO (1979) et par LÉ et COLLET (1985).

L'inhibition de la croissance des méristèmes se manifeste en général soit par une nécrose précoce du tissu fraîchement installé, entraînant la mort de celui-ci après quelques jours de culture, soit par un retard du développement des cellules méristématiques, phénomène conduisant tout d'abord à un arrêt temporaire de la mise en place de nouvelles structures végétatives, et ensuite à la perte totale du pouvoir de régénération du massif primordial.

### Développement *in vitro*

La reprise de croissance des méristèmes ayant subi un traitement à la chaleur n'a lieu qu'après 4 à 6 semaines de culture, contrairement à ceux qui sont cultivés à la température ambiante où l'on observe une avance de 15 à 20 jours au moins.

Au cours des 30 premiers jours qui suivent le début de la réacquisition de l'activité des méristèmes, on assiste à la mise en place d'un massif de cellules qui évolue lentement et donne donc naissance à une nouvelle pousse présentant des caractères primitifs (fig. 1). Cet aspect archaïque dû à une activité prolifératrice accrue des cellules à vocation embryonnaire s'estompe complètement après le premier repiquage *in vitro* qui a lieu pendant la 8<sup>e</sup> semaine de culture : des feuilles entières bien développées rappelant l'état juvénile des plantes issues de semis viennent remplacer les feuilles écailles; l'allongement des entrenœuds, à la base desquels des bourgeons axillaires sont bien reconnaissables ainsi que le développement du système racinaire, étape indispensable au recouvrement d'une vie autonome, font apparition au bout de 10 semaines *in vitro* pour les méristèmes ne subissant pas de traitement à la chaleur et de 12 à 14 semaines pour ceux portés pendant une certaine période à haute température.

### Élimination du virus S

Comme le montre le tableau I, l'élimination du virus S de la pomme de terre (PVS) sur la variété Hermes a été fortement influencée par la durée de traitement à la chaleur que l'on fait subir aux microboutures *in vitro*.

En effet, lorsque les échantillons sont traités selon notre procédé (LÉ et COLLET, 1985) et que la période de haute température est portée à 7 jours, 60% des méristèmes développés *in vitro* sont débarrassés du virus S (PVS) : ce taux de réussite augmente fortement si l'on maintient les microboutures plus longtemps encore (14 jours et plus) à température élevée. Par contre, la suppression de la période défavorable à la prolifération de l'agent pathogène ne peut en aucun cas permettre la reconstitution de plantes saines. Ces résultats évoquent ceux obtenus par STACE-SMITH et



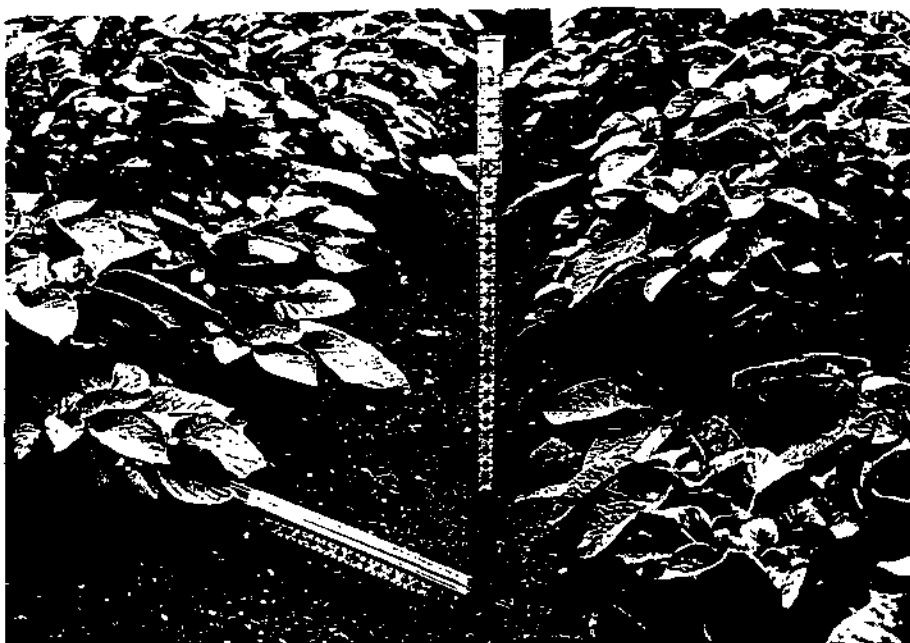
Fig. 1. Jeune plante de pomme de terre Hermes issue de méristème, après 8 semaines de culture. La barre représente une longueur de 1 cm.

MELLOR (1968) chez le cultivar «White Rose» et récemment par LÉ et COLLET (1985) chez le cultivar «Sangema». Chez ce dernier, il faut noter que l'effet de l'élévation de la température sur l'inhibition du pouvoir infectieux des agents pathogènes ne débute qu'au 14<sup>e</sup> jour, débarrassant près de 30% des méristèmes de leurs virus, alors que chez la variété Hermes, cette action a lieu, par contre, déjà après une semaine de traitement thermique assurant un taux de réussite qui est deux fois plus élevé. Aussi on est en droit de penser que la présence du fait d'un seul type de virus dans le matériel Hermes ainsi que la nature même de ce cultivar pourraient être à l'origine d'une certaine sensibilité particulière à des conditions thermothérapeutiques, permettant ainsi l'élimination rapide de la maladie.

### Sevrage et culture en serre

L'acclimatation selon notre procédé (LÉ et COLLET, 1985) a permis d'obtenir plus de 95% de plantes viables lors du transfert du milieu *in vitro* au milieu terreux conventionnel sur l'ensemble de nos essais. Il convient de signaler que les plantes régénérées *in vitro*, une fois transférées en condition de culture traditionnelle, ont évolué normalement (fig. 2) et n'ont présenté aucune modification morphologique.

Fig. 2. Plantes de pomme de terre Hermes cultivées en serre.



## Conclusion

Nos résultats montrent que la régénération des clones de pomme de terre de la variété Hermes est conditionnée par l'application d'une période de haute température. Pour cela, il est d'une importance capitale de :

- soumettre d'abord les microboutures en phase de croissance à la température de 37,5°C, cela pendant 7 jours au moins ;
- prélever ensuite les méristèmes nouvellement formés afin de reconstituer des individus entièrement débarrassés de leur virus S (PVS) sur milieu de culture artificiel.

## Remerciements

Nos remerciements vont au Dr G. F. COLLET pour ses précieux conseils, au Dr P. GUGERLI et M<sup>lle</sup> S. BONNARD pour les travaux de contrôle virologique du matériel régénéré, à M<sup>lle</sup> I. CORDEY et M. D. THOMAS pour leur collaboration à l'assainissement *in vitro*, à M. C. STROUDMANN pour ses opérations d'acclimatation et de culture des plantes en serre.

## Bibliographie

- GEHRIGER W., 1985. Liste officielle suisse des variétés de pomme de terre 1986. *Rev. suisse Agric.* 17 (6), 311-316.
- GUGERLI P., 1979. Le test immuno-enzymatique (ELISA) et son application pour le diagnostic rapide des viroses de la pomme de terre. *Revue suisse Agric.* 11 (6), 253-260.
- LE C. L., COLLET G. F., 1985. Assainissement de la variété de pomme de terre Sangema — Méthode combinant la thermothérapie *in vitro* et la culture de méristèmes — Premiers résultats. *Rev. suisse Agric.* 17(4), 221-225.
- PENNAZIO S., VECCHIATI M., DE VIRGILIO A., 1979. Eliminazione del virus X della patata mediante termoterapia abbinata alla coltura di apici vegetativi. *Riv. ortoflorofrutt. It.* 63, 103-113.
- REUST W., 1985. Communication personnelle. RAC. Changins.
- STACE-SMITH R., MELLOR F. C., 1968. Eradication of PVX and PVS by thermotherapy and axillary bud culture. *Phytopath.* 58, 199-203.

## Résumé

On démontre ici l'action conjuguée d'une période de haute température *in vitro* (thermothérapie) et de la culture de méristèmes dans le but de débarrasser le virus S de la pomme de terre (PVS) sur la variété Hermes.

## Summary

The combined action of *in vitro* heat treatment period (thermotherapy) and meristem culture is demonstrated here in order to free the potato variety Hermes from potato virus S (PVS).

## Zusammenfassung

Der kombinierte Einfluss einer Periode mit erhöhter Temperatur *in vitro* (Thermotherapie) und der Meristemkultur der Kartoffelsorte Hermes, zur Eliminierung des Virus S (PVS), wird beschrieben.

# Multiplication *in vitro* de l'Hysope (*Hyssopus officinalis* L.)

C. L. LÉ, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

## Introduction

Dans la dernière décennie, l'intérêt d'utiliser la culture *in vitro* pour améliorer la qualité des végétaux économiquement importants a été perçu favorablement par des milieux professionnels de l'agriculture (MANTELL et SMITH, 1983; GEORGE et SHERRINGTON, 1984).

L'application de cette nouvelle technologie a en effet permis de développer des moyens de production à grande échelle pour de nombreuses espèces ornementales (HARNEY, 1982), agronomiques (CONGER, 1981) et forestières (BAJAJ, 1986), avec l'assurance d'une parfaite conformité des plantes-filles aux caractères sélectionnés des parents.

Dans le cas de l'Hysope (*Hyssopus officinalis* L.), une espèce pérenne des régions méditerranéennes dont l'huile essentielle est fortement demandée par les industries alimentaires et pharmaceutiques (SIMON *et al.*, 1984), il serait intéressant de pouvoir reproduire des clones sélectionnés pour leur teneur élevée en matière active, étant donné leur faible taux de multiplication par la méthode traditionnelle (REY, 1986).

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre essai consiste en plantes-mères sélectionnées, pour leur richesse en matière active, par le Centre d'arboriculture et d'horticulture des Fougères (REY, 1986).

### Désinfection

Les explantats comportant des extrémités de tige en croissance active de 2 à 3 cm de longueur sont désinfectés superficiellement par un passage rapide dans l'éthanol à 70% pendant quelques secondes, suivi de deux trempages de 20 minutes chacun, d'abord dans de l'hypochlorite de sodium à 0,8%, puis dans une solution de Kohrsolin® à 3%. Les explantats sont

ensuite rincés trois fois à l'eau stérile et maintenus dans une solution d'anti-oxydant composée de 1% d'acide ascorbique et 1% d'acide citrique, jusqu'au moment de la mise en tube de culture.

### Préparation des explantats

Après désinfection, les extrémités de tige sont alors essuyées entre deux feuilles de papier filtre stérile et sont rafraîchies à leur base de façon à obtenir des explantats dont la taille n'excède pas 1 cm de longueur; on les place ensuite dans des tubes de culture de 25 mm x 150 mm, recevant chacun 15 ml de milieu nutritif approprié aux différentes étapes de culture (fig. 1).

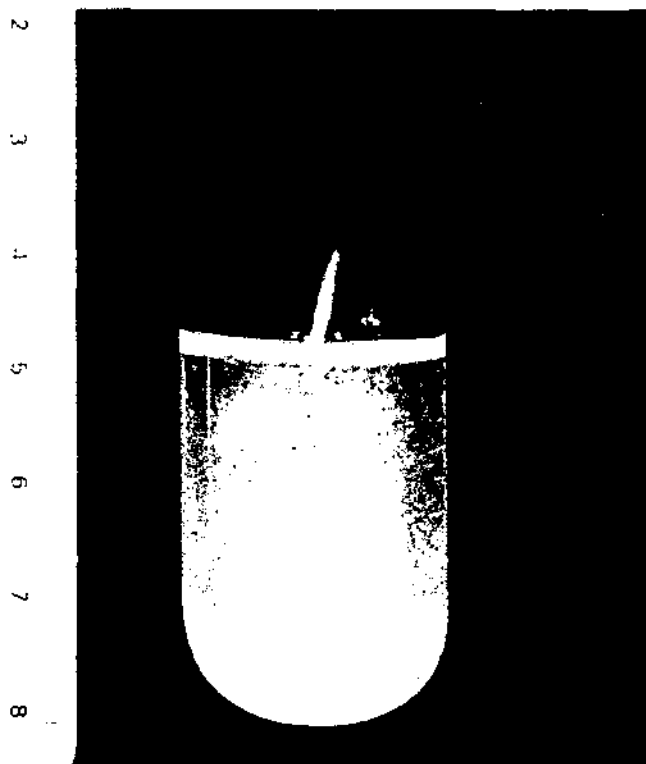


Fig. 1. Explantat initial composé d'extrémité de tige en phase d'établissement.

## Milieux de culture

Le milieu nutritif de base se compose de sels minéraux de MURASHIGE ET SKOOG (1962) avec du FeNaEDTA en remplacement de Na<sub>2</sub>EDTA et FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O à raison de 40 mg/l, 3 % de saccharose, 0,7 % d'agar (Difco Bacto-Agar), 1,0 mg/l de thiamine, 0,5 mg/l de pyridoxine, 0,5 mg/l d'acide nicotinique et 100 mg/l de myo-inositol.

**Etablissement:** Pour la phase d'établissement, on ajoute au milieu de base 4,44  $\mu$ M (1 mg/l) de benzyladénine (BA), 1  $\mu$ M (0,2 mg/l) d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) et 0,57  $\mu$ M (0,2 mg/l) d'acide gibbéréllique (GA<sub>3</sub>).

**Multiplication:** Dans le but d'induire la formation de nouveaux bourgeons, les explantats sont placés, après 5 semaines en établissement, sur un milieu de base renfermant différentes concentrations de régulateurs de croissance, à savoir:

- Benzyladénine (BA): 4,44 ou 44,44  $\mu$ M (1 ou 10 mg/l);
- Acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA): 1,14  $\mu$ M (0,2 mg/l);
- ou Acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB): 0,49  $\mu$ M (0,1 mg/l);
- ou Acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA): 0,53  $\mu$ M (0,1 mg/l).

**Enracinement:** Trois différents modes de traitement ont été testés dans cet essai:

- TE: milieu ne contenant pas de régulateur de croissance;
- prétraitement inductif bref (PIB): de jeunes pousses d'hysope de 1 à 2 cm environ, en pleine croissance active, sont placées sur un milieu agarisé contenant de l'acide de  $\beta$ -indolylacétique (AIA) à la concentration de 300  $\mu$ M (52,5 mg/l) pendant 5 heures précédant le transfert sur un milieu minéral dépourvu de régulateur de croissance selon COLLET (1985), et sont maintenues par la suite à l'obscurité pendant 72 heures, à la température de 28 °C (LÉ, 1985) pour favoriser la mise en place des foyers méristématiques évoluant en primordia racinaires. A la sortie du traitement thermique, les cultures sont transférées en photopériode de 16 h, pour permettre aux microboutures d'émettre leurs racines adventives;
- prétraitement inductif long (PIL): il consiste à maintenir les microboutures sur un milieu enrichi de 0,49  $\mu$ M (0,1 mg/l) d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) pendant une semaine et à les transférer sur le milieu CMS (COLLET, 1985). Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,7 avant autoclavage avec du NaOH ou HCl à 0,1 N; les milieux sont ensuite autoclavés à 121 °C (1,1 bar) pendant 15 minutes.

## Conditions de culture *in vitro*

Les cultures sont placées dans une enceinte climatisée à la température de 23 °C  $\pm$  1 °C de jour et de 18 °C

$\pm$  1 °C de nuit, et sont éclairées pendant 16 heures par cycle de 24 heures. L'éclairage dont l'intensité est de 850  $\mu$ W/cm<sup>2</sup> au niveau des tubes de culture est fourni par des tubes fluorescents (Mazda AVIVA TF 65/AVI). L'humidité relative a été maintenue à 55 %  $\pm$  5 % dans la chambre de culture.

## Sevrage

Les microplantes d'Hysope racinées *in vitro* sont retirées des tubes de culture et repiquées dans un substrat horticole traditionnel composé de tourbe (TKS 1) et de sable (1:1), après une période de préacclimatation allant de 48 à 72 h, durée pendant laquelle les microplantes sont ramenées progressivement d'une atmosphère confinée à un environnement normal de culture en conditions de serre.

## Résultats et discussion

### Etablissement

Lors des premières installations *in vitro*, nous avons pu observer un brunissement marqué des tissus fraîchement préparés, malgré un traitement préventif à l'antioxydant (ac. ascorbique + ac. citrique) appliqué à la sortie de la désinfection. Ce symptôme est apparu, sur certaines cultures, dès les premières heures qui suivent leur mise en place sur le milieu d'établissement et a provoqué par la suite la coloration du substrat de culture et l'arrêt de croissance des explantats. L'oxydation des métabolites secondaires libérés dans le milieu de culture lors de la préparation des explantats pourrait être à l'origine de cette pollution du milieu de culture. Aussi, pour éviter cette altération du substrat nutritif le rendant impropre à la culture, nous avons maintenu les explantats d'Hysope à l'obscurité pendant les trois premiers jours de culture et les avons transférés plusieurs fois sur un milieu neuf mais de même composition que celle utilisée en établissement, jusqu'à ce que le phénomène de coloration du milieu de culture disparaisse totalement et que la reprise de croissance des extrémités de tige commence à se manifester réellement.

BROOME et ZIMMERMANN (1978) ont signalé le brunissement des tissus de divers *Rubus* à la mise en culture, même après les avoir traités avec des substances antioxydantes telles que l'acide ascorbique, l'acide citrique ou encore de l'hydrochlorure de cystéine, et seuls les transferts successifs des explantats sur un nouveau milieu après 1 ou 2 jours de culture, ont effectivement corrigé ce défaut. RIPLEY et PREECE (1986) ont également fait état des précautions à prendre dans la préparation des explantats d'*Euphorbia* (action favorable du transfert des apex fraîchement installés sur des milieux neufs après 1 à 5 jours), qui diminuent l'exsudation des explantats à un seuil supportable et assurent ainsi un taux de survie de 100% de leurs cultures.

**Tableau 1. Effets de diverses combinaisons de régulateurs de croissance sur la prolifération des nouvelles pousses feuillées chez l'Hysope (*Hyssopus officinalis* L.) en culture *in vitro*.**

Traitement N°	Régulateurs de croissance ( $\mu$ M)	Nombre de nouvelles pousses développées/ explantat <sup>Y</sup>	Formation de cal <sup>Z</sup>
1	sans régulateurs	0	-
2	BA (4,44) AIB (0,49)	6,0 $\pm$ 1,5	-
3	BA (44,44) AIB (0,49)	3,5 $\pm$ 1,2	++
4	BA (4,44) ANA (0,53)	1,2 $\pm$ 0,4	++
5	BA (44,44) ANA (0,53)	1,0 $\pm$ 0,2	++
6	BA (4,44) AIA (1,14)	1,4 $\pm$ 0,3	-
7	BA (44,44) AIA (1,14)	1,1 $\pm$ 0,5	+

<sup>Y</sup>L'évaluation des diverses combinaisons de régulateurs de croissance est réalisée sur la base de 20 explantats/traitement. Les expériences ont été répétées au moins deux fois.

<sup>Z</sup>Le nombre de signes + indique la grosseur relative du cal à la fin de chaque expérience (- = aucun; + = faible; ++ = moyenne).

### Multiplication des nouvelles pousses feuillées

Lorsque les pousses axillaires obtenues sur les explantats initiaux ont atteint une taille de 0,5 à 1,0 cm environ, on les transfère sur un milieu de base enrichi de diverses combinaisons phytohormonales (cf. Matériel et Méthodes, et tabl. 1) pour provoquer le développement de nouvelles pousses feuillées.

Comme le montre le tableau 1, l'adjonction de constituants hormonaux dans le milieu de culture est nécessaire au développement des pousses feuillées chez l'Hysope cultivé *in vitro*. L'absence totale de régulateurs de croissance ne permet pas, dans le cas présent, la mise en place de primordia évoluant en de nouvelles pousses. Le meilleur développement, dans nos conditions d'expérimentation, a été obtenu avec le mélange de 4,44  $\mu$ M de benzyladénine (BA) et de 0,49  $\mu$ M d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB); sur ce milieu, on dénombre une moyenne de 6 à 8 nouvelles pousses produites par explantat et par subculture de multiplication (fig. 2). Les pousses feuillées ainsi développées sont toutes utilisables soit pour les opérations de multiplication, soit pour les travaux d'enracinement ultérieurs. L'augmentation de la teneur en benzyladénine (BA) à 44,44  $\mu$ M dans le même milieu de culture a diminué le taux de prolifération et la qualité des pousses obtenues (cals); on assiste alors à un phénomène de raccourcissement des points végétatifs qui sont en cours de développement (fig. 3).

Le type d'auxine entrant dans la composition du milieu nutritif influence la formation des nouvelles pousses feuillées. Seul l'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) a montré une action favorable au développement de celles-ci, alors que l'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA) et l'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA) s'avèrent



Fig. 2. Développement de nouvelles pousses sur le milieu de base de MURASHIGE et SKOOG (1962) contenant 4,44  $\mu$ M de Benzyladénine (BA) et 0,49  $\mu$ M d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB).

peu efficaces pour induire le nombre de pousses produites par explantat; cette diminution significative de la capacité organogène s'accuse encore lorsqu'on augmente la concentration en benzyladénine (BA) à 44,44  $\mu$ M dans le milieu nutritif de base.

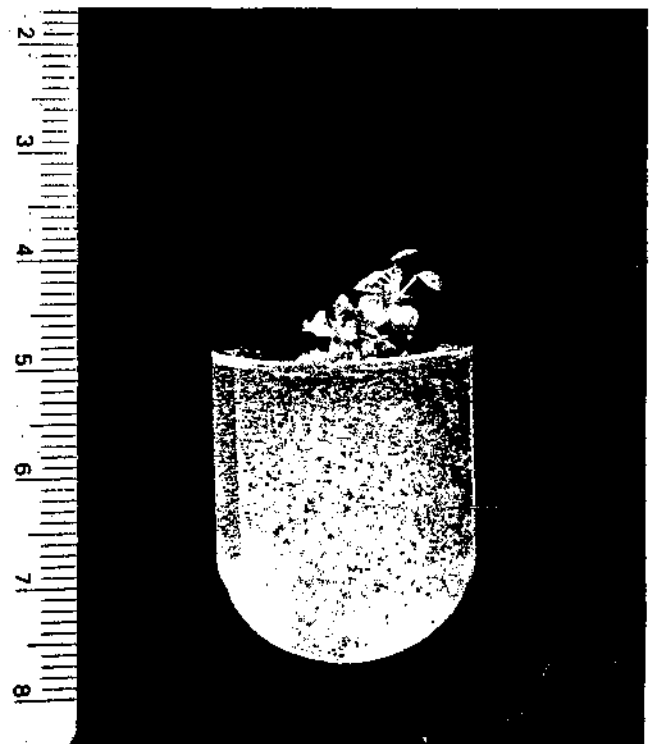


Fig. 3. Inhibition de la croissance des nouvelles pousses feuillées sur le milieu enrichi de 44,44  $\mu$ M de Benzyladénine (BA).

## Enracinement

Les résultats présentés dans la figure 4 montrent que le traitement à l'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA) à la concentration de  $300 \mu\text{M}$ , pendant 5 heures, provoque l'enracinement de plus de 90% des microboutures, après 15 jours de culture. Le nombre moyen de racines produites par ce procédé s'élève à 5 nouvelles racines par microbouture contre 1 racine obtenue difficilement (5%) avec un traitement dépourvu de régulateur de croissance (TE). L'incorporation de  $0,5 \mu\text{M}$  d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) dans le milieu de culture de base selon la technique PIL entraîne une augmentation insuffisante du pourcentage d'enracinement (25%) et du nombre de racines formées par explantat.

Dans nos conditions de culture, les microboutures traitées selon le procédé PIB font apparaître les premières ébauches racinaires dès le septième jour de culture. Ces ébauches évoluent assez rapidement en racines bien formées sans apparition de cal à la base des microboutures.

Des résultats comparables, avec la même teneur en auxine (AIA), ont été rapportés par COLLET (1985) sur le rosier, et COLLET et LÉ (1986) sur les variétés de pommier Gravenstein et Tohoku, et le porte-greffe M26.

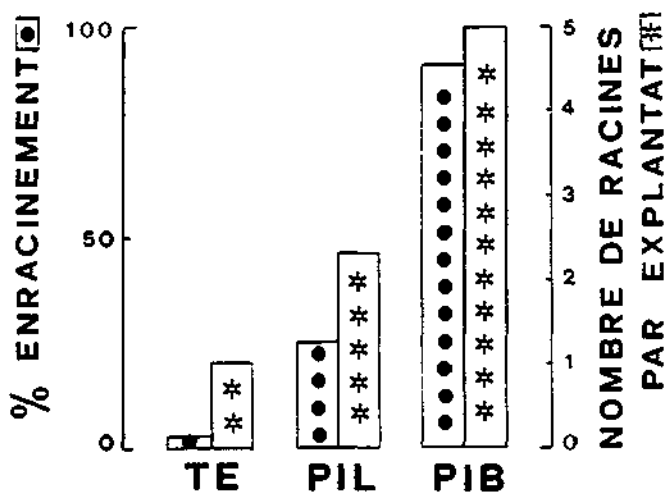


Fig. 4. Pourcentage d'enracinement et nombre moyen de racines obtenus selon divers modes de traitement chez l'Hysope (*Hyssopus officinalis* L. cultivé *in vitro*. (TE: sans régulateur de croissance; PIL: prétraitement inductif long; PIB: prétraitement inductif bref.)

## Sevrage

Le transfert des microplantes racinées *in vitro* en milieu de culture traditionnel, en serre, par passage progressif selon notre technique décrite plus haut (cf. Matériel et Méthodes) a permis d'obtenir plus de 95% de jeunes plantes capables de poursuivre leur cycle de végétation, sur l'ensemble de nos essais.

Il convient également de signaler que les plantes multipliées *in vitro*, une fois sevrées en serre, ont continué à évoluer normalement (fig. 5) et n'ont présenté aucune modification morphologique.



Fig. 5. Jeunes plantes d'Hysope cultivées depuis 4 mois en serre.

## Conclusion

Au cours de cet essai, nous avons cherché à mettre au point une méthode de multiplication rapide de l'Hysope (*Hyssopus officinalis* L.) qui pourra être facilement appliquée aux nombreux clones sélectionnés par la RAC - Centre des Fougères, pour leur richesse en matière active et dont le taux de reproduction par voie conventionnelle demeure encore modeste. Nos premiers résultats d'expérience montrent que :

- les extrémités de tige d'Hysope sont capables de produire des nouvelles pousses à un rythme rapide sous l'action d'un équilibre hormonal précis;
- les pousses ainsi obtenues peuvent être régénérées en plantes entières moyennant un traitement inductif bref à l'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA) selon COLLET (1985);
- le transfert des microplantes en conditions de culture de serre est effectué sans difficulté particulière permettant ainsi à plus de 95% de plantes *in vitro* de poursuivre leur croissance et leur développement ultérieurs;
- aucun signe de variation phénotypique n'a été décelé au cours de la culture en conditions de serre.

Des travaux ultérieurs réalisés sur d'autres clones d'Hysope sont en cours de développement afin de vérifier l'efficacité de cette technique de micropropagation.

## Remerciements

Nos remerciements vont à M<sup>lle</sup> I. CORDEY pour sa collaboration à la culture *in vitro*, à M. C. STAUDMANN pour ses travaux de culture en serre, à Changins.

## Résumé

Le présent article décrit une méthode de culture en milieux stériles de l'Hysope (*Hyssopus officinalis* L.), qui permet l'obtention de 6 nouvelles pousses par explantat mis en culture.

Des extrémités de tiges d'Hysope ont été cultivées sur un milieu nutritif gélosé contenant les sels minéraux de base de MURASHIGE et SKOOG (1962), additionné de 4,44  $\mu\text{M}$  de Benzyladénine (BA) et de 0,49  $\mu\text{M}$  d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) pour induire le développement de nouveaux bourgeons. L'enracinement des nouvelles pousses (microboutures) a été obtenu en traitant les jeunes pousses avec de l'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA) à la concentration de 300  $\mu\text{M}$ , pendant 5 heures, et en les cultivant par la suite sur un milieu de culture dépourvu de régulateurs de croissance (COLLET, 1985). Aucune modification morphologique des plantes issues de culture *in vitro* n'a été observée après le sevrage et la culture en conditions de serre.

### Summary

A method for *in vitro* culturing of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) which induces the formation of 6 new shoot primordia per explant, is described in this publication.

Young shoot tips of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) are being cultivated on a basal MURASHIGE and SKOOG (1962) salts medium supplemented with 4,44  $\mu\text{M}$  Benzyladenin (BA) and 0,49  $\mu\text{M}$  Indole-butyric acid (IBA) in order to induce shoot primordia formation. For rooting microcuttings were treated with 300  $\mu\text{M}$  Indoleacetic acid (IAA) during 5 hours, and then transferred on a hormone-free medium (COLLET, 1985). No obvious morphological changes were noticed after weaning and the transfer under green-house conditions.

### Zusammenfassung

In diesem Artikel wurde eine Gewebekulturtechnik für Ysop (*Hyssopus officinalis* L.) beschrieben, mit der wir 6 Knospen pro Explant erreichen. Triebspitzen von Ysop (*Hyssopus officinalis* L.) wurden auf einem Agar-Nährmedium kultiviert, die die Grundsätzlichen Mineralsalze von MURASHIGE und SKOOG (1962) enthält, ergänzt durch 4,44  $\mu\text{M}$  Benzyladenin (BA) und 0,49  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Indolyl-buttersäure (IBS), um die Bildung von neuen Knospen zu bewirken. Zur Wurzelbildung wurden die neuen Stecklinge 5 Stunden mit 300  $\mu\text{M}$   $\beta$ -Indolyllessigsäure (IES) behandelt und dann auf

ein Hormonfreies-Nährmedium überführt (COLLET, 1985). Nach der Akklimatisierung und dem Anbau im Treibhaus wurden keine morphologischen Veränderungen der *in vitro*-kultivierten Pflanzen festgestellt.

### Bibliographie

- BAJAJ Y.P.S., 1986. Biotechnology in agriculture and forestry 1 - Trees I - Ed. Bajaj Y.P.S., 515 p., Springer Verlag, Berlin-Heidelberg - New York.
- BROOME O. C. and ZIMMERMANN R. H., 1978. *In vitro* propagation of blackberry. *HortScience* 13 (2), 151-153.
- COLLET G. F., 1985. Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 17 (4), 259-263.
- COLLET G. F. and LE C. L., 1986. Role of auxin during *in vitro* rhizogenesis of Rose and Apple-tree. *Acta Hort.* (in press).
- CONGER B. V., 1981. Agronomic crops. In Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Ed. Conger B. V., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 165-216.
- GEORGE E. F. and SHERRINGTON P. D., 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., Eversley, Basingstoke, Hants (England), 709 p.
- HARNEY P. M., 1982. Tissue culture propagation of some herbaceous horticultural plants. In application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry. Eds. Tomes D. T., Ellis B. E., Harney P. M., Kasha K. J., Peterson R. L., University of Guelph, Ontario, Canada, 187-208.
- LE C. L., 1985. Influence of temperature on *in vitro* root initiation and development of apple rootstock M26. *HortScience* 20 (3), 451-452.
- MANTELL S.H. and SMITH H., 1983. Plant biotechnology. Eds. Mantell S. H. and Smith H., Cambridge University Press, 334 p.
- REY C., 1986. Plantes médicinales et aromatiques. In Rapport d'activité 1984-1985, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins. Publication N° 1412, 542-543.
- RIPLEY K. P. and PREECE J. E., 1986. Micropropagation of *Euphorbia lathyris* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 5 (3), 213-218.
- SIMON J. E., CHADWICK A. F. and CRAKER L. E., 1984. The herbs (part I). In Herbs - An indexed bibliography 1971-1980. Eds. Simon J. E., Chadwick A. F., Craker L. E., Elsevier, 50-51.

# Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier

## I. Etablissement et multiplication *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, M26, M27, MM106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. (A)

G. F. COLLET et Linh Cong LÊ, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

### Introduction

La production de porte-greffe bien enracinés, de diverses vigueur pour satisfaire aux besoins de la production fruitière selon les sols et climats, présente un grand intérêt pour la pratique arboricole. Elle se heurte néanmoins à de graves difficultés pour certaines variétés telles que M9, M27 et *Cydonia*.

La culture *in vitro* peut apporter des solutions à ce problème (ABBOTT et WHITELEY, 1976; QUOIRIN *et al.*, 1974; JONES, 1979; ZIMMERMAN et BROOME, 1980). C'est pourquoi nous avons examiné les conditions de production *in vitro* de ces porte-greffe en les comparant à trois autres porte-greffe connus, M25, M26 et MM106.

La micropropagation *in vitro* de ces porte-greffe doit obligatoirement passer par quatre étapes (LÊ, 1985 b) :

- L'établissement *in vitro* ou adaptation à des conditions artificielles de méristèmes enveloppés de quelques ébauches foliaires. Cette opération est délicate, mais une fois réussie, elle offre à ces bourgeons des conditions idéales de développement.
- La multiplication *in vitro* de ces bourgeons par microbouturage des nouveaux bourgeons axillaires formés. La rapidité de multiplication va non seulement dépendre du temps nécessaire à la croissance de ces nouveaux bourgeons (généralement 3 à 4 semaines) mais encore du nombre de ceux-ci utilisables à chaque repiquage.

- L'enracinement garanti de ces boutures *in vitro*. Un taux d'enracinement élevé peut être obtenu même pour des cultivars réputés difficiles à enraciner, grâce à une technique respectant les besoins physiologiques de ces plantes.
- Enfin le sevrage de miniplantes (2 à 3 cm), c'est-à-dire leur réinsertion dans leur environnement naturel. Cette autonomie retrouvée ne doit pas être accompagnée de grosses pertes.

Cet article décrit ces étapes pour les 6 porte-greffe choisis et les résultats obtenus depuis 1983 pour certains cultivars.

La justification du choix de cette méthode est développée dans la conclusion à la page 258.

La publication se fera en plusieurs parties; la première est consacrée à la description méthodologique et aux deux premières étapes, l'établissement et la multiplication *in vitro*. Les parties suivantes traiteront de l'enracinement, du sevrage et d'autres possibilités pour cette biotechnologie.

### Matériel et méthodes

Les variétés de porte-greffe de pommier et de cognassier utilisées dans ces recherches, ainsi que leurs dates d'établissement *in vitro* et le numéro code du clone choisi, sont décrites dans le tableau 1.

Tableau 1. Porte-greffe de *Pyrus malus* (M26, M25, M27, MM106, J9) et *Cydonia oblonga* (Cyd A).

	Origine		Arriv. RAC	Etabl. <i>in vitro</i>	Code
M26	(East Malling)	M16 × M9	21.02.67	17.06.83	4221
M26	(East Malling)	M16 × M9	21.02.67	17.02.86	8620
M25	(East Malling)	Northern spy × M2	20.04.70	20.02.86	8618
M27	(East Malling)	M13 × M9	13.04.72	18.02.86	8621
MM106	(East Malling)	Northern spy × M1	1954	19.02.86	8622
J9	(M9 type Jork)	Paradis jaune de Metz	1954	06.02.86	8606
Cyd A	(East Malling)	Cognassier d'Angers A	1968	18.08.83	Cyd A

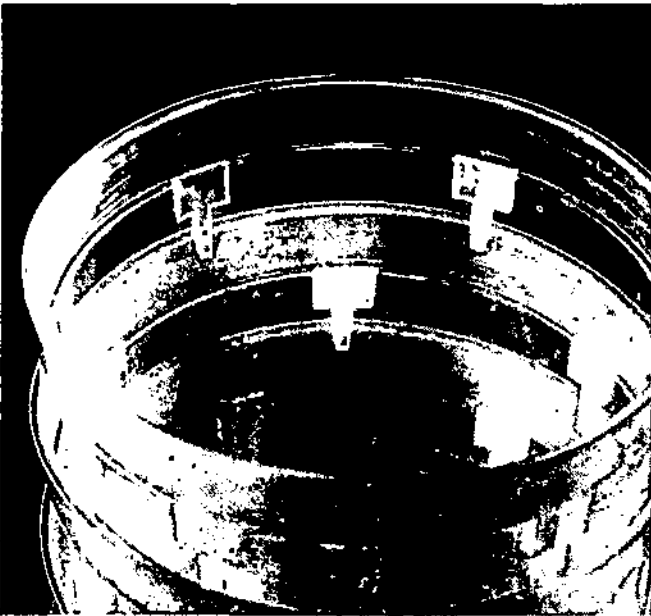
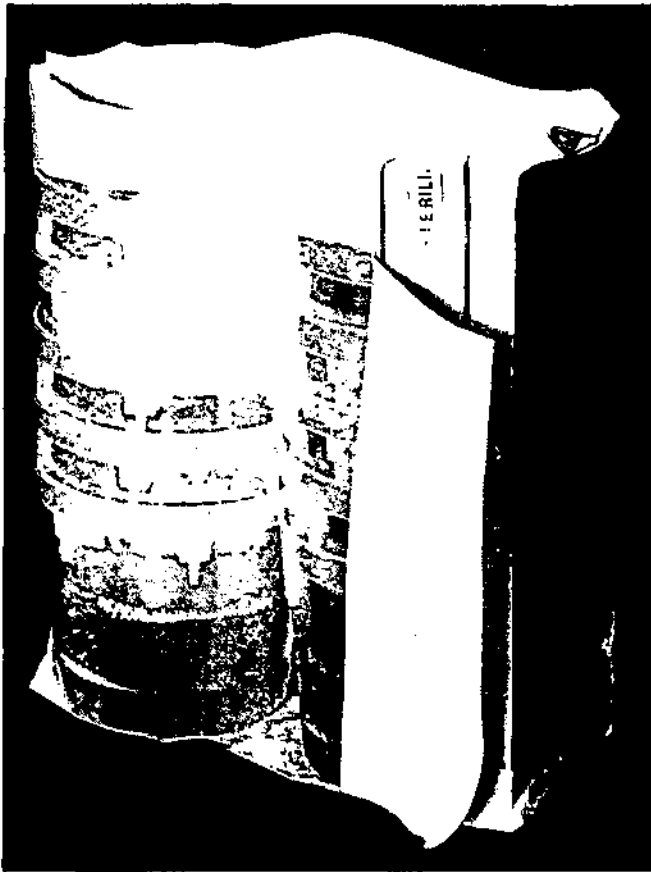


Fig. 1. A) conteneurs en polypropylène sortant de l'autoclave et que l'on peut conserver dans leur sac en papier; B) détail des ergots permettant l'empilement des pots contenant le milieu nutritif.

La culture *in vitro* est conduite en tube de verre Kimble R (150 × 25 mm) bouché avec des cap-o-test en polycarbonate, ou en pot autoclavable en polypropylène de 400 ml (Plastem) fermé par un couvercle en PVC stérilisé au préalable par rayonnement ionisant (2 my Rad) ou par de l'oxyde d'éthylène (3-6%). Après avoir reçu la quantité désirée de milieu nutritif, ces pots peuvent être gerbés pour être stérilisés (121°C, 15 min.), permettant ainsi un appréciable gain de temps et d'espace (fig. 1).

Les milieux nutritifs utilisés ont pour base des milieux classiques (MURASHIGE et SKOOG, 1962; QUORIN *et al.*, 1977; WALKEY, 1972; WERNER et BOE, 1980) que nous avons modifiés pour nos besoins et dont le détail est donné au tableau 2. Les composés chimiques minéraux proviennent de Merck; les composés organiques de Sigma. Les hormones suivantes: auxines: Ac. 3-indolylacétique (IAA), Ac. 3-indolylbutyrique (IBA), Ac. 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D); cytokinine: 6-Benzylaminopurine (BAP); gibbèrelline: Ac. gibbèrellique (GA3) sont solubilisées dans quelques millilitres d'éthanol *puriss.* Nous utilisons du «bacto agar DIFCO» et du saccharose pur.

La culture *in vitro* se déroule en chambre climatisée dont la température est réglée à 23°C pendant les 16 heures de jour (Tubes fluorescents AVIVA/Mazda 850  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  au niveau des plantes). La température nocturne est maintenue à 20°C.

Tableau 2. Composition chimique des milieux nutritifs utilisés.

(en mM)	Établissement		Multiplication		Enracinement	
	E	1/2 LP	MCX	CMS	MCR85	
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	10,30	2,50	20,60	2,00	1,75	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	19,70	16,40	39,40	18,00	12,20	
P	0,60	1,00	1,25	2,00	1,75	
K	10,00	9,90	20,05	12,00	0,00	
Na	0,00	0,00	0,00	0,00	8,20	
Ca	1,50	2,50	3,00	3,00	2,00	
Mg	0,75	0,73	1,50	1,50	0,20	
S	0,75	0,73	1,50	1,50	0,20	
Fe	0,05	0,05	0,10	0,02	-	
B	0,16	0,10	0,10	0,10	-	
Mn	0,11	0,005	0,10	0,05	-	
KI	-	0,0005	0,005	0,005	-	
Zn	0,03	0,03	0,03	0,01	-	
Mo	0,001	0,001	0,001	0,001	-	
Co	-	0,0001	0,0001	0,0001	-	
Cu	0,0001	0,0001	0,0001	0,001	-	
Thiamine	0,00296	0,00118	0,00296	0,00296	-	
Myoinositol	2,780	0,555	0,555	0,555	-	
Pyridoxine	-	0,00243	0,00243	0,00243	-	
Ac. nicotinique	0,00812	0,00406	0,00406	0,00406	-	
Panto-						
thénate Ca	0,00105					
Biotine	0,00041					
Riboflavine	0,00027					
Ac.p.amino-	0,00904					
benz.						
Ac. folique	0,00002					

Phytohormones (en  $\mu\text{M}$ )

IBA	-	0,0	0,49	-	-
2,4 D	0,005	-	-	-	-
BAP	4,44	4,44	4,44	-	-
GA3	0,29	0,29	0,29	-	-
Saccharose	2%	2%	3%	2%	2%
Agar	0,8%	0,8%	0,6%	0,7%	(0,7%)
pH	5,8	5,5	5,7	5,7	5,1

La concentration des éléments et composés organiques est exprimée en millimolaire [mM] sauf pour les phytohormones ( $\mu\text{M}$ ), le sucre et l'agar (%).

## Etablissement *in vitro*

Les bourgeons des 6 variétés de porte-greffe prélevés généralement sur des rameaux dormants sont établis sur le milieu E du tableau 2, après désinfection superficielle. Quinze jours plus tard, ils sont transférés sur le milieu de multiplication MCX du tableau 2 et y séjournent un mois. Ils sont alors repiqués, après division éventuelle des touffes, sur des milieux neufs de multiplication (tabl. 2).

Le matériel végétal utilisé dans notre étude comporte des rameaux de l'année, dont la dormance a été levée par quelques semaines de conservation en chambre froide (2 à 4°C). Ces rameaux identifiés par une lettre sont fragmentés en plusieurs segments de 2 à 3 bourgeons qui sont numérotés de manière à les situer sur le rameau à partir du bourgeon apical (tabl. 4).

La désinfection superficielle du matériel végétal s'effectue par un passage rapide des fragments de rameaux dans l'éthanol à 70% pendant quelques secondes, suivi de deux trempages de 15 minutes chacun, d'abord dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1%, puis dans le Kohrsolin® à 3%. Les rameaux sont alors rincés trois fois à l'eau stérile, puis à l'éthanol à 70% pour faciliter leur essuyage.

Sous une loupe binoculaire (grossissement 20 fois) éclairée au moyen de fibres optiques, la dissection des bourgeons permet le prélèvement du dôme apical excisé avec une ou deux paires d'ébauches foliaires. Ces explantats (apex de 0,5 à 0,8 mm) sont ensuite placés dans des tubes de verre (150 × 25 mm) contenant 12 ml de solution nutritive gélifiée par de l'agar (E, tabl. 2) et sont maintenus dans l'environnement décrit plus haut.

## Multiplication

Les subcultures de multiplication sont réalisées à partir de bourgeons axillaires repiqués toutes les quatre semaines sur l'un ou l'autre des milieux nutritifs proposés dans le tableau 2. Le choix des bourgeons de repiquage est important pour assurer la qualité des «vitroplants», comme le montre cette étude. Ce travail a été conduit en veillant à attribuer à chaque nouveau bourgeon au moment de son repiquage un numéro matricule correspondant à sa position dans la touffe (fig. 2).

Ainsi, au cours des subcultures successives, chaque bourgeon utilisé voit son matricule augmenté, permettant d'établir des correspondances entre le comportement des explantats au cours du temps et leur origine (tabl. 4).

## Enracinement

Pour enraciner les microboutures, des tigelles de 10-20 mm sont choisies et subissent l'une ou l'autre des traitements inducteurs A ou B.



Fig. 2. A) explantats de M26 après 4 semaines de cultures sur MCX; B) repérage des divers bourgeons (n° matricule) 0: axe principal; 1 à 4: bourgeons axillaires; T: touffe basale.

### A. Prétraitement inducteur long (PIL)

Les microboutures sont plantées dans un milieu nutritif classique LP/2 ou appauvri CMS (tabl. 2), dont la composition hormonale est limitée à la teneur en auxine à basse concentration: Ac: 3-indolylbutyrique IBA à 10  $\mu$ M, et y séjournent pendant 15 à 20 jours, dont les cinq premiers s'écoulent à l'obscurité à 27°C avant de revenir en situation photothermopériodique normale (LÉ, 1985a). Au terme des trois semaines, les microboutures enracinées et le nombre de racines par bouture sont enregistrés avant le sevrage.

### B. Prétraitement inducteur bref (PIB)

Un prétraitement inducteur bref à forte concentration d'auxine caractérise cette technique originale (COLLET, 1985). Les microboutures sont fichées dans une solution agarisée d'auxine naturelle (Ac. 3-indolyl-

acétique (IAA), radioactive ou non) fortement concentrée : 0,3-3 mM selon la variété et pendant quelques heures (16 h). Ensuite les microboutures ainsi prétraitées sont repiquées sur un milieu appauvri et sans hormone (CMS – tabl. 2) jusqu'à l'apparition des racines (7 à 20 jours selon les cas).

## Sevrage

Les microboutures enracinées commencent leur acclimatation en serre par l'ouverture des couvercles des conteneurs pendant 48 à 72 h avant d'être transférées sur un substrat horticole classique TKS1 contenant 20% de perlite. Après quelques semaines de développement *ex vitro*, ces plantes sont repotées en terre horticole et traitées comme des plantes produites par bouturage ou marcottage traditionnels.

## Résultats

### Etablissement *in vitro* du matériel végétal

La réussite de l'établissement *in vitro* (tabl. 3) est mesurée en pour-cent des bourgeons en croissance axénique (sans autre organisme) par rapport à la totalité des bourgeons mis en culture. Si l'établissement *in vitro* des porte-greffe M25, J9 et *Cydonia* A est relativement facile (plus de 80%), celui des autres porte-greffe étudiés est plus délicat. Certains résultats (MM106) montrent que la réussite ne dépend pas que de la variété, mais aussi de l'état physiologique des bourgeons à la levée de dormance et de l'habileté de l'opérateur.

Tableau 3. Etablissement *in vitro* des porte-greffe.

Cultivar	Clone	Date	Nbre de bourgeons expérimentés	Moyenne du % de réussite
M26	4421	17.06.83	90	30% ± 10%
M26	8620	05.03.86	99	34% ± 24%
M27	8621	06.03.86	44	36% ± 20%
M25	8618	20.02.86	49	80% ± 22%
MM108	8617	19.02.86	50	26% ± 15%
MM106	8622	20.03.86	88	53% ± 20%
MM106	8624	04.04.86	68	16% ± 8%
J9	8608	08.02.86	45	82% ± 37%
<i>Cydonia</i>	A	18.08.83	17	100% -

Chaque rameau (cf. tabl. 4) est analysé pour lui-même, la moyenne est établie sur 10 à 15 rameaux.

Cependant, le taux de multiplication de telle souche par rapport à telle autre est un paramètre important en terme de succès (commercial), et qui s'affirme au cours de subcultures successives, ce qui conduit au choix des meilleurs bourgeons: tableau 4.

Tableau 4. Taux de multiplication des meilleurs clones au cours des premières subcultures (5C<sub>3</sub>- 5C<sub>7</sub>), avec un exemple détaillé pour le M27 concernant le choix (cf. tabl. R3).

Cultivar	N° bourgeon	Subcultures					NBU/NBC	Observations
		SC <sub>3</sub>	SC <sub>4</sub>	SC <sub>5</sub>	SC <sub>6</sub>	SC <sub>7</sub>		
M25	A15	3,1	5,5	3,1	3,3	6,5	115/18	*
MM106	S13	4,0	1,8	2,3	2,3	2,4	60/25	*
J9	J5-10	2,0	2,0	2,4	2,5	3,0	-	*
M26	H12	4,3	3,3	3,0	3,0	3,7	37/10	*
M27	B10	2,5	2,8	5,7	2,2	5,7	17/3	C
M27	B18	4,5	2,2	2,8	4,0	2,8	11/4	C
M27	E13	4,1	4,2	3,0	3,1	3,0	41/14	*
M27	J10	3,0	3,0	5,0	2,3	5,0	10/2	F
M27	K6	5,0	2,0	2,2	2,2	2,5	5/2	C
M27	G14	-	2,4	4,0	3,5	4,0	26/6	*

N° bourgeon: lettre = identification du rameau; chiffre = N° d'ordre du bourgeon compté depuis le bourgeon terminal. NBU/NBC = nombre de bourgeons utilisables rapportés au nombre de bourgeons cultivés dans la dernière subculture SC<sub>7</sub>. Observations complémentaires: C = cal; V = aspect vitreux; F = fluctuation du taux de multiplication; tous sont des facteurs d'élimination; \* = choix final du clone.

### Multiplication *in vitro*

La multiplication *in vitro* de ces plantes ligneuses dépend de plusieurs conditions: les unes relevant des caractéristiques de la souche du végétal, les autres de l'environnement physico-chimique (milieu nutritif, photothermopériode, vaisselle, etc.).

Nous avons suivi le développement de plusieurs dizaines de bourgeons de chaque cultivar, prélevés et cultivés dans les mêmes conditions pendant quelques subcultures (SC 3 à 7 du tabl. 4). On constate que certains bourgeons sont plus productifs que d'autres, et que le taux de multiplication fluctue plus ou moins selon la souche ou le clone. Il en va de même en ce qui concerne l'apparition de cal, de tissus à aspects vitreux (hyperhydriques), ou la miniaturisation excessive des nouveaux bourgeons. Il apparaît ainsi clairement en suivant l'évolution d'un bourgeon au cours des subcultures successives (tabl. 5) que le taux de multiplication est moindre pour les axes principaux (0) que pour les tiges issues de bourgeons axillaires (1 à n) (cf. fig. 2B). De même, on note une nette propension à la formation de cal ou de tissus vitreux pour des bourgeons issus de la base de la touffe (T), plus ou moins complètement immergés dans le milieu nutritif enrichi de cytokinine.

La comparaison de la croissance (gain pondéral) et du développement (taux de multiplication par subculture de nouveaux bourgeons) du clone 3491 de M26 cultivé sur deux milieux nutritifs de multiplication MCX et LP/2 (tabl. 2) permet les constatations suivantes (tabl. 6). Si la nature du conteneur – tube en verre ou pot en polypropylène – n'a pas d'importance, la composition du milieu nutritif est déterminante pour favoriser ou non la croissance (différences très significatives \*\*). La quantité de milieu à disposition de chaque explantat joue également un rôle non négligeable pour ces cultures de 4 semaines.

Quelle est la part de la composition minérale et celle

Tableau 6. Détail du choix d'un clone (E13 du M27).

N° Bourgeon	SC <sub>3</sub>	SC <sub>4</sub>	SC <sub>5</sub>	SC <sub>6</sub>	SC <sub>7</sub>
M27 E13	0	0, 0/1/T	{ 0, 0, 0/1-4 0, 1, 0 0, T C	0, 0, 0, 0/1/2	0, 0, 0, 0, 0-3
	1	1, 0/1/2/3/T	{ 1, 0, 0, 0/1 C 1, 1, 0-2/3 1, 2, 0/1/2 1, 3, 0/1 1, T, T C	1, 1, 3 infecté 1, 2, 2, 0/1/2/3/4/5	{ 1, 2, 2, 0, 0/1/2 1, 2, 2, 3, 0/1/2/3 1, 2, 2, 4, 0/1 1, 2, 2, 5, 0-2
	2	2, 0/1/2/3/T	perdus		
	3	3, 0/T	{ 3, 0, 0-3/4/5 3, 0, T C	{ 3, 0, 4, 0-2/3/4 3, 0, 5, 0/1	{ 3, 0, 4, 3, 0/1/2 3, 0, 4, 4 N
	4	4, 0 à 5/T	{ 4, 0, 0/1 4, 1, 0/1/2 4, 2, 0 4, 3, 0 4, 4, 0 4, 5, 0 4, T, 0	4, 0, 1, 0/1	{ 4, 0, 1, 0, 0/1/2/3/4 4, 0, 1, 1, 0/1/2
				4, 1, 2, 0/1/2/3	{ 4, 1, 2, 2, 0/1/2/3 4, 1, 2, 3, 0/1
				4, 5, 0, 0/1/2	{ 4, 5, 0, 0, 0 à 4 4, 5, 0, 2, 0
T	T, 1/2/3	{ T, 1, 0/1 V T, 2, 1 T, 3 C	4, T, 0, 1/2/3/4/5	{ 4, T, 3, 0/1 4, T, 4, 0 V 4, T, 5, 0 V	

Lors de chaque subculture, l'apparition de nouveaux bourgeons est identifiée par le métricule de la subculture précédente eugmenté d'un chiffre identifiant la position de chaque nouveau bourgeon.

0: axe principal; 1 à 10 bourgeons axillaires (fig. 2);

T: touffe de très petits bourgeons noyés dans une masse tissulaire.

Les chiffres gras correspondent aux bourgeons choisis pour la prochaine subculture de multiplication, de taille suffisante et sans défaut visible.

Ex.: M27 E13 1, 2, 2, 0/1/2/3-5 signifie qu'il y a 6 bourgeons recensés en SC<sub>6</sub>, dont 4 sont choisis pour prolonger la multiplication.

V/C/N: aspect vilreux, callogène ou nécrotique; tous facteurs d'élimination.

Tableau 6. Comparaison des poids frais [PF (mg)] et du nombre de bourgeons utilisables (> 5 mm) [NBU] du M28/3491 après 4 semaines de culture *in vitro* en conditions nutritives différentes (cf. tabl. 2).

Vol/ explant	Milieux nutritifs	MCX		1/2 LP		
		Conteneur	PF (mg)	NBU	PF (mg)	NBU
12 ml	Tube		972,3 <sup>a</sup>	5,7 <sup>a,b</sup>	523,2 <sup>bcd</sup>	3,9 <sup>c</sup>
			± 322,7	± 2,8	± 137,1	± 2,0
	Pot Plastem	958,4 <sup>a</sup> ± 245,6	6,9 <sup>a</sup> ± 2,7	530,3 <sup>bc</sup> ± 169,6	3,0 <sup>c</sup> ± 1,5	
6 ml	Tube		635,2 <sup>b</sup>	4,6 <sup>b,c</sup>	391,5 <sup>a</sup>	3,6 <sup>c</sup>
			± 220,8	± 2,8	± 86,7	± 1,5
	Pot Plastem	630,2 <sup>b</sup> ± 147,3	3,6 <sup>c</sup> ± 1,3	345,7 <sup>a</sup> ± 128,7	3,7 <sup>c</sup> ± 1,1	

a - e } Test de Duncan établissant une différence significative entre les résultats non marqués par le même lettre.  
a' - c' }  
Chaque moyenne est établie sur 20 mesures. (P: 0,05)

de la teneur en hormones dans les différences de croissance enregistrées entre les deux milieux nutritifs MCX et LP/2? Dans une première série expérimentale où seule la composition en macro-éléments et en hormones diffère, nous relevons (tabl. 7) que par rapport au milieu nutritif de référence (MCX complet), la gibbérelline n'a qu'un effet négligeable, alors que l'absence d'auxine réduit considérablement le gain en poids sur le milieu riche (MCX). Pour abaisser les performances déjà limitées de 30% du milieu LP/2, il faut supprimer auxine et gibbérelline. Les résultats complémentaires suivants montrent pour une même teneur en hormones indispensables (BAP + IBA) une modeste amélioration du poids lorsqu'on double la concentration en macro-éléments du LP/2: de -39,4% (tabl. 7), on passe à -31% (466 mg en moyenne par explantat); tandis qu'en augmentant spécifiquement la teneur en ammonium de 4 fois celle du LP/2, pour la rendre proportionnellement égale à celle du MCX, l'accroissement du poids des

**Tableau 7. Comparaison des effets hormonaux sur la croissance pondérale des microboutures de M26 cultivées sur les 2 milieux de multiplication proposés.**

$$\% = \frac{\text{Milieu nutritif} - \text{MCX complet}}{\text{MCX complet}} \times 100$$

Milieux minéraux	Teneur en phytohormones				
	BAP GA3 IBA	BAP - IBA	BAP GA3 -	BAP - -	
					(4,44 $\mu\text{M}$ ) (10,3 $\mu\text{M}$ ) (0,5 $\mu\text{M}$ )
MCX	0% (réf- erence)	+ 6,3%	- 43,3%	-	
LP/2	- 33,6%	- 39,4%	- 32,5%	- 51,6%	

Chaque % est calculé sur la moyenne établie sur 2 répétitions comprenant 20 explantats par variante.

ouffes est plus sensible : (574 mg) soit une diminution de -11% par rapport à la référence MCX complet. Ainsi, la composition minérale (macro-éléments) joue un rôle majeur dans la croissance, et la stimulation auxinique a besoin d'un milieu riche, particulièrement en azote.

## Discussion et conclusions

Grâce au soin mis à préparer le matériel végétal destiné à ces cultures *in vitro*, on met en évidence l'hétérogénéité du comportement interclones du M27, comme au long des subcultures (tabl. 4). Ces variations affectent non seulement le taux de multiplication, mais encore la croissance pondérale (tabl. 6) et se répètent pour les sept porte-greffe expérimentés dans ce travail. Néanmoins, au fur et à mesure des subcultures, une plus grande régularité apparaît, conséquences probables des sélections conscientes ou non, réalisées à chaque repiquage. Ces observations sont semblables à celles de ZIMMERMAN et BROOME, 1980, et SRISKANDARAJAH *et al.*, 1982.

En fin de compte, le choix d'une bonne souche pour la micropropagation commerciale d'une variété peut s'appuyer sur les paramètres enregistrés au cours des premières subcultures, comme nous l'avons fait ici pour chaque cultivar.

Les meilleures chances de culture *in vitro* appartiennent à des bourgeons de rang voisin de 12 dans le rameau original, quel que soit le cultivar expérimenté ici (tabl. 4). Le choix des bourgeons axillaires lors de subcultures successives est important. L'immersion plus ou moins complète des tissus (tiges et feuilles) à la base de l'explantat favorise l'absorption en quantité excédentaire de cytokinine (NORDSTRÖM et ELIASSON, 1986) et peut-être d'ammonium, avec les conséquences fatales enregistrées. Ces observations répétées sur une quinzaine de bourgeons de chaque cultivar doivent rendre prudent dans l'exercice de ce choix. Un milieu de multiplication abondant et riche est bénéfique pour le développement des explantats du M26 (tabl. 7) comme des autres porte-greffe.

La justification pratique de l'utilisation d'une biotechnologie plus difficile et coûteuse pour le pépiniériste doit s'appuyer sur la garantie qu'aucune autre technique traditionnelle ne soit en mesure de concurrencer cette méthode. Encore faut-il ne pas prêter à une nouvelle biotechnologie ou aux produits qui en résultent des qualités qu'ils n'ont pas. Rappelons donc les avantages et les limites de la culture *in vitro* appliquée avec maîtrise. La micropropagation *in vitro* permet une production pratiquement illimitée de jeunes plantes homogènes. Leur qualité phytosanitaire d'origine est garantie, ou même un assainissement peut être réalisé en complément de cette production facilitée, mais aucune qualité nouvelle de résistance aux maladies ou à d'autres stress (sécheresse, salinité, pollution, etc.) n'est directement impliquée dans ce mode de production. Certes cette technique peut contribuer à l'amélioration génétique, sans en constituer l'élément essentiel. Enfin la conservation *in vitro* de plantes ligneuses présente les mêmes avantages que pour d'autres productions horticoles : faible encombrement, économies d'énergie et de travail et garantie phytosanitaire.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous reviendrons sur l'importance de la qualité des milieux de multiplication, notamment sur l'enracinement.

## Remerciements

Ce travail n'aurait pu être fait sans l'expertise participation technique de M<sup>me</sup> C. BERNEY et de M. D. THOMAS. A ces remerciements nous joignons ceux dus à MM. F. PELET et R. SAUGY qui ont fourni le matériel végétal original.

## Résumé

Six porte-greffe de *Pyrus malus* L. (M25, M26, M27, J9, MM106) et de *Cydonia oblonga* Mill. sont cultivés *in vitro*. L'importance du choix des explantats sur le taux de multiplication et l'accroissement pondéral est mis en évidence. La composition et la quantité du milieu nutritif à disposition des plantes jouent également un rôle majeur dans le développement de la micropropagation.

## Summary

Six apple-rootstocks of *Pyrus malus* L. (M25, M26, M27, J9, MM106) and *Cydonia oblonga* Mill. were cultured *in vitro*. The importance of the choice of the explants on the rate of proliferation and on plant growth (fresh weight) was shown. The composition of culture media and the amount of nutritive solution provided for plantlets can also play a role in the development of a method for rapid micropropagation.

## Zusammenfassung

Sechs Unterlagen von den Apfelsorten *Pyrus malus* L. (M25, M26, M27, J9, MM106) und *Cydonia oblonga* Mill. werden *in vitro* kultiviert. Die Bedeutung der Wahl der Explantate für die Vermehrungs- und die Wachstumsrate werden beschrieben. Die Zusammensetzung der Nährlösung sowie deren der Pflanze zur Verfügung stehende Menge spielen auch eine grosse Rolle in der Entwicklung einer Methode zur raschen Massenvermehrung.

## Bibliographie

- ABBOTT A. J. and WHITELEY E., 1976. Culture of *Malus* tissues *in vitro*. I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices. *Scientia Horticulturae* 4, 183-189.
- COLLET G. F., 1985. Enracinement amélioré de la production *in vitro* de rosiers. *Rev. suisse Vitic., Hortic., Arboric.* 17 (4), 259-263.
- JONES O. P., 1979. Propagation *in vitro* of apple trees and other woody fruit plants: methods and applications. *Scientific Horticulture* 30, 44-48.
- LE C. L., 1985a. Influence of temperature on *in vitro* root initiation and development of apple rootstock M26. *HortScience* 20 (3), 451-452.
- LE C. L., 1985b. Multiplication clonale *in vitro* du pommier (*Malus domestica* Borkh., var. Gravenstein). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 17 (5), 311-315.
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-479.
- NORDSTRÖM A.-C. and ELIASSON L., 1986. Uptake and translocation of <sup>14</sup>C-labelled benzylaminopurine in apple shoots grown *in vitro* in relation to shoot development. *Physiol. Plantarum* 68, 431-435.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE Ph. et BOXUS Ph., 1974. Premiers résultats obtenus dans la culture *in vitro* de méristème apical de sujets porteur-greffe de pommier. *Bull. de Recherches agronomiques de Gembloux* 9, 189-192.
- QUOIRIN M., LEPOIVRE Ph. et BOXUS Ph., 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures de méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. *Compte rendu des recherches 1976-1977 et rapports de synthèse de la Station des cultures fruitières et maraîchères - Centre de recherches agronomiques de l'Etat, B-5800 Gembloux (Belgique).*
- SRISKANDARAJAH S., MULLINS M. G. and NAIR Y., 1982. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Science Letters* 24, 1-19.
- WALKEY D. G., 1972. Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Can. J. Pl. Sci.* 32, 1085-1087.
- WERNER E. M. and BOE A. A., 1980. *In vitro* propagation of Malling 7 apple rootstock. *HortScience* 15 (4), 509-510.
- ZIMMERMAN R. H. and BROOME O. C., 1980. Apple cultivar. Micropropagation p. 54-58. In *Proc. Conf. on nursery production of fruit plants through tissue culture - applications and feasibility* US. Dept. Agr. Sc.

# Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier

## II. Enracinement *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, 26, 27, MM106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. (A)

G. F. COLLET et L. C. LÉ, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

### Résumé

L'enracinement *in vitro* des porte-greffe de pommier et de *Cydonia* exige la production de microboutures bien développées et un prétraitement auxinique adapté à chaque cultivar. Une forte concentration d'auxine (0,3-3 mM IAA) associée à une brève durée de contact améliore nettement la rhizogenèse de ces microboutures quel que soit le cultivar. L'étude de la distribution de l'IAA-<sup>214</sup>C et de son métabolisme confirme ces conditions optimales d'enracinement.

### Introduction

Dans cette deuxième partie de la publication traitant de la micropropagation *in vitro* des porte-greffe, nous ne rappellerons que l'essentiel des méthodes, renvoyant pour plus de détails à la première partie (COLLET et LÉ, 1987). La phase d'enracinement constitue dans la propagation végétative des plantes une étape cruciale. Les diffi-

Tableau 2. Comparaison des poids frais (mg) des microboutures de M28 selon composition hormonale du milieu nutritif MCX: BAP (Benzylaminopurine: 4,44  $\mu$ M); IBA (Ac. 3-indolybutyrique: 0,5  $\mu$ M); GA<sub>3</sub> (Ac. gibbéréllique: 0,3  $\mu$ M).

	BAP IBA GA <sub>3</sub>	BAP IBA -	BAP - GA <sub>3</sub>	BAP - -	- IBA GA <sub>3</sub>	- -
Moyenne des clones 3483, 3491 et 8620	820 mg	858 mg	813 mg	626 mg	151 mg	105 mg
Clone 4421	556 mg	587 mg	510 mg	412 mg	119 mg	96 mg

cultés rencontrées avec des plantes ligneuses, particulièrement certains porte-greffe très appréciés (M9, *Cydonia*) (CUMMINS et ALDWINKLE, 1982; SEEMÜLLER *et al.*, 1985) nous ont incités à examiner l'amélioration possible de cette production par les techniques de culture *in vitro*. Nous avons étendu aux porte-greffe fruitiers l'application mise au point sur le rosier (COLLET, 1985). Elle consiste à effectuer un Prétraitement Inducteur Bref (PIB) par des concentrations élevées d'ac. 3-indolyacétique (IAA), tel que décrit dans le chapitre Matériel et méthodes de la première partie de cette publication (COLLET et LÉ, 1987). Les résultats de ce prétraitement inducteur, dont les conditions devraient garantir l'intégrité de

l'IAA (DUNLAP *et al.*, 1986), sont comparés à ceux obtenus par la technique usuelle soumettant pendant deux à trois semaines des microboutures à un contact permanent avec l'auxine à plus faible concentration (Prétraitement Inducteur Long: PIL).

### Matériel et méthodes

Les variétés et clones utilisés dans cette étude sont décrits dans la première partie (COLLET et LÉ, 1987, cf. tabl. 1), de même que la composition des milieux nutritifs (cf. tabl. 2), et les diverses techniques liées aux quatre phases de la culture *in vitro*: établissement, multiplication, enracinement et sevrage. En ce qui concerne la technique de prétraitement inducteur bref (PIB) par de l'ac. 3-indolyacétique (IAA), marqué radioactivement ou non, la figure 1 la résume et précise les zones à analyser ultérieurement (i, é, F). La technique usuelle de prétraitement inducteur long (PIL) consiste en un repiquage sur un milieu appauvri contenant 0,01 ou 0,001 mM d'auxine pendant 10-20 jours. Afin de permettre le passage des microplantes racinées en conditions de culture traditionnelle avec un maximum de réussite, elles sont soumises progressivement à l'environnement de serre de multiplication, puis repiquées dans un substrat approprié: tourbe TKS 1 (60%) + terreau du commerce (30%) + Perlite (5%) + sable (5%), et

Tableau 1. Comparaison des poids frais (PF en mg) et du nombre de bourgeons utilisables (NBU) obtenus après quatre semaines de culture *in vitro* sur MCX de microboutures de différents clones de M26, en présence ou non de 0,3  $\mu$ M de GA<sub>3</sub>.

Provenance Clones	RAC		Gembloux		Alharp «GAW»
	4421	8620	3483	3491	
<b>MCX + GA<sub>3</sub></b>					
PF (mg)	556 <sup>c</sup> ± 233	1011 <sup>ab</sup> ± 381	793 <sup>b</sup> ± 338	909 <sup>ab</sup> ± 316	705 <sup>bc</sup> ± 233
NBU	4,3 <sup>c</sup> ± 2,6	7,9 <sup>a b</sup> ± 4,6	4,9 <sup>b c</sup> ± 2,3	7,3 <sup>a b</sup> ± 3,6	5,7 <sup>a b</sup> ± 3,1
<b>MCX - GA<sub>3</sub></b>					
PF (mg)	587 <sup>c</sup> ± 305	858 <sup>b</sup> ± 331	891 <sup>ab</sup> ± 450	829 <sup>b</sup> ± 256	772 <sup>b</sup> ± 286
NBU	4,0 <sup>c</sup> ± 3,2	6,2 <sup>a b</sup> ± 2,8	4,7 <sup>b c</sup> ± 2,8	6,3 <sup>a b</sup> ± 3,2	5,6 <sup>a b</sup> ± 3,6

Test de Duncan e-c; a-c': les valeurs repérées par le même lettre ne sont pas significativement différentes.

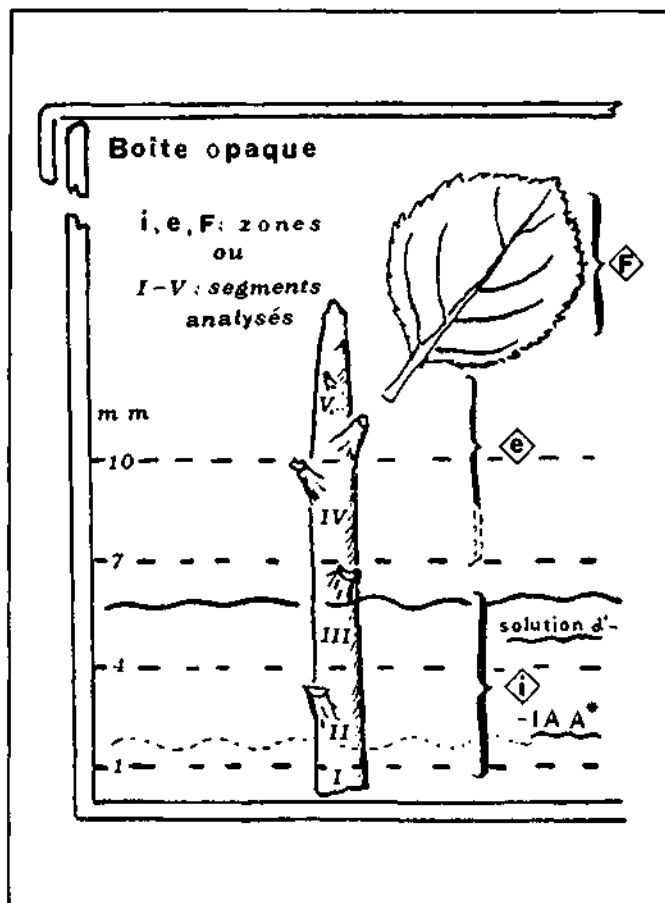
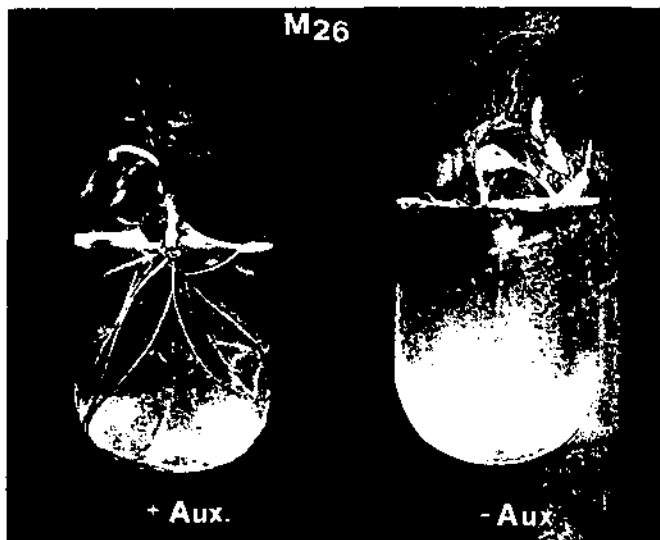


Fig. 1. Schéma décrivant le prétraitement inducteur bref (PIB). Les microboutures sont lichées (zone immergée i) dans un gel d'agar contenant des concentrations élevées (0,3-3 mM) d'IAA. Zones de travail: i (immergé), é (émergé y compris l'apex), F (feuille complète).

Fig. 2. Photo de microbouture de M26 en présence ou non d'auxine (IAA) avec enracinement ou non correspondant.



maintenues en atmosphère saturée d'humidité pendant 5 jours. L'acclimatation proprement dite s'effectue par la réduction progressive du taux d'humidité jusqu'à environ 60%.

Les prétraitements inducteurs réalisés au moyen d'IAA- $^{14}C$  (59mCi/mMole: Amersham) suivent la même technique qu'en présence d'auxine non radioactive; 20 microboutures sont alors prélevées à divers moments de l'enracinement après le prétraitement inducteur, lavées et découpées en zones (i, é, F ou R) ou en segments plus petits (I-V, fig. 1). Ces portions sont alors consommées dans un four spécial (Oxymat) et la radioactivité du  $^{14}CO_2$  est comptée par scintillation liquide (COLLET, 1985). La séparation chromatographique des composés radioactifs suit la technique classique de la chromatographie sur couche mince (COLLET *et al.*, 1964). L'extraction des tissus végétaux se fait au méthanol puriss puis, après concentration, l'extrait est déposé à la base de plaques couvertes de gel de silice (Merck HF 254), puis élué par le solvant chloroforme/ac. acétique: 95/5(CA). Les taches radioactives sont repérées au scanner et comparées aux spots témoins révélés par les réactifs usuels des composés indoliques.

## Résultats et commentaires

### Homogénéité du matériel végétal

Le porte-greffe M26 constitue notre matériel d'étude principal et sert de référence aux autres porte-greffe expérimentés. Aussi avons-nous jugé nécessaire de nous assurer de l'homogénéité de ce cultivar, quelle que soit son origine (Gembloux, Alnarp ou notre station) (RAC) et sa date d'établissement *in vitro* (1983-1986).

Le tableau 1 montre, étant donné la variabilité de ce matériel biologique, qu'il n'existe pas de différence significative dans la croissance (poids frais) et le développement (nombre de bourgeons) entre les diverses provenances; sauf pour le clone 4421, issu pourtant du même arbre que le clone 8620, mais établi en juin 1983 au lieu de février 1986, et qui présente des valeurs constamment inférieures. L'état physiologique lors de l'établissement *in vitro* aussi bien que le nombre de subcultures réalisées peuvent expliquer ces différences. Néanmoins, le comportement de tous les clones vis-à-vis de la composition phytohormonale du milieu nutritif est semblable (tabl. 2). La gibbérelline ( $GA_3$ : 0,3  $\mu M$ ) est super-

flue, ou même faiblement inhibitrice. Par contre, l'absence simultanée d'auxine (IBA: 0,5  $\mu M$ ) et de gibbérelline limite la croissance. Plus encore cette dernière est stoppée en l'absence de cytokinine (BAP: 4,44  $\mu M$ ). On retrouve le rôle essentiel des régulateurs de croissance dans le développement de ces cultures *in vitro* (JONES, 1967, JONES *et al.*, 1977, MALFATTI *et al.*, 1983).

### Comparaison des techniques d'enracinement

De même sans traitement auxinique exogène des microboutures, l'enracinement de ces porte-greffe est quasi nul (fig. 2) (SRISKANDARAJAH *et* MULLINS, 1981, sur Granny Smith), ou obtenu difficilement (Lé, 1985 b, sur Gravensstein). La technique de traitement auxinique se révèle également très importante, comme le montrent les résultats du tableau 3. La technique PIB est toujours plus efficace pour induire la formation de racines adventives sur ce M26. Elle permet d'obtenir rapidement un pourcentage d'enracinement supérieur (80%) à celui réalisé par la technique PIL, qui apparaît inadéquate spécialement pour les premières subcultures (X4).

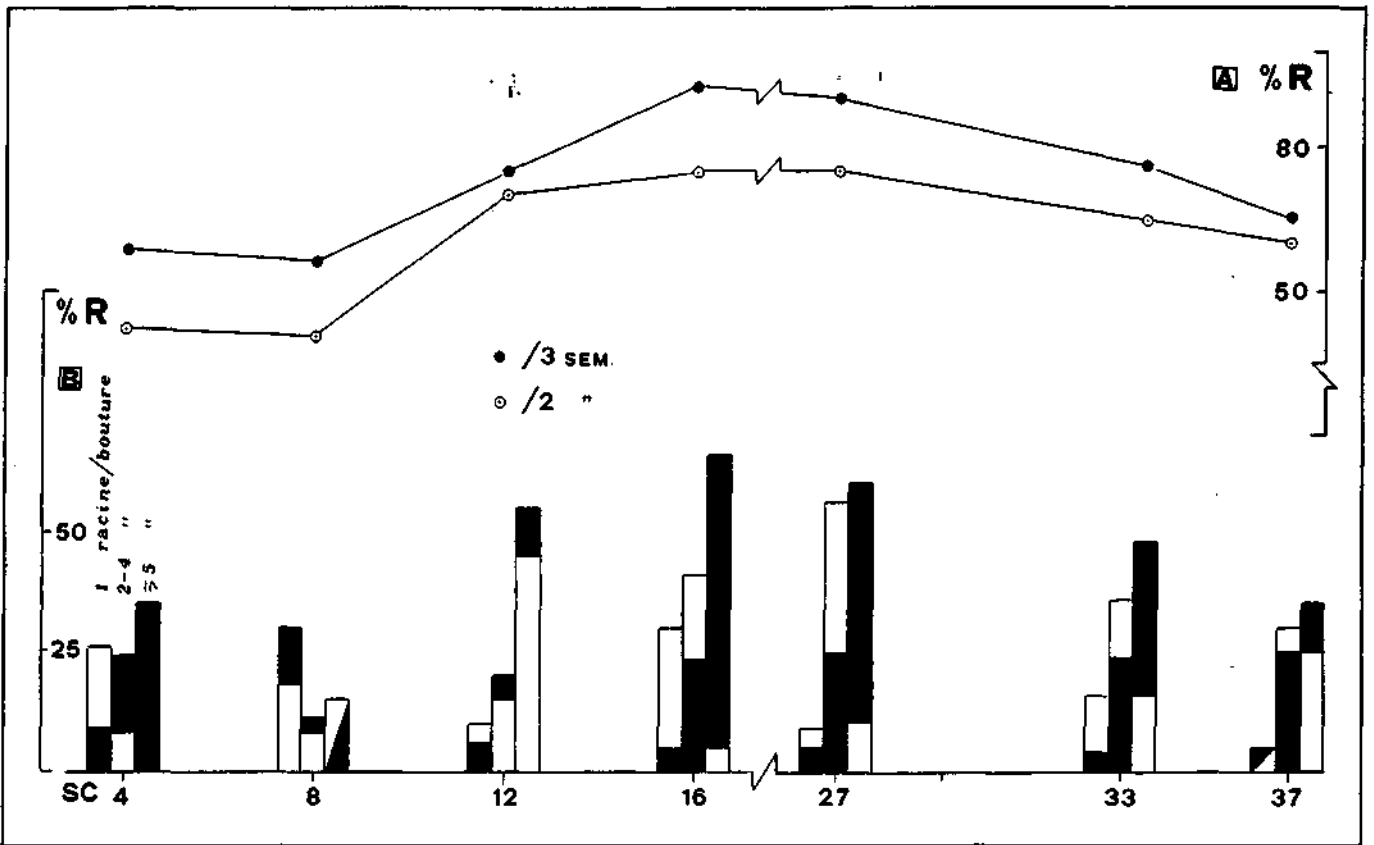


Fig. 3. Comparaison d'enracinement du M26 après un nombre variable de subcultures (SC 4-37) : A pour-cent d'enracinement total 2 et 3 semaines après le prétraitement ; B répartition en pour-cent du nombre de boutures avec respectivement 1, 2-4 et 5 racines et plus.

L'amélioration de l'enracinement (pour-cent, nombre de racines par bouture) au cours des subcultures successives est indépendante de la technique de prétraitement inducteur. La figure 3A montre que l'augmentation du pour-cent d'enracinement, quel que soit le nombre de racines par bouture, se manifeste jusqu'à la 16<sup>e</sup> subculture (SC), pour demeurer stable (env. 90%) durant une quinzaine de nouvelles SC, puis diminuer faiblement. Le même phénomène est enregistré quant aux nombres de racines par bouture (fig. 3B). L'évolution de l'état physiologique des microboutures en rapport avec le nombre de SC, illustrée par la figure 4, influence la précocité et l'abondance des racines par bouture, ce qui confirme l'augmentation de la capacité d'enracinement au cours des subcultures successives (SRISKANDARAJAH *et al.*,

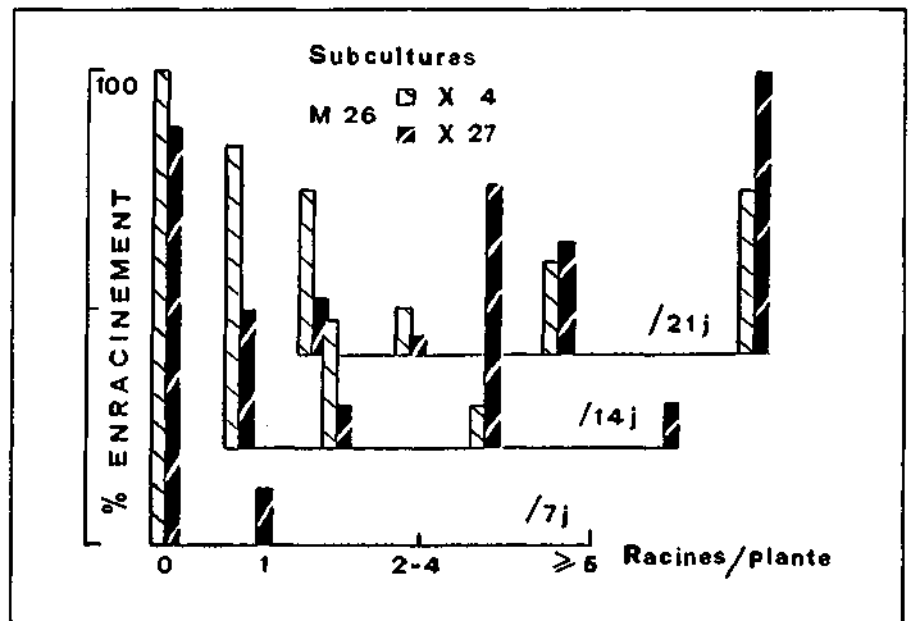


Fig. 4. Précocité de l'enracinement et abondance des racines dépendant du nombre de subcultures de multiplication (X 4, X 27) ayant précédé l'enracinement de ce M26.

Tableau 3. Comparaison après 14 et 21 jours de l'efficacité d'enracinement (en %) du M26 selon la technique d'induction : PIL (IBA : 0,01 mM) ou PIB (IAA : 1 mM). Evolution au cours des subcultures de multiplication X<sub>4</sub> à X<sub>27</sub>.

Subcultures induction	X <sub>4</sub>		X <sub>14</sub>		X <sub>27</sub>	
	PIL	PIB	PIL	PIB	PIL	PIB
14 jours	0%	42%	0%	75%	40%	73%
21 jours	10%	59%	60%	93%	57%	88%

1982, WELANDER, 1983), toutes autres conditions étant égales.

Si l'on compare la capacité d'enracinement pour d'autres porte-greffe comme le M27 (p.-g. faible), le M25 (p.-g. vigoureux) à celle de notre référence (M26), la technique PIB demeure toujours plus efficace, même après 4 sub-

**Tableau 4. Comparaison après 14 jours et 21 jours des effets de deux techniques d'induction PIL (0,01 mM d'auxine) et PIB (1 mM d'auxine) sur l'enracinement de 3 porte-greffe M25, M26 et M27 après 4 et 14 subcultures de multiplication (X<sub>4</sub>, X<sub>14</sub>).**

Induction	M25		M26		M27	
	PIL	PIB	PIL	PIB	PIL	PIB
14 jours X <sub>4</sub>	5%	69%	0%	42%	0%	63%
X <sub>14</sub>	0%	74%	0%	75%	0%	83%
21 jours X <sub>4</sub>	22%	86%	10%	59%	8%	88%
X <sub>14</sub>	37%	94%	60%	93%	30%	93%

cultures seulement (tabl. 4). Le degré de vigueur ne semble pas influencer l'aptitude à l'enracinement des boutures soumises à ce traitement inducteur. En revanche, les conditions de multiplication de ces microboutures influencent leur enracinement (tabl. 5). La substitution pendant 4 subcultures de multiplication (X<sub>4</sub> à X<sub>8</sub>) précédant l'enracinement d'un milieu nutritif plus pauvre (LP/2) à celui couramment employé (MCX) (cf. tabl. 1, première partie), provoque une diminution si-

gnificative de la capacité d'enracinement pour ces porte-greffe.

Si l'on applique cette technique originale aux porte-greffe particulièrement difficiles à enraciner (*Cydonia*: M9, JAMES et THURBON, 1979), on enregistre à nouveau une importante amélioration de l'enracinement (tabl. 6), rendant possible et économiquement praticable la production de ces porte-greffe. Toutefois, le porte-greffe M9 présente actuellement plus d'une dizaine de clones physiologiquement

**Tableau 5. Influence du milieu nutritif de multiplication (MCX ou LP/2) pendant les subcultures précédant l'enracinement (X<sub>4</sub> → X<sub>8</sub>) sur les capacités d'enracinement par la technique PIB.**

p.-g.: Milieu nutritif de X <sub>4</sub> à X <sub>8</sub>	M25		M26		M27		MM106	
	MCX	LP/2	MCX	LP/2	MCX	LP/2	MCX	LP/2
14 jours	83%	7%	43%	15%	67%	20%	33%	—
21 jours	88%	22%	68%	19%	75%	24%	49%	—

**Tableau 8. Comparaison de l'enracinement chez des porte-greffe plus ou moins difficiles à multiplier et comptant plus de 10 subcultures.**

Xn 10-30	PIL: IBA		PIB: IAA		
	0,01 mM	0,001 mM	0,3 mM	1,0 mM	3,0 mM
M26 14 j.	54%	—	78%	83%	—
21 j.	—	23%	86%	93%	—
M25 14 j.	0%	—	—	69%	16%
21 j.	37%	—	—	79%	28% calcs
Cydonia 14 j.	0%	—	—	50%	87%
21 j.	6%	—	—	60%	92%
M9 14 j.	0%	—	8%	43%	4%
21 j.	20%	—	12%	55%	16%

**Tableau 7. Absorption et distribution de l'auxine radioactive (IAA-2<sup>14</sup>C) exprimée en pMole/mg PF selon la technique d'induction PIB ou PIL sur ces microboutures de M28 au cours du temps (Di, durée initiale: 16 h pour PIB; 22 h pour PIL).**

Zones	Prétraitements inductifs									
	Long (PIL)					Bref (PIB)				
	i	é	F	R	T	i	é	F	R	T
Di	5,0	0,4	0,9	—	6,3	170,2	16,1	15,7	—	202
	± 1,3	± 0,18	± 0,7	—	—	± 38,6	± 8,2	± 8,5	—	—
Di + 48 h	20,2	1,2	5,3	—	26,7	123,9	15,1	37,4*	—	176,4
	± 12,6	± 0,4	± 3,7	—	—	± 29,9	± 10,1	—	—	—
Di + 500 h	54,1	5,9	13,7	22,6	96,3	107,7	22,5	10,2	3,1	143,5
	± 7,5	± 1,8	± 4,9	± 17,8	—	± 19,9	± 8,0	± 7,6	± 0,6	—

i: zone immergée; é: émergée y compris l'apex; F (feuille complète); R: racine; T: total.  
Une vingtaine de boutures au moins sont analysées dans chaque variante.  
\* Une seule valeur.

différents (CUMMINS et ALDWINCKLE, 1982, MASSERON, 1986). Nous y reviendrons dans une prochaine publication.

### Absorption et distribution de l'auxine lors du traitement rhizogénique

Les différences importantes d'enracinement selon la technique d'induction (PIL ou PIB) peuvent-elles être attribuées à des teneurs différentes en auxine des microboutures?

L'utilisation d'auxine marquée par un carbone radioactif (IAA-2<sup>14</sup>C) permet de mesurer précisément la quantité d'auxine absorbée et de suivre sa distribution dans la microbouture, voire son devenir métabolique.

Le tableau 7 montre des teneurs initiales (Di) d'IAA fort différentes selon le prétraitement subi (PIB ou PIL). Pourtant la répartition de la radioactivité marque toujours une accumulation dans la zone d'absorption (base de la bouture), et même si au cours du temps les différences entre traitements dans la teneur totale vont s'atténuant, la présence du <sup>14</sup>C demeure plus importante dans la zone immergée d'absorption où apparaîtront les futures racines (JAMES, 1983; COLLET, 1985).

Pour préciser la voie de pénétration de l'auxine marquée dans la microbouture, nous avons procédé soit:

- 1) à une pénétration vasculaire par la coupe de la microbouture, en interdisant par un manchon de silicone l'accès à l'épiderme;
- 2) à une pénétration cuticulaire en masquant la coupe (bouchon de Silastic® (Dow Corning), masse plastique durcissant très rapidement après mélange avec un catalyseur, et non toxique). Dans ces conditions la bouture ne peut absorber que par la surface épidermique (cuticule).

Le tableau 8 montre une absorption plus importante par la voie vasculaire que par la voie cuticulaire. Si la majeure

**Tableau 8. Distribution dans les boutures de M26 de l'IAA<sup>14</sup>C après 16 h de prétraitement inductif (PIB), puis 72 h plus tard, selon les voies de pénétration épidermique (cuticulaire) ou par la coupe basale (vasculaire) exclusivement.**

Pénétration Zones	cuticulaire					vasculaire				
	i	e	Fi	Fe	T	i	e	Fi	Fe	T
16 h n Mole <sup>14</sup> C/zone répartition %	3,29 44%	1,07 14%	2,35 32%	0,76 10%	7,47	12,6 69%	1,7 9%	3,87 21%	0,19 1%	14,5
88 h n Mole <sup>14</sup> C/zone répartition %	5,03 49%	1,95 19%	2,9 28%	0,39 4%	10,27	8,24 50%	2,82 17%	4,57 28%	0,8 5%	11,86

i : zone immergée ; e : zone émergée ; Fi : feuille dont la bée est immergée ; Fe : feuille complètement émergée ; T : total.

re partie de la teneur en IAA\* demeure dans la zone immergée (i), la distribution rapide (16 h) vers la zone émergée (e) est proportionnellement plus importante via l'épiderme. Toutefois, au cours du temps (88 h), cette répartition s'uniformise quel que soit le mode de pénétration.

On peut donc admettre dans un traitement normal, sans exclusion d'aucune voie, une absorption nettement plus grande par la coupe que par l'épiderme, cette dernière fraction pouvant

être réduite en limitant l'enfoncement des microboutures dans le substrat de prétraitement (zone I, fig. 5). Cette figure montre encore que si l'on découpe la tige des boutures en segments plus petits, plutôt que de se contenter de deux zones i et e, on retrouve les mêmes conclusions que ci-dessus, soit une accumulation dans la zone d'absorption vasculaire même limitée à un segment de 1 mm. Des vérifications avec d'autres cultivars (Tohoku) ont confirmé ces résultats.

En relation avec les enracinements effectifs enregistrés, il faut admettre que la forte dose d'auxine limitée à la base de la bouture lors du traitement PIB paraît être le facteur déterminant de l'induction racinaire.

La comparaison de cette distribution d'auxine marquée dans deux porte-greffe, l'un relativement facile à enraciner (M26), l'autre plus difficile à enraciner, excepté par la technique PIB (*Cydonia*), laisse supposer (fig. 6) que cette action due à une forte concentra-

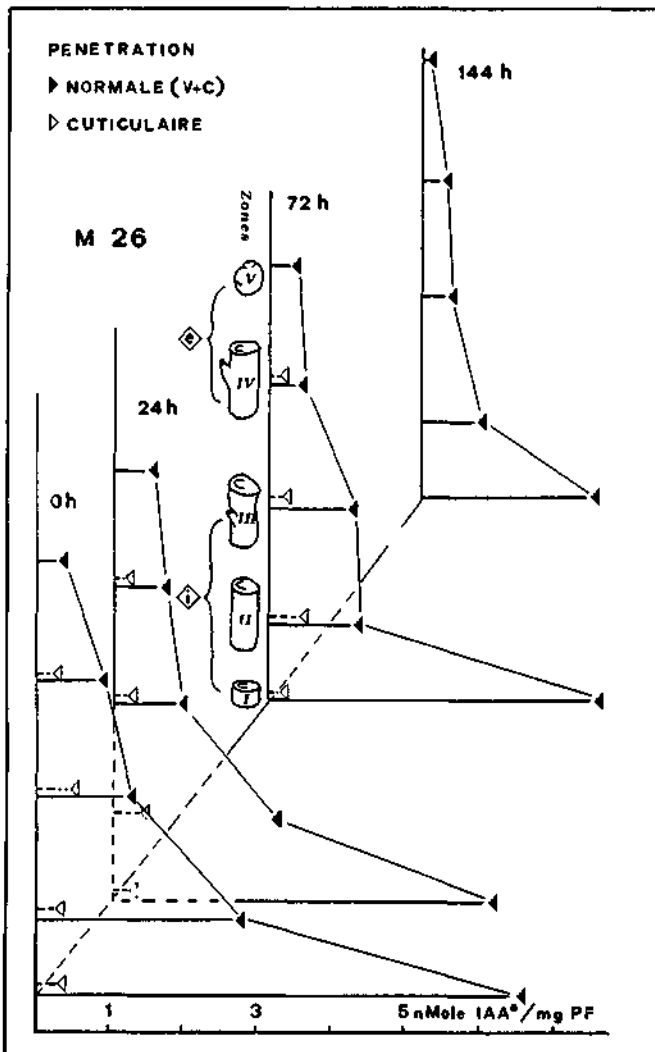


Fig. 5. Les microboutures de M26 dont on a éliminé les feuilles sont découpées en segments (zones) de 1 (I) à 3 mm (II-IV) et l'on mesure la radioactivité (nMole IAA<sup>14</sup>C/mg PF) 0 h, 24 h, 72 h et 144 h après la fin du prétraitement PIB.

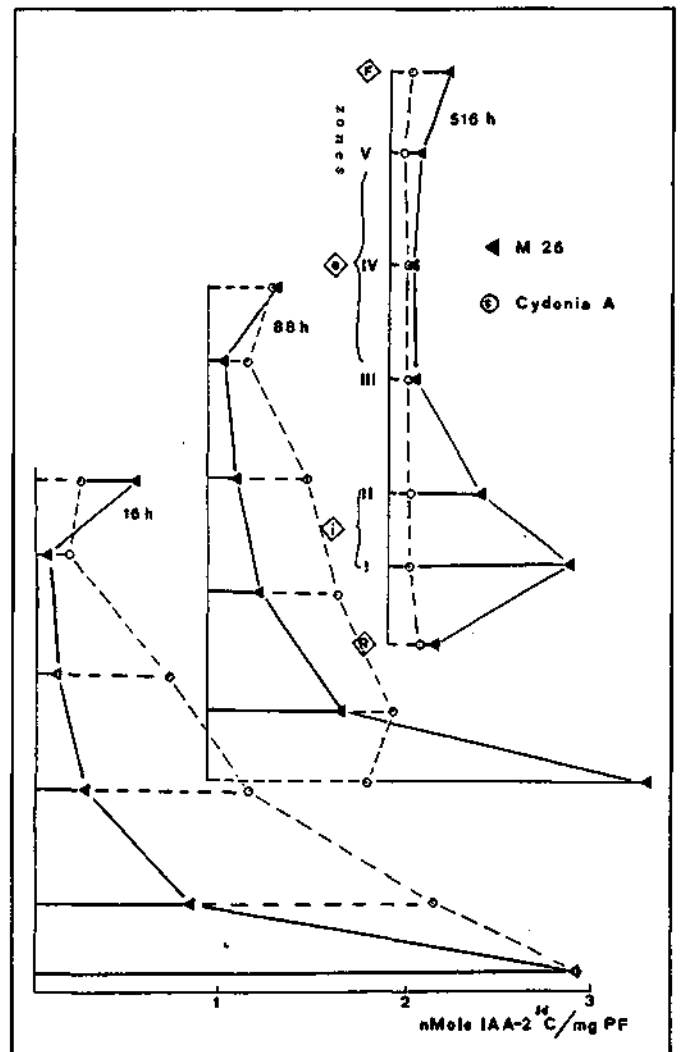
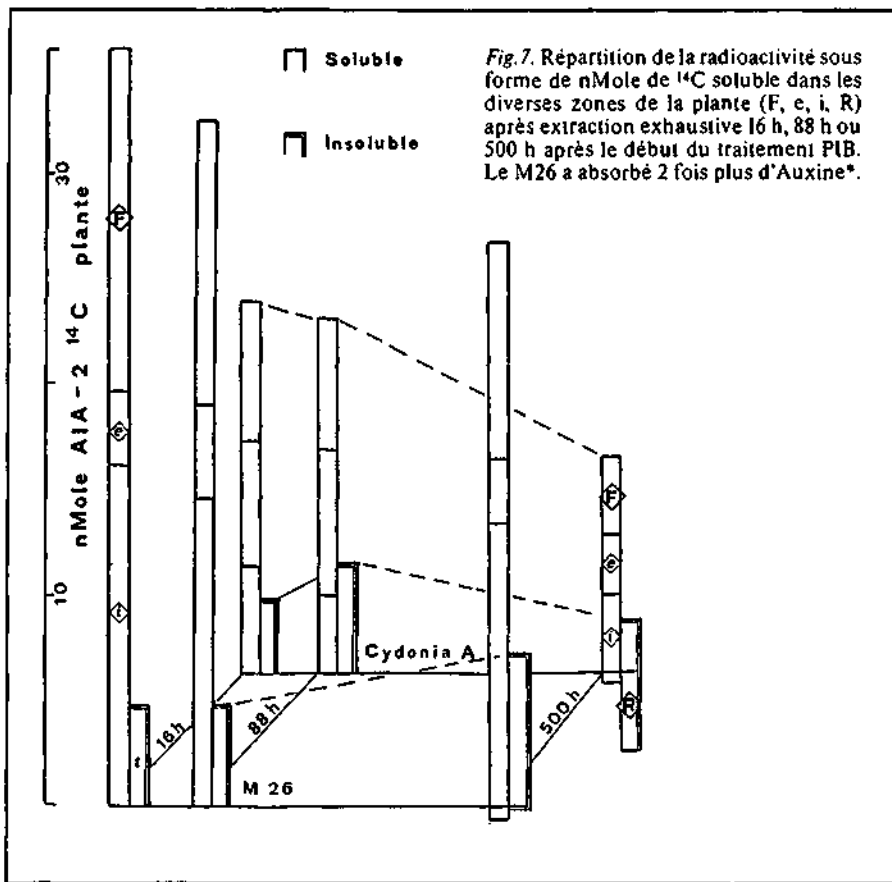


Fig. 6. Répartition de la radioactivité exprimée en nMole IAA-<sup>14</sup>C/mg PF le long de boutures du M26 et du *Cydonia A*, 16 h, 88 h et 516 h après le début du traitement PIB.



tion localisée est aussi limitée dans la durée.

Avec le M26, la distribution polarisée décrite ci-dessus et rapportée à la masse tissulaire (poids frais), se maintient jusqu'à trois semaines après le prétraitement, tandis qu'elle s'uniformise rapidement (88 h) chez le *Cydonia*. En procédant à une mesure exhaustive de la radioactivité des boutures de ces deux porte-greffe, on constate (fig. 7) que la teneur par organe se répartit entre une importante fraction hydrosoluble qui décroît faiblement au cours du temps, et une fraction plus modeste, insoluble, qui s'accroît modérément en compensation.

L'analyse chromatographique des extraits solubles permet de détecter très tôt (16 h) la disparition de l'auxine en tant que telle (fig. 8). La radioactivité est alors repérée non pas sur des produits de dégradation de l'IAA (catabolites), mais comme on pouvait s'y attendre étant donné la rapidité du phénomène, dans des produits de condensation de l'auxine avec des composés naturels de la plante, lui permettant de neutraliser rapidement sur le plan physiologique l'excès de cette auxine apportée par le traitement PIB (Col-

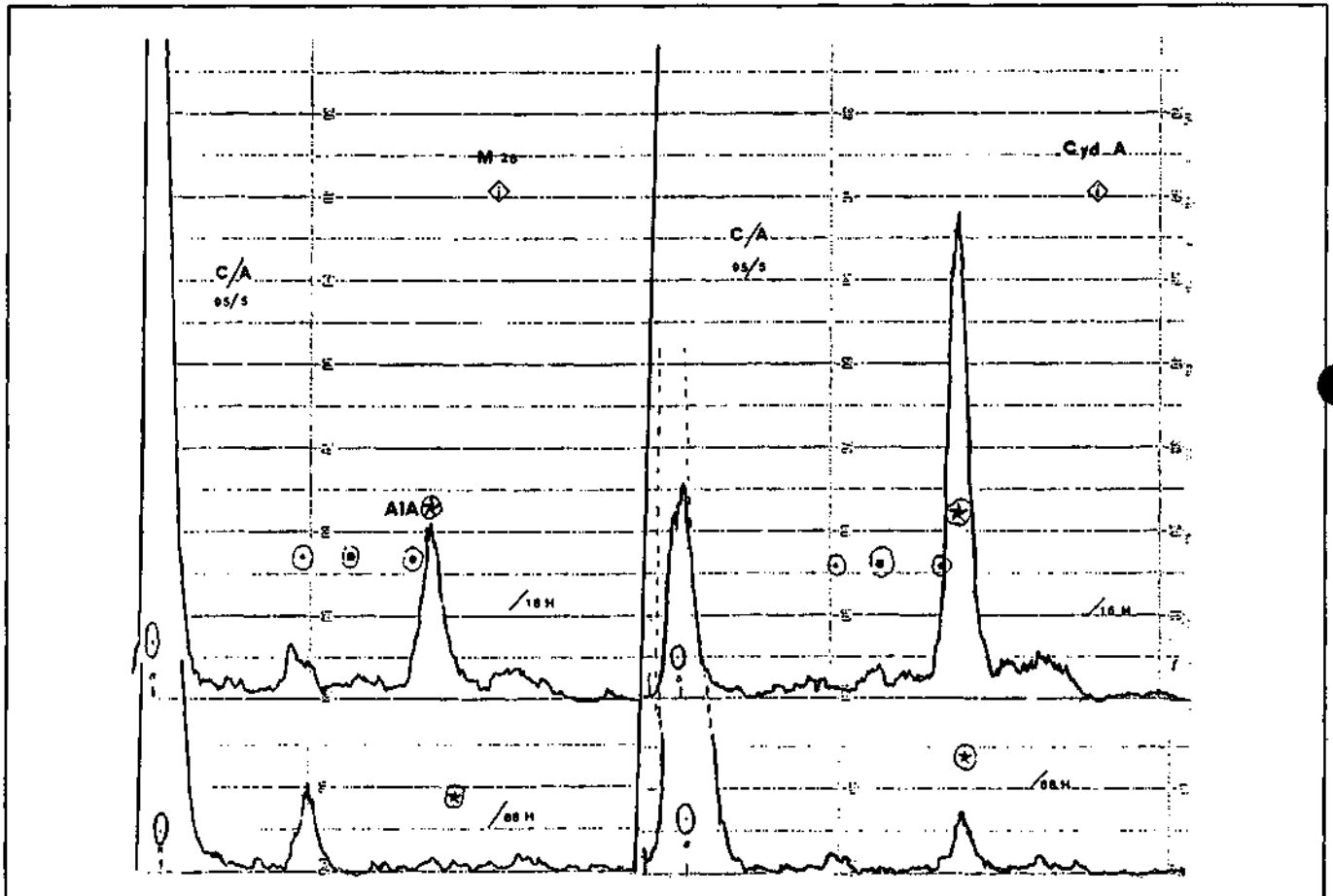


Fig. 8. Scanners de chromatographies sur couche mince de silice, élué par chloroforme ac. acétique (95/5) des extraits méthanoliques de la zone immergée de microboutures de M26 et de *Cydonia* (Cyd.A). On constate qu'entre 16 h et 88 h, la quasi-totalité de l'AIA\* a disparu au profit de composés bloqués sur la tache de départ (S).

**Tableau 9. Répartition des composés radioactifs après hydrolyse d'un extrait méthanolique de bouture M26, 72 h après le PIB et chromatographie sur couche mince (Silicagel H).**

Composé :	Rf. Ichlorolorme/acide acétique: 95/5)			
	0,0	0,25	0,56	0,75
	« condensat »	IAM IAC	IAA	?
Avant hydrolyse	93,5%		traînée 6,5%	
Après hydrolyse par NaOH 0,1 n (1 h 20°C)	75,5%	10,4%	13,5%	0,6%
Par $\beta$ glucosidase (2 h 30°C)	62,1%	8,3%	24,1%	4,3%

IAM: indolyacétamide; IAC: Ac. indolylcarboxylique.

LET, 1968, 1974). Des hydrolyses spécifiques (tabl. 9) notamment avec la  $\beta$ -glucosidase confirment ces hypothèses supposant une conjugaison de l'auxine avec le glucose notamment (ZENK, 1961).

### Sevrage

Dans nos conditions d'expérimentation, le sevrage et le développement ultérieur sont assurés à plus de 95%.

### Discussion

La nécessité d'utiliser de fortes concentrations d'auxine pour l'enracinement des microboutures de porte-greffe de pommier peut paraître surprenante puisque ces concentrations sont cent fois supérieures à celles couramment employées en culture *in vitro* (JONES *et al.*, 1977; SNIR et EREZ, 1980; WELANDER, 1983). Aussi faut-il insister sur la durée brève de pénétration de l'auxine dans la bouture. GRÖNROSS et VON ARNOLD (1985, 1987), sur *Pinus* ont fait les mêmes constatations en faveur d'un traitement de 6 h d'IBA à 1-5 mM, comparé à celui de 6 jours en présence de 0,08 mM d'auxine. De plus, ils localisent par des coupes anatomiques la réaction rhizogénique au voisinage du péricycle de leurs boutures, ce qui confirme l'origine cambiale des racines adventives formées *in vitro* (TORREY, 1965; WARDLAW, 1968; CUTTER, 1971). Il est donc nécessaire que l'auxine puisse atteindre ces cellules cibles du péricycle en quantité suffisante et rapidement, d'où l'intérêt d'une pénétration vasculaire d'une solution auxinique suffisamment concentrée.

L'apport massif mais bref induit le processus rhizogénique à la manière d'un déclat car, très vite, cette auxine est neutralisée du point de vue physiologique (COLLET, 1974), évitant ainsi les conséquences indésirables apparaissant

lors de traitements classiques, tels qu'inhibition de la croissance des nouvelles racines, ou formation de cal. ELIASSON et AREBLAD (1984) ont montré l'effet inhibiteur de faibles concentrations d'IAA (10  $\mu$ M) administrés pendant 24 h au cours des premiers jours de l'enracinement de leurs boutures de pois. Pourtant de plus fortes concentrations (100  $\mu$ M) stimulent au contraire la production de nouvelles racines, tout comme 1-10  $\mu$ M de régulateurs de croissance mimant l'effet auxinique (Ac. 2,4-dichlorophénoxyacétique, ac. naphthyl-acétique). Dans ces conditions, une meilleure connaissance du métabolisme auxinique et du site d'action est indispensable pour maîtriser cet enracinement. Les températures élevées, 25°C et 30°C, préconisées au début de l'enracinement pour l'améliorer (ROSATI *et al.*; LÉ, 1985a) contribuent à accélérer ce métabolisme. D'autre part, l'évaluation précise du cheminement de l'auxine absorbée au cours du traitement rhizogénique à l'aide d'IAA\* confirme ce que JAMES (1983) a montré sur le M9 et le M26 sans toutefois rendre compte du métabolisme auxinique, et révèle que l'action auxinique se trouve localisée à la partie basale des boutures, où précisément se forment les racines adventives (même en l'absence de cal, COLLET, 1985).

La question controversée du rôle des composés phénoliques, en particulier du phloroglucinol proposé par l'école anglaise (JONES *et al.*, 1977) n'est pas abordée. En effet, nous n'avons trouvé aucun avantage dans son utilisation lors d'essais préliminaires.

Enfin l'aspect glabre des racines produites dans l'agar pose la question de leur fonctionnalité après sevrage, à moins que l'utilité des poils absorbants ne soit limitée. La croissance rapide après sevrage des plantes enracinées *in vitro* prouve que ces racines fonctionnent normalement. CORMACK (1962),

dans une étude approfondie de la formation des poils absorbants, conclut à une élongation radiale des cellules épidermiques qu'une croissance ralentie de la racine empêche de se réaliser longitudinalement. Quant à leur importance dans l'absorption d'eau et de solutés, de nulle à plusieurs fois la capacité de la racine nue, elle dépend des conditions environnantes. Leur vie est généralement fugace et KRAMER (1956) estime leur présence non indispensable au fonctionnement de la racine.

### Conclusion

En conclusion, l'ensemble des résultats expérimentaux concernant les conditions optimales de traitement rhizogénique, réalisés ces trois dernières années sur plusieurs cultivars, nous autorise à établir les constatations suivantes, desquelles on peut tirer les règles pratiques correspondantes :

1. La répétition des subcultures *in vitro* favorise la rhizogénèse.
2. Une nutrition riche et équilibrée en phase de multiplication est nécessaire à la réalisation d'un enracinement suffisant.
3. L'apport massif, mais bref (PIB), d'auxine naturelle (IAA) à la base de la microbouture provoque une amélioration nette de la rhizogénèse par rapport au traitement à faible concentration de plusieurs jours (PIL), et cela quel que soit le cultivar expérimenté.
4. Un ajustement de la concentration auxinique optimale selon l'espèce confirme la subtilité du mécanisme d'induction.
5. La pénétration et l'accumulation de l'auxine (\*) à la base de la bouture coïncide avec la zone productrice de nouvelles racines.
6. Une conjugaison de l'auxine avec des métabolites normaux (glucose notamment) neutralise rapidement son action physiologique.
7. La détoxification rapide de l'auxine absorbée par la bouture, éliminant ainsi les effets secondaires défavorables d'une présence prolongée de l'hormone, est en accord avec une action auxinique déclenchant le processus rhizogénique, mais superflue à sa réalisation (effet déclat).

Ainsi pratiquement, le succès d'un bon enracinement est assuré par la qualité des microboutures et un prétraitement inducteur conforme aux besoins physiologiques du matériel végétal cultivé.

## Bibliographie

- COLLET G. F., 1968. Métabolisme intracellulaire et extracellulaire de l'acide 3-indolylacétique dans les cultures aseptiques ou non aseptiques de pointes de racine du *Pisum sativum*. *Canadian Journal of Botany* 46, 969-978.
- COLLET G. F., 1974. Respective importance of the conjugation and degradation for the neutralization of physiological active compounds. In *Plant growth substances 1973*, 404-416. Proceedings of the 8th international Conference on plant growth substances, Tokyo, Japan. Hirokawa Publ. Co. Inc. Tokyo, 1974.
- COLLET G. F., 1985. Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 17 (4), 259-263.
- COLLET G. F., DUBOUCHET J. et PILET P. E., 1964. Etude, par chromatographie sur couche mince, de quelques composés indoliques. Méthodes et premiers résultats. *Physiol. Vég.* 2 (2), 157-194.
- COLLET G. F. et LÉ L. C., 1987. Micropropagation de porte-greffes de pommier et de poirier. I. Etablissement et multiplication *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, M26, M27, MM106, M9 type York) et de *Cydonia oblonga* Mill (A). *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 19 (4), 253-259.
- CORMACK R. G. H., 1962. Development of root-hairs in angiosperms. *Botanical Review* 28, 446-464.
- CUMMINS J. N. and ALOWINCKLE H. S., 1982. New and Forthcoming Apple Rootstocks. *Fruit Varieties Journal* 36 (3), 66-73.
- CUTTER E. G., 1971. Plant anatomy: Experiment and Interpretation, part 2: Organs. Ed. Arnold Ltd. 41, Maddox Street, London W1ROAN. 343 p.
- DUNLAP J. R., KRESOVICH S. and MCGEE R. E., 1986. The effect of Salt concentration on Auxin Stability in Culture Media. *Plant Physiol.* 81, 934-936.
- ELIASSEN L. et AREBLAD K., 1984. Auxin effects on rooting pea cuttings. *Physiol. Plant.* 61, 293-297.
- GRÖNROOS R. and VON ARNOLD S., 1985. Initiation and development of wound tissue and roots on hypocotyl cuttings of *Pinus sylvestris* *in vitro*. *Physiol. Plant.* 64, 393-401.
- GRÖNROOS R. and VON ARNOLD S., 1987. Initiation of roots on hypocotyl cuttings of *Pinus contorta* *in vitro*. *Physiol. Plant.* 69, 227-236.
- JAMES D. J., 1983. Adventitious root formation *in vitro* in apple rootstocks (*Malus pumila*). II. Uptake and distribution of indol-3yl acetic ac. during the auxin-sensitive phase in M9 and M26. *Physiol. Plant.* 57, 154-158.
- JAMES D. J. et THURROB I. J., 1979. Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M9. *Journal of Horticultural Science* 54, 309-311.
- JONES O. P., 1967. Effect of benzyladenine on isolated apple shoots. *Nature* 215, 1514-1515.
- JONES O. P., HOPGOOD M. E. et O'FARRELL D., 1977. Propagation *in vitro* of M26 apple rootstocks. *Journal of Horticultural Science* 52, 235-238.
- KRAMER P. J., 1956. Roots as absorbing organs in *Encyclopedia of Plant Physiology*. Ed. W. Ruhland. Vol. 3, 188-214.
- LÉ C. L., 1985a. Influence of Temperature on *in vitro* Root Initiation and Development of Apple Rootstock M26. *HortScience* 20 (3), 451-452.
- LÉ C. L., 1985b. Multiplication clonale *in vitro* du pommier (*Malus domestica* Borkh., var. Gravenstein). *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 17 (5), 311-315.
- MALFATTI H., VALLEE J. C., PERDRIZET E., CARRÉ M. et MARTIN C., 1983. Acides aminés et amines libres d'explants foliaires de *Nicotiana tabacum* cultivés *in vitro* sur des milieux induisant la rhizogénèse ou la caulogénèse. *Physiol. Plant.* 57, 492-498.
- MASSERON A., 1986. PAJAM®1 (Lancep), PAJAM®2 (Cepiland). Deux nouvelles sélections de Paradis Jaune de Meiz, porte-greffe du pommier. *Infos - CTIFL* 18, 37-38.
- ROSATI P., MARINO G. and SWIERCZEWSKI C., 1980. *In vitro* propagation of Japanese Plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Calita). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 105 (1), 126-129.
- SEEMÜLLER E., SCHAPER U. and KUNZE L., 1986. Effect of pear decline on pear trees on "Quince A" and *Pyrus communis* seedling rootstocks. *Zeitschrift f. Pflanzenkrankheiten u. Pflanzenschutz Journal of Plant Diseases and Protection* 93 (1), 44-50.
- SNIR I. and EREZ A., 1980. *In vitro* Propagation of Malling Merion Apple Rootstocks. *Hort Science* 15 (5), 597-598.
- SRISKANDARAJAH S. and MULLINS M. G., 1981. Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. *Journ. of Hort. Science* 56 (1), 71-76.
- SRISKANDARAJAH S., MULLINS M. G. and NAIR Y., 1982. Induction of adventitious rooting *in vitro* in difficult to propagate cultivars of apple. *Plant Science Letters* 24, 1-9.
- TORREY J. D., 1965. Physiological bases of organization and development in the root. In *Handb. der Pflanzenphysiologie*. Vol. 15. Springer-Verlag, Berlin, 1256-1327.
- WARDLAW C. W., 1968. Morphogenesis in plants. A contemporary study. Ed. Methuen & Co Ltd. 11, New Fetterlane, London EC4, 451 p.
- WELANDER M., 1983. *In vitro* rooting of the apple rootstock M26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiol. plant.* 58, 231-238.
- ZENK M. H., 1961. 1-(indole-3-acetyl)  $\beta$  - D glucose, a new compound in the metabolism of indole-3-acetic acid in plants. *Nature* 191 (4787), 493-494.

### Summary

*In vitro* rooting of apple rootstocks (*Pyrus malus* L.) and Quince (*Cydonia*) requires the production of well-developed micro-cuttings and an auxin pretreatment suited to every cultivar. A high level of auxin (0.3-3 mM IAA) in combination with a short period of treatment improves significantly the rhizogenesis of these micro-cuttings, whatever the cultivar may be. The study of the translocation of IAA-2<sup>14</sup>C and its metabolism elucidates the optimum conditions required for rooting.

### Zusammenfassung

*In vitro*-Wurzelbildung von Unterlagen der Apfelsorte (*Pyrus malus* L.) und der Quitlsorte (*Cydonia*) erfordert die Produktion gut entwickelter Microstecklinge sowie eine jeder Sorte angepasste Auxin-Vorbehandlung. Eine hohe Auxin-Konzentration (0,3-3 mM IAA) sowie eine kurze Behandlungszeit verbessern in hohem Masse die Wurzelbildung dieser Stecklinge ungeachtet Sorte. Die Untersuchung der IAA-2<sup>14</sup>C-Verteilung sowie dessen Stoffwechsel zeigen diese optimalen Wurzelbildungsbedingungen.

## Chronique

### Un nouveau livre

### L'Œnologie

par Colette Navarre, 1987, 320 pages, nombreuses figures et tableaux. Editions Lavoisier, Technique et Documentation, 11, rue Lavoisier, F-75384 Paris Cedex 08. Prix: 148 francs français. En vente dans toutes les bonnes librairies ou chez l'éditeur.

Extraits du sommaire :

- *La matière première* : La vendange - Etude des constituants chimiques de la vendange - La récolte - Amélioration de la vendange.
- *Transformation de la matière première* : Fermentation alcoolique - La fermentation malolactique.
- *Opérations communes à toutes vinifications* :

Traitements mécaniques de la vendange - Le sulfitage - Maîtrise de la fermentation alcoolique.

- *Les vinifications* : Vinification en rouge - Vinification en blanc et en rosé - Vinifications spéciales.
- *Le vin et son élevage* : Etude du vin - Maturation et vieillissement - Clarification naturelle - Les traitements particuliers - Goûts défec-tueux.
- *Analyse des vins* : Notion d'analyses chimiques - La dégustation.

Colette Navarre enseigne l'œnologie dans des établissements d'enseignement technique agricole équipés de façon moderne et producteurs d'une gamme étendue de vins d'appellation, d'origine et de qualité dont certains méritent l'appellation de grands vins. En auteur expérimenté, C. Navarre propose au lecteur une somme considérable de connaissances scientifiques

et de données pratiques sur la transformation du jus de raisin, sur les vinifications, l'élevage et la détermination de qualités des vins et sur l'économie de leur production.

Elle apporte une indéniable contribution à la science œnologique moderne, qu'il s'agisse de techniques de vinification, des matériels œnologiques, ou des méthodes d'analyse, pour lesquels elle présente les derniers acquis.

La recherche constante de la qualité, l'adaptation aux exigences des différents marchés et à l'évolution du goût du consommateur tout en conservant les apports de la tradition vinicole française, tels sont les objectifs auxquels répond ce manuel, conçu de façon claire, rigoureuse et moderne.

*L'Œnologie* est un ouvrage qui s'adresse aux élèves, aux stagiaires et aux formateurs de l'enseignement et de la formation professionnelle, ainsi qu'aux techniciens œnologues.

# Conservation *in vitro* de l'assortiment suisse des variétés de pommes de terre

C. L. LÉ et G.-F. COLLET, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

## Introduction

L'utilisation récente des techniques de culture *in vitro* pour conserver les ressources génétiques, notamment pour les espèces végétales économiquement importantes (WILKINS *et al.*, 1982; HENSHAW, 1982; WITHERS, 1983), a connu depuis la dernière décennie un essor considérable. Dans les faits, il s'agit de maintenir l'espèce végétale, sélectionnée pour ses caractères intéressants, sous forme d'organes, tissus ou cellules, dans des conditions de température extrêmement basse ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) où toutes les activités métaboliques sont suspendues, ou alors de ralentir fortement la croissance avec l'aide des facteurs nutritionnels et de l'environnement de la culture (WITHERS, 1980, 1985).

Pour le cas de la pomme de terre, dont la reproduction s'effectue principalement par voie végétative, étant donné son caractère génétique hétérogène et son taux de multiplication réduit (MAHLSTEDE et HABER, 1957), la conservation des variétés cultivées nécessitait, dans le passé, d'importants travaux aussi bien pour le renouvellement des têtes de clones en champ que pour le stockage dans des locaux climatisés. Ces nombreuses manipulations exposent inévitablement le matériel végétal à divers aléas entraînant parfois la perte pure et simple d'éléments d'un grand intérêt agronomique.

Pour parer à ces inconvénients, des expériences de conservation *in vitro* ont donc été entreprises depuis plusieurs années afin de déterminer les possibilités de la nouvelle technique dans le maintien des génotypes intéressants :

GROUT et HENSHAW (1978), puis HENSHAW *et al.* (1980) montrent pour la première fois que la conservation des extrémités de pousses de pomme de terre dans de l'azote liquide (Cryogénie) peut être considérée comme un moyen pratique pour remplacer le stockage traditionnel. NOZÉLAN *et al.* (1977) signalent que les microboutures des variétés Bintje, BF 15 et Ackersgen peuvent être maintenues vivantes pour une durée de 4 mois au moins, à  $3^{\circ}\text{C}$ , en conditions de culture stériles. Alors que WESTCOTT *et al.* (1977 a, b) et WESTCOTT (1981) indiquent, pour leur part, que la fréquence de transfert *in vitro* des 15 cultivars expérimentés en Grande-Bretagne peut être abaissée de quatre mois à une année, sans que la survie de ce matériel ne soit affectée, si l'on maintient les cultures dans un environnement dont l'alternance de températures est de  $6^{\circ}\text{C}$  la nuit et  $12^{\circ}\text{C}$  le jour, avec une photopériode de 16 heures. MIX (1983, 1985) fait également mention de la conservation de plus de deux cents variétés de pommes de terre, à la température de  $10^{\circ}\text{C}$ , grâce à l'adjonction au milieu nutritif d'un agent ralentisseur de croissance, permettant effectivement de prolonger l'intervalle des repiquages *in vitro* jusqu'à deux ans environ. En constatant avec CHEN et LI (1980), que la température critique pour cette espèce, pourtant non résistante au gel, se situe à  $-3^{\circ}\text{C}$ , une conservation de longue durée au voisinage de  $0^{\circ}\text{C}$  de bourgeons des diverses variétés de *Solanum tuberosum* devrait être possible sans inhibiteurs métaboliques artificiels. Même si, à ces basses températures, la plante présente des modifications physiologiques importantes, en particulier au niveau de

## Résumé

Nous décrivons la possibilité de conserver *in vitro* pendant de longues périodes des variétés de pommes de terre cultivées en Suisse.

Des microboutures de pomme de terre comportant un nœud sont mises en culture sur un milieu nutritif agarisé renfermant des sels minéraux (LÉ et COLLET, 1985) et sont maintenues à la température de  $2$  à  $4^{\circ}\text{C}$  avec une photopériode de 12 h par cycle de 24 h.

La survie est assurée pour toutes les variétés expérimentées pendant au moins 12 mois. Elle peut se prolonger pour certaines variétés jusqu'à plus de 3 ans.

Une comparaison portant sur la capacité de régénération des microplantes conservées à basse température et celles qui sont subcultivées périodiquement y est également relatée.

la photosynthèse et de la respiration (STEFFEN et PALTA, 1987), on peut espérer sa survie sans altération irréversible.

Les recherches décrites dans le présent article ont pour objectif de développer une technique simple et fiable, qui permette de conserver des variétés de pommes de terre de l'assortiment suisse pendant une période de trois ans ou plus, sans qu'un transfert soit nécessaire, et cela en vue de constituer une collection de souches de base parfaitement saines, prêtes à toute utilisation éventuelle.

**Tableau 1. Liste des variétés de pommes de terre conservées *in vitro*.**

Variétés précoces	Variétés mi-précoces	Variétés mi-tardives	Variétés tardives
Christa Colmo* Ostara Sirtema Ukama	Bintje Désirée Granola Nicola Palma Stella Urgenta	Aula Eba Erntestolz Hertha Maritta Saturna	Cosima* Tasso

\*Variétés radiées de la liste officielle en 1985.

## Matériel et méthodes

### Matériel végétal

Les essais ont été réalisés principalement avec des variétés de pommes de terre de l'assortiment suisse (tabl. 1). En raison de leur retrait de la liste officielle en 1985, les variétés Colmo et Cosima n'ont pas été maintenues dans les essais de recouvrement de la capacité de tubérisation.

### Production de microplantes pour la conservation

Afin d'obtenir rapidement un nombre suffisant de plantes nécessaires aux travaux de conservation, ces variétés de pommes de terre sont microbouturées *in vitro* selon les techniques décrites précédemment (LÉ et COLLET, 1985; REUST et LÉ, 1985). Rappelons néanmoins les conditions de la culture qui sont les suivantes: photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures; éclairage de  $1800 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  fourni par des tubes fluorescents de 215 W (Sylvania Cool White); températures de  $18^\circ\text{C} \pm 1$  en phase éclairée et de  $16^\circ\text{C} \pm 1$  en phase obscure.

### Conservation *in vitro*

Dans les premiers essais, les microplantes atteignant le stade de développement de 3 ou 4 nœuds sont placées dans une enceinte de culture climatisée où la température est abaissée progressivement, pendant trois semaines, à  $2-4^\circ\text{C}$ , dans les tubes de culture. Ils sont ensuite maintenus définitivement à cette température.

Cette phase de préconditionnement a été supprimée dans les travaux ultérieurs, à la suite d'observations (résultats non publiés) montrant qu'il n'existe pas de différence notable entre les microplantes préconditionnées et celles qui sont transférées directement de  $18^\circ\text{C} \pm 1$  à  $2-4^\circ\text{C}$  quant à leur survie en chambres frigorifiques.

Le milieu de culture de base utilisé dans cette phase est celui de COLLET (1985) ne contenant ni régulateur de

croissance, ni agent cryoprotecteur qui protège contre les effets du froid (LÉ et COLLET, 1985).

Les cultures sont éclairées, durant toute la période de l'essai, à raison de 12 heures par jour par des tubes fluorescents Mazda AVIVA/TF 65 AV1 donnant une intensité de  $385 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ . La suppression de l'éclairage après 12 mois a été tentée sur une part des essais.

### Estimation de la survie des microplantes

Pour chaque essai, des lots de 20 à 30 microplantes de chaque variété de pomme de terre sont mis en conservation dans les conditions susmentionnées. La survie des microplantes a été déterminée à différentes époques (après 6, 12, 24 et 36 mois) en transférant les bourgeons en voie de tubérisation au cours de la conservation sur un milieu neuf et de même composition que celui utilisé pour le microbouturage (LÉ et COLLET, 1985), et en notant leur taux de développement après quatre semaines de culture en chambre climatisée.

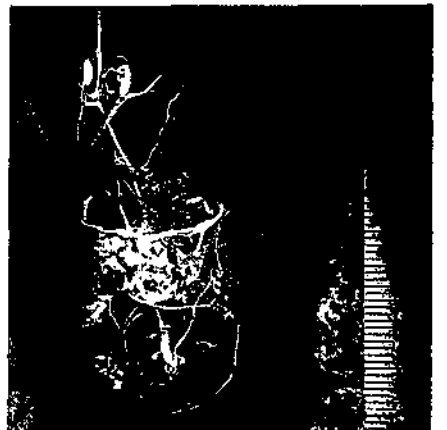
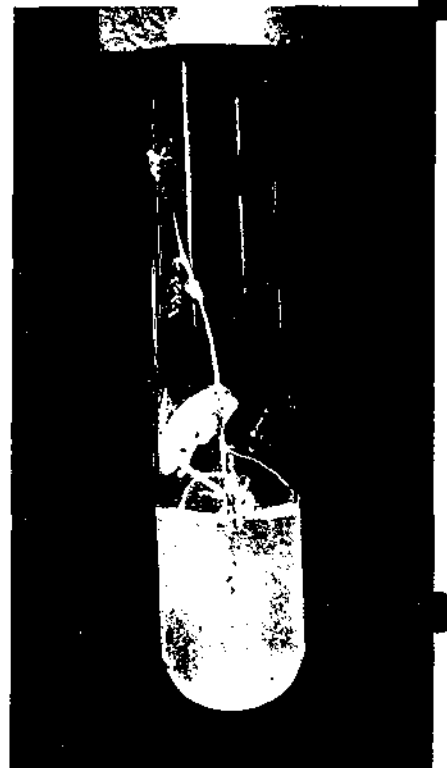
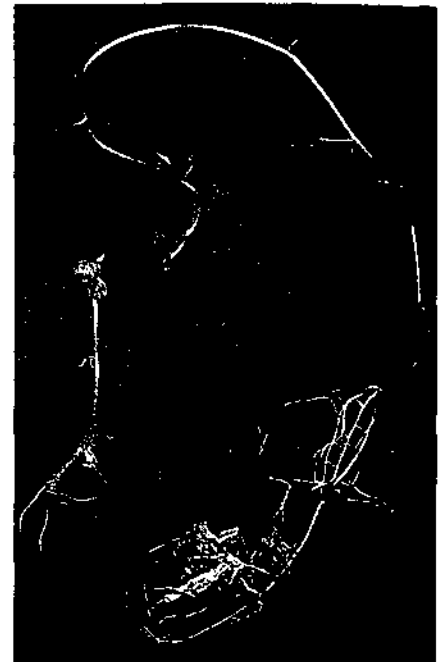
### Recouvrement de la capacité de tubérisation

Une comparaison portant sur l'importance du mode de conservation sur le recouvrement de la capacité de tubérisation a été effectuée entre les variétés subcultivées périodiquement toutes les quatre semaines et celles conservées pendant 12 à 24 mois. La technique utilisée pour induire la tubérisation est identique à celle décrite dans une publication précédente (REUST et LÉ, 1985).

Fig. 1. Effet de la réduction de la température sur la croissance des microboutures en culture *in vitro*: plante conservée à  $2-4^\circ\text{C}$  (à gauche) et maintenue à  $18^\circ\text{C} \pm 1$  (à droite) après deux mois de culture.

Fig. 2. Organes de conservation (bourgeon tubérisé) développés dans la partie distale sur la variété Bintje.

Fig. 3. Organes de conservation, développés dans le milieu nutritif, de la variété Maritta.



# Résultats et discussion

## Conservation *in vitro*

### Organea de conaervation

L'abaissement de température bloque la croissance de la microbouture (fig. 1), tandis qu'au cours des trois premiers mois suivant la mise en conservation à basse température, les jeunes bourgeons axillaires déjà formés se transforment peu à peu en organes de conservation rappelant la formation des tubercules sur les plantes cultivées en conditions de culture traditionnelles.

L'évolution des bourgeons axillaires en organes permettant le maintien du potentiel de vie des microboutures continue ainsi jusqu'au 6<sup>e</sup> mois pour donner naissance à de courts stolons plus ou moins gonflés (tubérisation?) qui restent accrochés à la tige dans la partie distale (fig. 2), ou pénètrent dans le milieu nutritif (fig. 3) pour ceux formés dans la partie proximale.

L'absence de lumière dès le début de la conservation au froid empêche la plante de s'acclimater, et celle-ci meurt en quelques semaines.

### Comportement des organes de conaervation

Les résultats présentés dans le tableau 2 montrent que les organes de conservation formés dans la partie proximale de la microplante ont une meilleure reprise à la croissance que ceux développés dans la partie distale. Cette différence de comportement entre les deux sites de développement peut s'expliquer par la proximité, pour les bourgeons inférieurs, du substrat

Tableau 2. Influence de la position des organes de conservation (bourgeons tubérisés) sur la reprise de croissance à 20°C, en conditions axéniques, après 12 mois de conservation à 2-4°C.

Variétés	Taux de survie %	
	Partie distale	Partie proximale
Aula	0	100
Bintje	50	100
Christa	0	100
Colmo	25	100
Eba	50	100
Erntestolz	0	100
Granola	50	100
Nicola	0	100
Ostara	75	100
Ukama	50	100

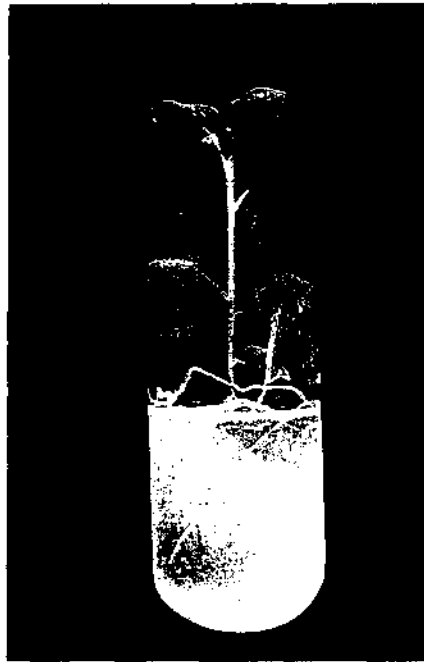


Fig. 4. Reprise de croissance de l'organe de conservation après 4 semaines de culture sur milieu nutritif neuf.

nourricier jouant un double rôle de protecteur et de réserve nutritive. En revanche, dans la partie distale les mêmes ébauches de stolons ne sont plus alimentées à la suite de la dessiccation progressive des tiges variables selon la variété : figures 2 et 3.

Ainsi selon sa position, le stolon prélevé sur la plante conservée à basse température présente une grande différence de régénération. En effet, les organes développés sur la tige des microplantes (partie distale) ont un potentiel de vie limité contrairement à ceux qui sont protégés (partie proximale) par le milieu nutritif et qui n'ont révélé aucune modification notable lors du retour en conditions de culture axénique favorables (+ 20°C, milieu neuf) (fig. 4).

### Survie des organes de conservation

La figure 5 illustre le taux de survie des organes de conservation de différentes variétés de pommes de terre cultivées en Suisse, après 12, 24 et 36 mois de conservation *in vitro*. On constate, au fur et à mesure du prolongement de la période de conservation en milieu axénique, une réduction du taux de survie des stolons, formés en cours de culture, et cela pour l'ensemble des variétés en expérimentation. En effet, la totalité de nos variétés conservées ont retrouvé leur cycle de croissance sans aucune difficulté (100%) après 12 mois de

conservation. Après 24 mois de culture dans les mêmes conditions d'environnement, seuls 80% des cultivars ont été régénérés. Cette capacité de régénération diminue encore (35%) lorsqu'on prolonge la période de stockage à 36 mois. WESTCOTT *et al.* (1977 a) ont mentionné l'obtention d'une moyenne de survie de 60%, après douze mois de conservation à 6°C, pour l'ensemble des dix-sept variétés de pommes de terre expérimentées au CIP (Centro internacional de la papa). Ce faible taux de réussite pour une courte durée de conservation obtenu par ces auteurs pourrait être dû, d'une part, à la température de conditionnement plus élevée que celle pratiquée dans nos essais et, d'autre part, à la forte teneur en éléments nutritifs entrant dans la composition de leur milieu de culture.

En outre, il est intéressant de signaler que, dans le cas présent, la diminution du taux de survie des variétés de pommes de terre en conservation *in vitro* ne peut être attribuée aux caractères de précocité. On note de fortes variations de reprise de croissance, selon les variétés observées. Cette constatation corrobore en partie celle obtenue par MIX (1985) sur les variétés de pommes de terre cultivées en Allemagne sur un milieu de culture liquide.

### Croissance et tubérisation *ex vitro*

La conservation *in vitro* des variétés de pommes de terre sur un milieu de culture solide ne peut être considérée comme moyen de stockage pratique et fiable que lorsque la capacité de tubérisation des microplantes régénérées n'est pas perturbée pour une raison ou une autre après de longs mois de vie en latence. A cet effet, une comparaison, portant sur le recouvrement du pouvoir de tubérisation entre les individus subcultivés périodiquement toutes les quatre semaines et ceux maintenus *in vitro* pendant 12 à 24 mois et plus, a été conduite dans des conditions de culture en serre, afin de voir si l'abaissement de la température ou d'autres facteurs de l'environnement avaient exercé une quelconque influence sur ce processus. L'examen de la figure 6 fait ressortir qu'effectivement le recouvrement de la capacité de tubérisation des microplantes conservées *in vitro* à basse température n'est en aucun cas modifié au cours du stockage.

Cependant, on remarque un faible taux de reprise de croissance en serre chez la plupart des variétés conservées par rapport à celles microbouturées ré-

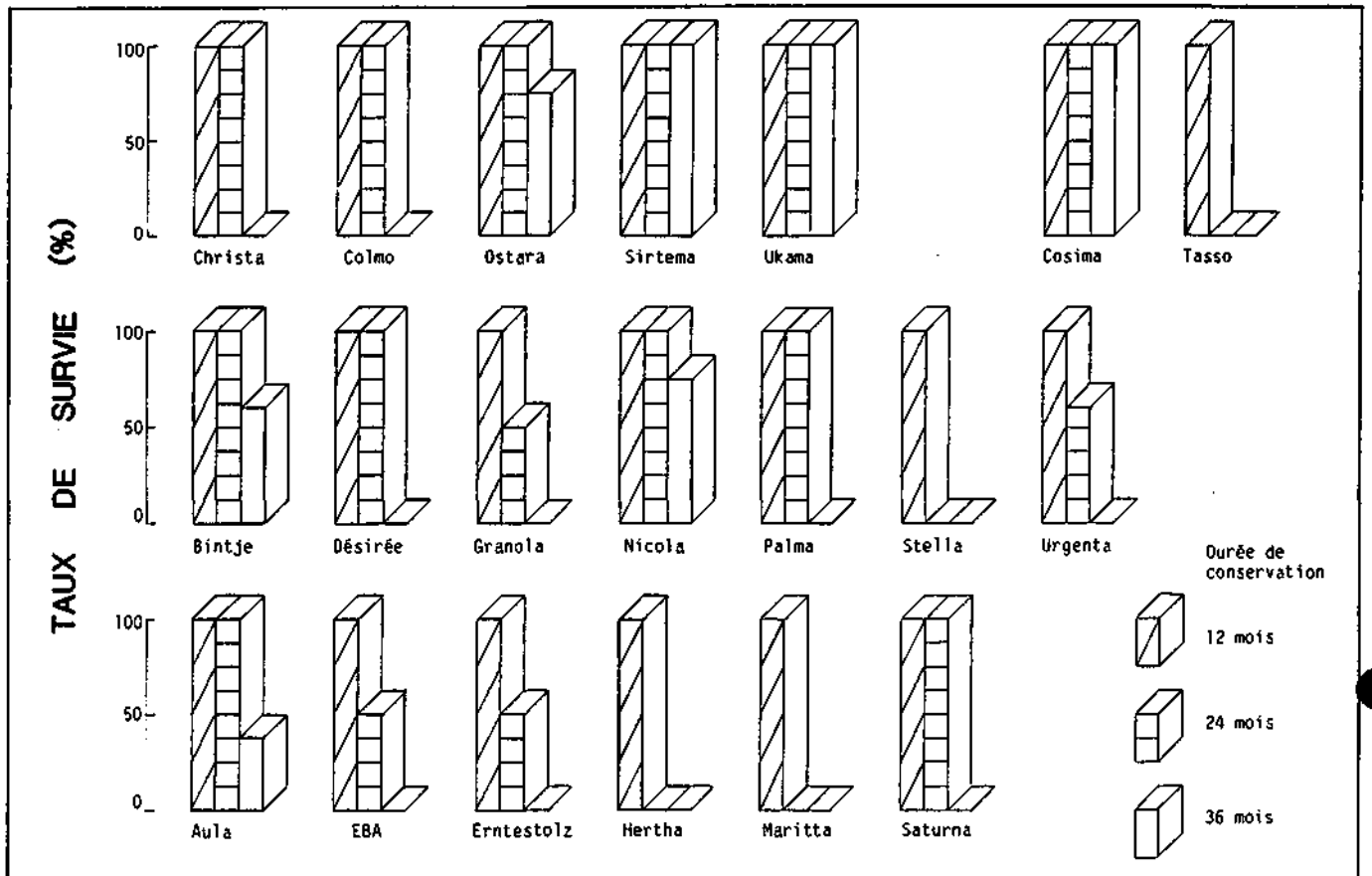


Fig. 5. Taux de survie des organes de conservation de différentes variétés de pommes de terre cultivées en Suisse, après 12, 24 et 36 mois en conservation *in vitro*.

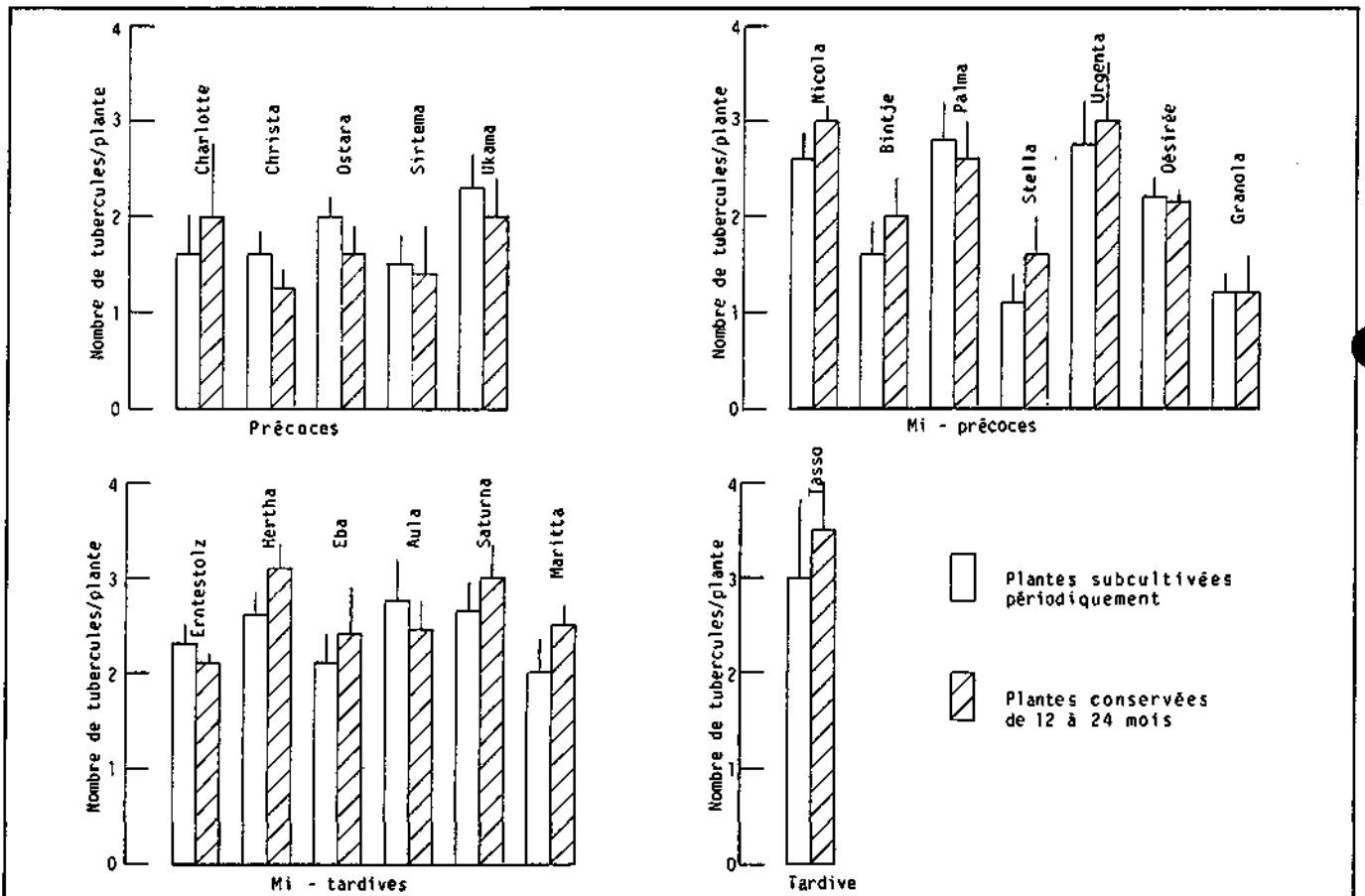


Fig. 6. Influence du mode de conservation *in vitro* sur la tubérisation des différentes variétés de pommes de terre cultivées en Suisse. Durée de conservation: 12 à 24 mois. Le trait vertical au-dessus des colonnes représente l'erreur-type.

gulièrement sur un milieu nutritif neuf. Cette différence semble être due à la perte de matériel végétal provoquée par la contamination du substrat de culture par des micro-organismes pathogènes, lors de la mise en place des microplantes en serre. Pour ce dernier point, il est intéressant de relever ici le rôle important que revêtent les exigences bien particulières des microplantes lors du « sevrage » (transfert *in vitro* → *ex vitro*), portant sur la qualité physico-chimique des composants servant de substrat nourricier (REUST et LÉ, 1985), et d'autre part celui du processus d'acclimatation permettant la reprise de manière graduelle de certains mécanismes physiologiques (par exemple régulation stomatique), qui jusqu'alors ne sont pas encore entrés en fonction, comme l'a montré LÉ (1985, 1987), lors du sevrage du pommier et de l'hysope.

En ce qui concerne le nombre de tubercules produits après ces deux modes de conservation, les résultats présentés sur la figure 6 montrent qu'il n'existe pas de différence significative pour l'ensemble des variétés mises en culture. Toutefois on remarque un faible rendement en tubercules chez certaines variétés précoces et mi-précoces en comparaison avec les variétés tardives ou mi-tardives; cela nous laisse supposer que le caractère de précocité lié au génotype ainsi que les conditions d'environnement de culture durant la période hivernale (décembre-janvier) pourraient être en partie à l'origine de cette différence dans le développement des minitubercules, comme l'ont observé Reust et Lé (1985) sur la tubérisation des variétés Ukama et Nicola en conditions de serre pendant les mois d'hiver.

### Zusammenfassung

Wir beschreiben in dieser Arbeit die Möglichkeit die in der Schweiz angebauten Kartoffelsorten *in vitro* zu konservieren.

Kartoffelstecklinge mit einer Achselknospe werden auf einem Agar-medium mit Mineralsalzen (Lé et Collet, 1985) bei einer Temperatur von 2 bis 4°C und einer Photoperiode von 12 Stunden pro Tag kultiviert.

Für alle experimentierten Sorten ist das Überleben während mindestens 12 Monaten gewährleistet. Es kann sich für manche Sorten auf über 3 Jahre hinaus verlängern.

Ein Vergleich der Regenerationskapazität der bei niedriger Temperatur konservierten Stecklinge und die der periodenweise Subkultivierten Stecklinge wird ausführlich berichtet.

## Conclusion

La conservation *in vitro*, selon notre méthode, est exploitée pour le maintien de l'assortiment suisse des variétés de pommes de terre et présente les avantages suivants :

- une protection efficace contre les risques potentiels d'infection provoqués par la présence permanente de micro-organismes pathogènes que comporte le stockage traditionnel;
- un approvisionnement rapide et sans limite en plants de base sains, en y associant la technique de microbouturage décrite auparavant (REUST et LÉ, 1985);
- un abaissement significatif des frais engagés dans le maintien des génotypes intéressants par la miniaturisation des organes de réserve et la réduction des surfaces de stockage;
- une programmation possible et sans contrainte des travaux de renouvellement du matériel de base à long terme.

D'autres travaux visant à démontrer la conformité des variétés de pommes de terre conservées *in vitro* sont en cours de réalisation.

## Remerciements

Nos remerciements s'adressent tout particulièrement à M. D. THOMAS pour son aide technique en culture *in vitro*, ainsi qu'à MM. W. REUST et J.-P. DUTOIT pour la prise en charge des cultures en serre à Changins.

## Bibliographia

- CHEN H. H. and LI P. H., 1980. Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuberbearing *Solanum* species. *Plant Physiol.* 65, 1146-1148.
- COLLET G. F., 1985. Enracinement amélioré de la production *in vitro* de rosiers. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 17 (4), 259-263.
- GROUT B. W. W. and HENSHAW G. C., 1978. Freeze preservation of potato shoot-tips cultures. *Ann. Bot.* 42, 1227-1229.
- HENSHAW G. C., O'HARA J. F. and WESTCOTT R. J., 1980. Tissue culture methods for the storage and utilization of potato germplasm. In: *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, ed. D. S. Ingram & J. P. Helgeson, Oxford, London, Edinburgh, Boston and Melbourne: Blackwell Scientific Publications, pp. 71-76.
- HENSHAW G. C., 1982. Tissue culture methods and germplasm storage. In: *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue & Cell Culture*, ed. Fujiwara, pp. 789-792.
- LÉ C. L., 1985. Multiplication clonale *in vitro* du pommier (*Malus domestica* Borkh., var. Gruvenstein). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 17 (5), 311-315.
- LÉ C. L., 1987. Multiplication *in vitro* de l'hysope (*Hyssopus officinalis* L.). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 19 (6), 363-367.

- LÉ C. L. et COLLET G. F., 1985. Assainissement de la variété de pomme de terre Sangema. Méthode combinant la thermothérapie *in vitro* et la culture de méristèmes. Premiers résultats. *Rev. suisse Agric.* 17 (4), 221-225.
- MAHLSTEDE J. P. et HABER E. S., 1957. *Plant propagation*. Ed. John Wiley & Sons, New York, pp. 157-176.
- MIX G., 1983. Langzeitlagerung von Kartoffelgenmaterial *in vitro*. *Landbouwforschung Völkerode* 33, 179-182.
- MIX G., 1985. Preservation of old potato varieties. In: *In vitro Techniques - Propagation and long term storage* (Advances in Agricultural Biotechnology). Ed. A. Schäfer-Menuhr, pp. 149-153.
- NOZERAN R., BANCILHON-ROSSIGNOL L. and GRENAN S., 1977. Nouvelles possibilités d'obtention et de multiplication rapide de clones de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *C. R. Acad. Sc. Paris. Série D*, 285, 37-40.
- REUST W. et LÉ C. L., 1985. La multiplication rapide des pommes de terre par le microbouturage. *Rev. suisse Agric.* 17 (1), 11-18.
- STEFFEN K. L. and PALTA J. P., 1987. Photosynthesis as a key process in plant response to low temperature: alteration during low temperature acclimation and impairment during incipient freeze-thaw injury. In: *Plant Cold Hardiness*, Ed. P. H. Li R. Liss, Inc., New York, pp. 67-99.
- WESTCOTT R. J., 1981. Tissue culture storage of potato germplasm. 1. Minimal growth storage. *Potato Res.* 24, 331-342.
- WESTCOTT R. J., HENSHAW G. C., GROUT B. W. W. and ROCA W. M., 1977a. Tissue culture methods and germplasm storage in potato. *Acta Hortic.* 78, 45-49.
- WESTCOTT R. J., HENSHAW G. C. and ROCA W. M., 1977b. Tissue culture storage of potato germplasm: culture initiation and plant regeneration. *Plant Sci. Letters* 9, 309-315.
- WILKINS C. P., BENGOCHEA T. and DODDS J. H., 1982. The use of *in vitro* methods for plant genetic conservation. In: *Outlook on Agriculture*, Ed. Pergamon Press, vol. 11, No 2, pp. 67-72.
- WITHERS L. A., 1980. Cryopreservation of plant cell and tissue cultures. In: *Tissue Culture Methods for Plant Pathologists*, Ed. D. S. Ingram & J. P. Helgeson, Oxford, London, Edinburgh, Boston and Melbourne: Blackwell Scientific Publications, pp. 63-70.
- WITHERS L. A., 1983. Germplasm storage in plant biotechnology. In: *Plant Biotechnology*, Ed. S. H. Mantell & H. Smith, Cambridge University Press, pp. 187-218.
- WITHERS L. A., 1985. Long term storage of *in vitro* cultures. In: *Advances in Agricultural Biotechnology - In Vitro techniques: Propagation and Long term storage*. Ed. Schäfer-Menuhr, pp. 137-148.

## Summary

A possibility for *in vitro* long term storage of potato varieties cultivated in Switzerland is described.

Nodal minicuttings are being cultivated on a solidified agar-medium containing mineral salts (Lé et Collet, 1985), and maintained under a twelve hour photoperiod at temperatures of 2-4°C.

Successful storage for 12 months at least has been obtained for all varieties. This can be extended for some varieties to more than 3 years.

The regeneration capacity of *in vitro* long term stored plants was compared with that of regularly *in vitro* subcultivated plants.

## Rapid clonal multiplication of *Uncaria gambir* through tissue culture

C. L. L 

Station fédérale de recherches agronomiques de Changins (RAC), CH-1260 Nyon, Switzerland  
(Directeur: A. Vez)

### SUMMARY

#### *Rapid clonal multiplication of Uncaria gambir through tissue culture*

Young actively shoot Apex explants of *Uncaria gambir* were proliferated on a Murashige and Skoog (1962) medium supplemented with 1.0 mg/l  $\alpha$ -naphthylacetic acid (NAA) and 4.0 mg/l Benzyladenine (BA). Adventitious roots formation was obtained by treating microcuttings in an agar medium containing  $5 \cdot 10^{-4}$ M  $\beta$ -indolylacetic acid (IAA) for 16 hours and then transferring them to the CMS hormone-free medium (COLLET, 1985). Rooted plantlets were successfully established in soil.

Plant cell and tissue culture techniques have been well considered as a powerful tools for the propagation of a number of ornamental species [7], agronomic crops [5], and forest trees [2].

*Uncaria gambir* (Rubiaceae), a climbing shrub native to the Malay Archipelago [6] has been cultivated for the production of pale catechu, mainly used as astringent drug in medicine, and in the dyeing and tanning industries [1, 9].

This paper deals with a method for rapid multiplication of *Uncaria gambir* using tissue culture techniques.

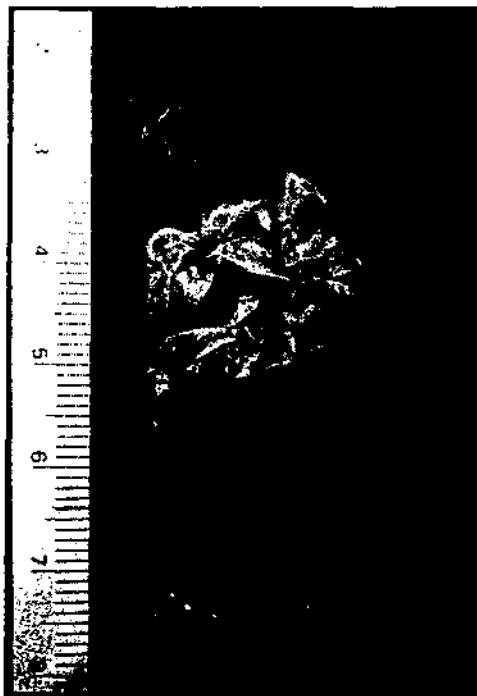


Fig. 1a. Proliferation of multiple shoots from a single shoot apex on medium containing 4 mg/l N6 Benzyladenine (BA) and 1 mg/l  $\alpha$ -naphthylacetic acid (NAA); 8 weeks after transfer on multiplication medium.



Fig. 1b. Adventitious root development on isolated shoot after a quick dip (16 hours) in  $5 \cdot 10^{-4}M$  of  $\beta$ -indolylacetic acid (IAA); 3 weeks of culture.

In the present study, shoot tips of *Uncaria gambir* (4–5 cm in length), grown under greenhouse conditions were used as explant sources. They were washed with running tap water, dipped in 70% ethanol for a few seconds, and surface-sterilized in 1% Benomyl® for 30 minutes, followed by shaking in 3% Kohrsolin® (Glutaraldehyd. N,N'-bis-[hydroxymethyl] Urea) for two times of 20 minutes each. They were finally washed in three changes of sterile distilled water and maintained in an anti-oxidant solution containing 1% ascorbic acid and 1.5% citric acid in order to prevent blackening of young active tissues. Shoot apex (ca 0.5 to 1 cm) were then excised and transferred aseptically to 12–15 ml of the appropriate culture medium.

The proliferation medium which gave the best results (Fig. 1a) was that of Murashige and Skoog [8] supplemented with (per liter) 100 mg myo-inositol, 1.0 mg thiamine-HCl, 0.5 mg pyridoxine-HCl, 0.5 mg nicotinic acid, 1.0 mg  $\alpha$ -naphthylacetic acid (NAA), 4 mg N6 Benzyladenine (BA), 30 g sucrose, 7 g Difco Bacto-Agar.

The pH of the medium was adjusted to 5.7 prior to autoclaving at  $121^{\circ}C$  ( $1.1 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ ) for 15 minutes.

All the culture tubes were incubated under a cycle of 16 hours light at  $23^{\circ}C$  and 8 hours dark at  $18^{\circ}C$ . The irradiance was  $850 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$  (400–700 nm) supplied by Mazda Aviva TF 65 W/AVI fluorescent tubes.

At 6 to 8 week intervals the newly formed shoots (5 to 6 shoots/explant), growing out from the initial explant, were subcultured on fresh medium. This process was repeated several times for production of shoots which have been used as cuttings for the rooting stage.

In order to induce rooting, the cuttings (1 cm long) taken from the *in vitro* proliferated shoots were treated according to COLLET and LÉ [4]. This consists of short dipping the cuttings overnight (16 hours) with the basal part embedded in an agar-medium containing  $5 \cdot 10^{-4}M$  of  $\beta$ -indolylacetic acid (IAA), and transferring them to the free-hormone medium CMS [3], in

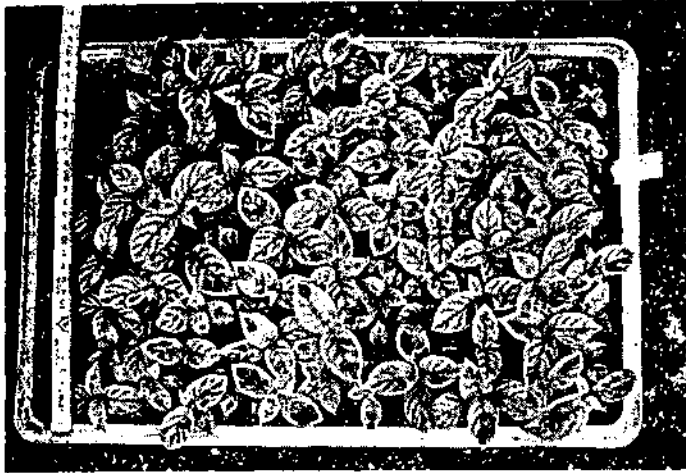


Fig. 2. Regenerated plantlets of *U. gambir* acclimatized after approximately 8 weeks in the greenhouse.

complete darkness at 28 °C, for the first three days. Afterwards, the culture tubes were maintained under the same illumination conditions as for shoot proliferation stage, for the remaining period of root development.

When roots were well developed (Fig. 1b) these rooted plantlets were removed from the aseptic cultures by thoroughly washing roots to discard excess agar from the root system and transplanted to the plastic trays filled with a 1:1:1 peat:compost:sand (v:v:v) mixture. For the initial period of transfer, the trays were maintained under fog system providing a high level of humidity during 4 to 5 days to avoid desiccation and then the plants were gradually acclimatized to the glasshouse culture conditions. The plants derived from in vitro culture grew normally without showing any phenomenon of aberration (Fig. 2).

In the absence of an effective method for multiplication, we believe that shoot apex culture would appear to be a satisfactory means of propagation of this species and large-scale micro-propagation is now quite feasible.

#### ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to the Zyma S. A. for providing the plant material and for the financial assistance. We would like to thank Dr G. F. COLLET for valuable discussion.

#### ZUSAMMENFASSUNG

##### *Klonale Vermehrung von Uncaria gambir Gewebekultur*

Gewebekultur von *Uncaria gambir* wurde mit Triebspitzenkultur auf einem veränderten Murashige & Skoog Medium (1962) mit 1,0 mg/l  $\alpha$ -Naphthylelessigsäure (NES) und 4,0 mg/l Benzyladenin (BA) durchgeführt. Die Bildung von Adventivwurzeln wurde erzielt, indem junge aktive Sprossen auf einem Agar-Bewurzelungsmedium mit  $5 \cdot 10^{-4}$ M  $\beta$ -Indolylessigsäure (IES) pikiert wurden. Nach 16 Stunden wurden diese auf ein CMS-Medium (COLLET, 1985) ohne IES überführt. Bewurzelte konnten mit Erfolg in gärtnerische Substrate verpflanzt werden.

## RÉSUMÉ

### *Multiplication clonale in vitro de l'Uncaria gambir*

De jeunes extrémités de pousses (Apex) d'*Uncaria gambir* sont proliférées sur un milieu de culture de base de Murashige et Skoog (1962) contenant 1,0 mg/l d'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA) et 4,0 mg/l de Benzyladénine (BA). Le développement des racines adventives a été obtenu en traitant les microboutures dans une solution agarisée renfermant  $5 \cdot 10^{-4}$ M d'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA) pendant 16 heures et en les transférant sur un milieu nutritif CMS (COLLET, 1985), dépourvu d'ALA. Des plantes enracinées ont ainsi été acclimatées avec succès sur substrat de culture traditionnel.

## LITERATURE CITED

- 1 BAILLON, H.: *Traité de Botanique médicale phanérogamique*. Paris Hachette edit., pp 1105—1108, 1984.
- 2 BAJAJ, Y. P. S.: *Biotechnology in agriculture and forestry 1 — Trees I* — Ed. Bajaj Y. P. S., Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 515, 1986.
- 3 COLLET, G. F.: Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.*, 17 (4): 259—263, 1985.
- 4 COLLET, G. F.; LÊ, C. L.: Micropropagation de porte-greffe de pommier et de poirier. II. Enracinement *in vitro* de *Pyrus Malus L.* (M25, 26, 27, MM106, M9) et de *Cydonia oblonga Mill.* (A). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.*, Vol 19 (4), 253—259, 1987.
- 5 CONGER, B. V.: Agronomic crops. In: *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. Ed. Conger B. V., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 165—216, 1981.
- 6 CORNER, E. J. H.: *Wayside trees of Malaya*. Ed. Corner E. J. H., sec. edit., 550, 1952.
- 7 HUGHES, K. W.: Ornamental species. In: *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. Ed. Conger B. V., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp 5—50, 1981.
- 8 MURASHIGE, T.; SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473—497, 1962.
- 9 NOEL, L. A.: *The chemistry and pharmacy of vegetable drugs*. London George Newnes Ltd., pp 203—206, 1943.

# Microbouturage *in vitro* du thym (*Thymus vulgaris* L.)

C. L. LÉ, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

## Introduction

Les techniques de culture *in vitro* sont actuellement reconnues comme un moyen exceptionnel permettant d'améliorer et de multiplier rapidement des plantes économiquement importantes (MURASHIGE, 1974; CONGER, 1981; EVANS *et al.*, 1983).

Le thym (*Thymus vulgaris* L.), un arbuste pérenne de la famille des labiées (*Labiatae*), cultivé pour ses propriétés aromatiques et médicinales (SIMON *et al.*, 1984), se prête encore difficilement à la reproduction par voie végétative traditionnelle.

Le travail présenté ici a été entrepris dans le but de mettre au point une mé-

thode de propagation rapide et fiable des têtes de clones de thym sélectionnées; cette recherche entre dans le cadre des travaux d'amélioration des plantes médicinales et aromatiques, entrepris par la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins (REY, 1988).

## Matériel et méthodes

Les essais rapportés dans ce travail ont été réalisés à partir du clone de thym 87/35, sélectionné par le Centre d'arboriculture et d'horticulture des Fougères, à Conthey.

## Résumé

La multiplication d'un thym sélectionné (clone 87/35) a été réalisée en cultivant des microboutures, comportant un nœud, sur un milieu nutritif renfermant des sels minéraux CMS (COLLET, 1985) et dépourvu de régulateurs de croissance. Plus de 90% des plantes produites *in vitro* se sont acclimatées avec succès sur un substrat de culture traditionnel.

De jeunes extrémités de pousses, prélevées sur des pieds mères élevés en serre, sont découpées en segments de 2 à 3 cm de longueur. Ces explantats sont désinfectés superficiellement par un double trempage, d'abord dans de l'hypochlorite de sodium à 0,75%, additionné d'un mélange d'antioxydants (acide ascorbique 1% + acide citrique 1,5%) et de quelques gouttes de mouillant (Teepol) puis, après un bref rinçage à l'eau distillée stérile, dans du Kohrsolin® (Glutaraldéhyde, N, N'-bis-(hydroxyméthyle) Urée (Bode & Co, Hamburg)) à 3%, pendant 15 minutes. Ils sont ensuite lavés trois à quatre fois dans un mélange contenant 50% d'eau distillée stérile et 50% d'antioxydant (acide ascorbique 1% + acide citrique 1,5%).

Les microboutures, ainsi désinfectées, sont rafraîchies à environ 1 cm de longueur (fig. 1) et placées dans des tubes de culture de 25 x 150 mm contenant 15 ml d'un milieu de base MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962 modifié), ou CMS (COLLET, 1985), renfermant ou non différentes concentrations de régulateurs de croissance appropriées à la micro-

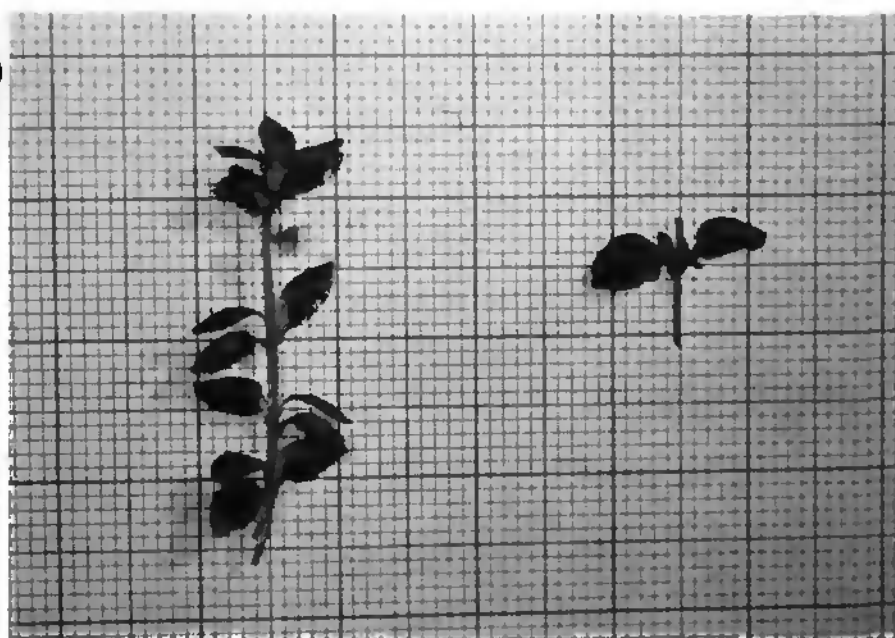


Fig. 1. Pousse de thym prélevée sur la plante mère (à gauche) et explantat fraîchement préparé pour la mise en culture (à droite).

Tableau 1. Milieux de culture de base utilisés pour la culture *in vitro* du thym.

Constituants	CMS (COLLET, 1985)	MS (MURASHIGE ET SKOOG, 1962*)
<b>Macro-éléments (mM)</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	10,30
KNO <sub>3</sub>	12,00	9,40
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,50	0,75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,62
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	1,50
Ca(NO <sub>3</sub> ).4H <sub>2</sub> O	3,00	-
<b>Micro-éléments (μM)</b>		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10	30
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100	100
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	50	100
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1	0,1
KI	5,0	5,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,1	0,1
FeNaEDTA	30	100
<b>Vitamines (μM)</b>		
Thiamine-HCl	-	3,0
Pyridoxine-HCl	-	2,4
Acide nicotinique	-	4,1
Myo-Inositol	-	560
<b>Substances de croissance (μM)</b>		
Ac. β-indolybutyrique (AIB)	0,50	0,50
Ac. α-naphthylacétique (ANA)	0,53	0,53
Benzyladénine (BA)	0,66	0,66
Kinéline (Kin)	0,70	0,70
Saccharose	2%	3%
Agar	0,7%	0,7%

\*Milieux de culture de base de MURASHIGE ET SKOOG dont les macro-éléments sont réduits à moitié de leur concentration

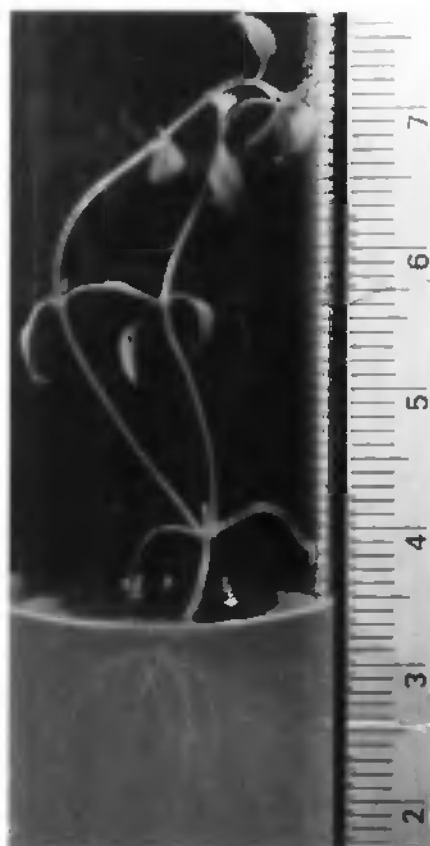


Fig. 2. Croissance de la microbouture de thym cultivée sur le milieu nutritif CMS, après trois semaines de culture.



Fig. 3. Développement du système racinaire sur les milieux de base MS (à gauche) et CMS (à droite).

propagation (tabl. I). Le pH des milieux nutritifs est ajusté à 5,7-5,8 avec du NaOH ou de l'HCl à 0,1 N avant l'autoclavage. La stérilisation des milieux de culture est réalisée à l'autoclave pendant 15 minutes, à 121°C (1,1 kg/cm<sup>2</sup> de pression).

Les cultures sont maintenues dans un environnement climatique à la lumière (850 μW/cm<sup>2</sup>, photopériode de 16 heures) et à une température alternée (23±1°C le jour, 18±1°C la nuit). L'humidité relative est de 55±5% dans l'enceinte de culture.

Le sevrage des microplantules racinées est réalisé sous un brouillard «sec» (Dry Fog) et sur un substrat de culture composé d'un mélange de sable, de terreau d'écorce de pin et de terre franche, dans une proportion de 1:2:1. Après 72 heures dans les conditions de saturation d'humidité, les jeunes microplantules sont transférées en conditions de culture de serre, puis, plus tard, en pleine terre.

## Résultats et discussion

### Etablissement *in vitro*

La désinfection superficielle du matériel végétal sélectionné, selon notre procédé, a permis d'obtenir une reprise de croissance de l'ordre de 70%. Cette perte importante de matériel initial est due au brunissement des tissus fraîchement implantés, provoqué par l'oxydation des métabolites secondaires.

**Tableau 2.** Action de divers régulateurs de croissance sur le développement des microboutures de thym (*Thymus vulgaris* L.) *in vitro*.

Traitements N°	Milieu de base <sup>1</sup>	Régulateurs de croissance ( $\mu$ M)	Croissance des bourgeons axillaires <sup>2</sup> (cm)	Enracinement	
				%	Nombre de racines par explant
1	CMS	-	9,25 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	100	>10
2	MS	-	9,33 $\pm$ 1,17 <sup>a</sup>	100	5-8
3	CMS	BA 0,66	1,83 $\pm$ 0,96 <sup>b</sup>	-	-
4	MS	BA 0,66	1,06 $\pm$ 0,53 <sup>c</sup>	-	-
5	CMS	BA 0,66 AIB 0,50	0,98 $\pm$ 0,50 <sup>cd</sup>	15	1-2
6	MS	BA 0,66 AIB 0,50	0,92 $\pm$ 0,47 <sup>cd</sup>	20	1-2
7	CMS	Kin 0,70 ANA 0,53	0,41 $\pm$ 0,15 <sup>d</sup>	25	2-3
8	MS	Kin 0,70 ANA 0,53	0,48 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup>	10	1-2

<sup>1</sup>CMS: selon COLLET (1985). MS: MURASHIGE et SKOOG (1962) modifié.

<sup>2</sup>Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5%, selon le test de Duncan.

res exsudés dans le milieu de culture, lors de la préparation des explantats. Pour sa part, la contamination par des micro-organismes pathogènes (champignons, bactéries) ne représente qu'un très faible pourcentage de pertes (2 à 3%) sur l'ensemble des cultures. Ce phénomène de brunissement des tissus initiaux causé par le conditionnement du milieu de culture a été également observé par PRATINHA et CHATURVEDI (1984), sur le romarin, et par LÉ (1987), sur l'hysope.

### Choix du milieu de multiplication

Dans nos essais préliminaires, il a été observé que la croissance des explantats nodaux paraissait influencée par la composition minérale du milieu de culture, d'une part et, d'autre part, par la présence des régulateurs de croissance.

L'examen du tableau 2 confirme qu'effectivement, en l'absence de substances de croissance, seuls les milieux minéraux de base CMS (COLLET, 1985) et MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) permettent d'observer à la fois le développement de l'appareil végétatif et une formation abondante du système racinaire (fig. 2). Toutefois, les explantats cultivés sur le milieu CMS ont toujours montré un meilleur enracinement (fig. 3); les racines adventives qui se développent sur ce milieu sont beaucoup plus longues et mieux distribuées dans le substrat nourricier, alors que celles qui sont apparues sur le mi-

lieu MS présentent une faible croissance, caractérisée par la distribution d'un nombre restreint de racines de différentes tailles, à partir de la base calleuse de la bouture. En outre, ces racines ont tendance à s'oxyder facilement, déjà après une vingtaine de jours de culture. Le bon développement du système racinaire, dans nos conditions d'expérimentation, semble être lié à une réduction significative de la teneur en azote, principalement l'ion ammonium  $\text{NH}_4^+$ , dans le milieu minéral de base CMS, comme l'ont signalé GEORGE et SHERRINGTON (1984). L'effet bénéfique des régulateurs de croissance sur le développement des explants initiaux, rapporté par FURMA-



Fig. 4. Faible croissance de la microbouture de thym observée sur un milieu MS enrichi de 0,66  $\mu$ M de benzyladénine (BA).

NOWA et OLSZOWSKA (1980), n'a pu être vérifié dans nos essais. Ainsi, lorsque les milieux nutritifs renferment une cytokinin, ou à la fois une cytokinin et une auxine, on peut observer, pour l'ensemble des cultures, une perturbation du développement des bourgeons axillaires (fig. 4). La croissance de ceux-ci est fortement inhibée, lorsqu'on remplace la benzyladénine (BA) par la kinétine (Kin), et l'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) par l'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA) (fig. 5). L'action d'une combinaison kinétine + ANA a non seulement provoqué une diminution importante de la croissance des explantats, mais encore l'apparition d'un cal à leur base. Le conditionnement sélectif de l'organogenèse vers la production de cals et de racines hétérogènes, sur ces explantats, permet de supposer que l'interaction entre la teneur en substances de croissance endogènes des plantes ligneuses, notamment des espèces riches en huiles essentielles, et le métabolisme des régulateurs de croissance se trouvant dans ces milieux, pourrait être à l'origine du manque de stimulation au développement des bourgeons axillaires. Ce fait s'avère être en désaccord avec les observations rapportées par FURMANOWA et OLSZOWSKA (1980).



Fig. 5. Inhibition de la croissance de la microbouture de thym sur un milieu MS renfermant 0,70  $\mu$ M de kinétine (Kin) et 0,53  $\mu$ M d'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA).

### Microbouturage *in vitro*

Après quatre à cinq semaines de culture sur le milieu de base CMS (COLLET, 1985), les premiers segments nodaux donnent naissance à de jeunes microplantes racinées. Celles-ci peuvent servir, à leur tour, de matériel de départ pour d'autres cycles de multiplication.

Pour cela, on fragmente les jeunes tiges en plusieurs portions comportant chacune un nœud et on les place à nouveau sur un milieu CMS neuf pour leur permettre de poursuivre leur croissance. Ainsi, un nouveau cycle de bouturage *in vitro* peut être entrepris toutes les quatre à cinq semaines et cela, à l'abri des risques de contamination. Aucun brunissement n'a été enregistré au cours des repiquages successifs contrairement à la phase d'établissement. S'agit-il, dans ce cas, d'une optimisation de développement qui rend superflues les réactions de défense de la plante ?

### Sevrage et acclimatation

Les microplantes pourvues d'un système racinaire bien développé, après un mois de développement *in vitro*, sont transférées dans un environnement saturé d'humidité durant les trois premiers jours, afin de permettre aux jeunes plantules de réacquies le fonctionnement des stomates. Puis, progressivement, on ramène l'humidité relative de l'air aux conditions d'aération d'une culture en serre. En procédant ainsi, nous avons réussi à faire passer plus de 90% des microplantes des conditions *in vitro* à l'environnement naturel (fig. 6). Elles ont toutes montré la même morphologie que le clone parent sélectionné.

### Conclusion

Le développement des explants nodaux de thym *in vitro* peut être orienté vers la production de pousses feuillées, pourvues d'un système racinaire fonctionnel, en utilisant un milieu nutritif artificiel relativement pauvre en azote, notamment en ion ammonium  $NH_4^+$ , et dépourvu de substances de croissance.

Ce mode de multiplication représente donc, en l'absence d'une méthode traditionnelle efficace, une alternative intéressante, qui nous permet d'envisager la constitution rapide des têtes de clone de thym sélectionnées, dans le cadre de nos travaux d'amélioration. Des essais ultérieurs réalisés sur d'autres sélections de thym sont en cours d'expérimentation, en vue de vérifier l'efficacité de cette technique.



Fig. 6. Plantes de thym acclimatées depuis cinq mois sur un substrat horticole.

### Remerciements

Nous remercions vivement M. C. REY pour la fourniture du matériel végétal sélectionné et pour les informations concernant la culture traditionnelle, ainsi que M. G. MERMILLOD pour ses travaux de sevrage et de culture en serre.

### Bibliographie

- COLLET G. F., 1985. Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 17 (4), 259-263.
- CONGER B. V., 1981. Agronomic crops. In: Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Ed. Conger B.V., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- EVANS D. A., SHARP W. R., ANMIRATO P. V. and YAMADA Y., 1983. Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1-IV. Techniques for propagation and Breeding. Mac Millan Publ. Co., New York.
- FURMANOWA M. and OLSZOWSKA O., 1980. *Thymus vulgaris* L. propagation through tissue culture. *Acta Pol. Pharm.* 37, 243-247.
- GEORGE E. F. and SHERRINGTON P. P., 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories, Exegetics Ltd., Eversley, Basingstoke, Hants. RG 27 0QY, England.
- LE C. L., 1987. Multiplication *in vitro* de l'hysope (*Hyssopus officinalis* L.). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 19 (6), 363-367.
- MURASHIGE T. and SNOOD G., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- MURASHIGE T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25, 135-166.
- PRATIBHA M. and CHATURVEOI H. C., 1984. Micro-propagation of *Rosmarinus officinalis* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 3, 163-168.
- REY C., 1988. Plantes médicinales et aromatiques. In: Rapport d'activité 1986-1987, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins. Publication N° 1458, 365-366.
- SIMON J. E., CHADWICK A. F. and CRAKER L. E., 1984. The herbs (Part 1). In herbs - An indexed bibliography 1971-1980. Eds. Simon J. E., Chadwick A. F., Craker L. E., Elsevier, pp. 92-94.

### Summary

The multiplication of selected thyme (clone 87/35) was achieved by culturing microcuttings, which contain one node, on a CMS hormone-free medium (COLLET, 1985). More than 90% of *in vitro* rooted plantlets were successfully acclimatized in soil.

### Zusammenfassung

Für die Vermehrung von Thymian (selektierter Klon 87/35) wurden Mikrostecklinge mit einer Achselknospe auf ein Nährmedium überführt (CMS), welches Mineralsalze aber keine Wachstumshormone enthält (COLLET, 1985). Über 90% der *in vitro* produzierten Pflanzen konnten auf einem traditionellen Pflanzen-substrat akklimatisiert werden.

## Aspects pratiques de la micropropagation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.)

C. L. LÉ, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

### Introduction

Au cours des dernières décennies, l'importance que revêt la technique de culture *in vitro* réside non seulement dans les possibilités d'investigation des processus morphogénétiques fondamentaux des plantes (TRAN, 1973; TRAN et CHLYAH, 1976; REINERT *et al.*, 1977), mais encore dans ses applications au sein des programmes de sélection et d'amélioration des espèces végétales cultivées (SCHÄFER-MENUIR, 1985; SANGWAN et SANGWAN-NORREEL, 1990). Cette nouvelle biotechnologie a effectivement contribué au développement de nombreuses méthodes de production, à l'échelle commerciale et industrielle, pour des espèces agronomiquement intéressantes (CONDR, 1981; EVANS et SHARP, 1982).

A la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, la culture *in vitro* de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) est pratiquée dans un triple but: comme moyen d'élimination des maladies virales (LÉ et COLLET, 1985; LÉ, 1986), comme alternative de conservation de longue durée pour les variétés de pomme de terre de l'assortiment suisse (LÉ et COLLET, 1988) ou encore comme méthode de multiplication rapide de têtes de clones des variétés nouvellement homologuées (REUST et LÉ, 1985).

La multiplication rapide *in vitro* (ou micropropagation), contrairement à celle qui est pratiquée avec la méthode conventionnelle, offre certes de nombreux avantages: **taux de multiplication élevé, indépendance par rapport aux saisons, garantie sanitaire, surfaces de culture réduites**, etc., mais l'application de cette nouvelle technique sur le plan pratique et à une échelle plus large ne peut être réalisée qu'avec une parfaite maîtrise du **savoir-faire**, afin d'éviter les **aléas** (mutations, variations) inhérents à cette technique délicate et d'en faire bénéficier pleinement le consommateur.

Dans cet article, nous rapportons les premiers résultats portant sur la capacité de croissance des miniboutures de pomme de terre, prélevées à différents niveaux d'insertion sur la miniplante lors de la multiplication rapide *in vitro*, afin d'assurer un potentiel de production aussi élevé et régulier que possible.

### Techniques expérimentales

#### Matériel végétal

Des miniplantes de pomme de terre (cv. Bintje et Désirée) cultivées *in vitro*, au stade de quatre semaines de développement, sont utilisées dans ces essais.

Les explants (ou miniboutures), comportant chacun un bourgeon, sont prélevés sur la miniplante, tout en respectant leur niveau d'insertion sur la tige: du niveau 0, correspondant à l'apex, au niveau 6 ou 7, représentant la base de la tige (fig. 1).



Fig. 1. Miniplante de pomme de terre fragmentée en miniboutures numérotées de 0 (apex) à 6 ou 7 (partie basale).

### Résumé

Des miniplantes de pomme de terre (cv. Bintje et Désirée) sont micropropagées *in vitro*, en respectant l'ordre des bourgeons établi sur la tige principale. La capacité de croissance des miniboutures des rangs intermédiaires s'est révélée être supérieure à celle qui se trouve dans les parties extrêmes, au cours des repiquages successifs. Ce potentiel de développement doit être pris en considération lors des travaux de multiplication rapide de clones à grande échelle, afin d'assurer une production optimale de matériel de qualité.

### Milieu de culture

Les miniboutures de pomme de terre sont cultivées dans des tubes en verre de 25 mm de diamètre et 15 cm de longueur, contenant chacun 15 ml d'un milieu de prolifération décrit précédemment (LÉ et COLLET, 1985), afin de favoriser leur croissance en conditions de cultures stériles.

### Environnement de culture

Les cultures sont maintenues dans une chambre de croissance (cellule climatisée Weiss, type 12E/1U-PK) où elles sont soumises à une photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures. L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents Sylvania 215 W (Cool White), fournissant  $1800 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  environ au niveau des récipients de culture. La température est de  $18^\circ\text{C}$  le jour et de  $16^\circ\text{C}$  la nuit, durant toute la période de l'essai.

### Estimations statistiques

L'appréciation de la capacité de croissance des différents niveaux d'insertion sur la miniplante de pomme de terre est réalisée sur la base des mesu-

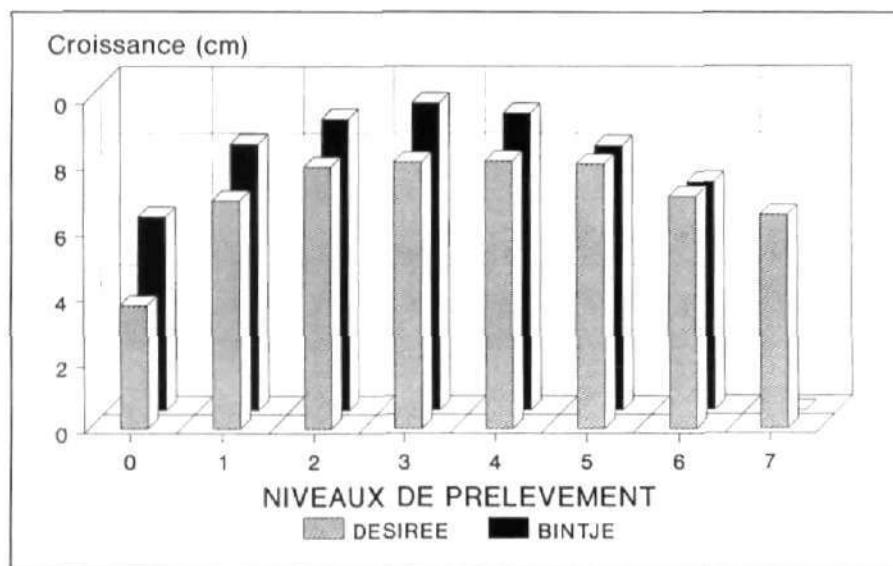


Fig. 2. Capacité de croissance des microboutures en fonction des niveaux de prélèvement.

res de la croissance en hauteur des miniplantes, après chaque cycle de multiplication de quatre semaines. L'essai a été répété au moins deux fois, avec un nombre de 16 à 18 explants par niveau de prélèvement et par variété de pomme de terre expérimentée.

## Résultats et discussion

La capacité de croissance des explants de pomme de terre (cv. Bintje et Désirée), prélevés à différents niveaux d'insertion, est illustrée dans la figure 2. Chez la variété Bintje, on note une différence importante quant à la croissance entre les parties extrêmes (niveaux 0 et 6) et les niveaux 1 à 5, avec un optimum situé au niveau 3. Pour la variété Désirée, une réduction significative de la croissance a été observée au niveau 0, alors que le développement des niveaux 1, 6 et 7 ne semble pas être trop défavorisé par rapport aux niveaux intermédiaires (2 à 5). Ces observations s'avèrent être en partie en accord avec les résultats des travaux de COLLET et LÉ (1987), qui ont mis en évidence la perte de productivité des bourgeons apicaux de porte-greffe de pommier, en suivant leur évolution au cours de multiples subcultures. Concernant le développement effectif de nouveaux entre-nœuds sur la miniplante *in vitro*, on note un plus grand nombre de miniboutures utilisables chez la variété Désirée (7), en comparaison avec la variété Bintje (6). Par contre, la croissance des explants des niveaux sous-jacents (1 à 5) paraît être plus forte pour la variété Bintje que pour Désirée. Dans nos conditions d'expérimentation, la faible croissance de l'ensemble des explants de la variété

Desirée pourrait être expliquée par le caractère particulier lié au génotype, comme l'ont signalé LÉ et COLLET (1988) dans leurs travaux portant sur la survie de ces variétés, après de longs mois de conservation *in vitro*. En conclusion, les premiers résultats expérimentaux concernant l'influence des niveaux de développement des bourgeons de pomme de terre cultivés *in vitro* nous permettent d'envisager, avec assurance, la micropropagation rapide des variétés Bintje et Désirée, dans des conditions optimales de croissance, cela en respectant rigoureusement le potentiel de développement de différents niveaux d'insertion sur la plante de départ. Des travaux portant sur d'autres variétés de pomme de terre de l'assortiment suisse sont en cours de réalisation, afin de vérifier notre procédé de multiplication.

## Remerciements

L'auteur remercie M. J. DETTWILER de sa collaboration technique à la réalisation de cette étude.

## Bibliographie

- COLLET G. F. et LÉ C. L., 1987. Micropropagation de porte-greffe de pommier et de poirier. I. Etablissement et multiplication *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, M27, MM106, M9 type York) et de *Cydonia oblonga* Mill. (A). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 19 (4), 253-259.
- CONGER B. V., 1981. Agronomic crops. In: cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Ed. Conger B. V., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 165-216.
- EVANS D. A. and SHARP W. R., 1982. Application of tissue culture technology in the agriculture industry. In: application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry. Eds. Tomes D. T., Ellis B. E., Harney P. M., Kasha K. J., Peterson R. L., Univ. of Guelph, Ontario, Canada, 209-231.

- LÉ C. L., 1986. Régénération de la variété de pomme de terre Hermes par thermothérapie et culture de méristèmes. *Rev. suisse Agric.* 18 (6), 313-315.
- LÉ C. L. et COLLET G. F., 1985. Assainissement de la variété de pomme de terre Sangema. Méthode combinant la thermothérapie *in vitro* et la culture de méristèmes. Premiers résultats. *Rev. suisse Agric.* 17 (4), 221-225.
- LÉ C. L. et COLLET G. F., 1988. Conservation *in vitro* de l'assortiment suisse des variétés de pomme de terre. *Rev. suisse Agric.* 20 (5), 277-281.
- REINERT J., BAJAJ Y. P. S. and ZBELL B., 1977. Aspects of organization—organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. In: plant tissue and cell culture—Street H. E. edit., Botanical Monographs, vol. 11, sec. edition, University of California Press, 389-427.
- REUST W. et LÉ C. L., 1985. La multiplication rapide des pommes de terre par le microbouturage. *Rev. suisse Agric.* 17 (1), 11-18.
- SANGWAN R. S. and SANGWAN-NORREEL B. S., 1990. The impact of biotechnology in agriculture. Proceedings of the international conference «The meeting point between fundamental and applied *in vitro* culture research» (Amiens, France, 1989).
- SCHAFFER-MENUHR A., 1985. *In vitro* Techniques—propagation and long term storage. Schafer-Menuhr edit., Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk publ., Kluwer academic publ. group, 194.
- TRAN T. V., 1973. *In vitro* control of *de novo* flower, bud, root and callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature* (Lond.) 246, 44-55.
- TRAN T. V. et CHLYAH A., 1976. Différenciation de boutons floraux, de bourgeons végétatifs, de racines et de cal à partir de l'assise sous-épidermique des ramifications florales de *Nicotiana tabacum* Wisc. 38. Etude infrastructurale. *Can. J. Bot.* 54, 1979-1996.

## Summary

### Practical aspect of *in vitro* micropropagation of commonly grown potatoes (*Solanum tuberosum* L.)

Potato miniplants (cv. Bintje and Désirée) were *in vitro* micropropagated in respect to the order of buds originated from the main stem. Best growth capacity has been found in microcuttings originated from the middle part of these miniplants in comparison with those provided from the top and bottom, in successive subcultures. This potential of development has to be taken into account at the time of a large scale clonal propagation, in view of insuring optimal production of high quality material.

## Zusammenfassung

### Praktische Ansicht von *in vitro* Vermehrung von Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.)

Kartoffelpflänzchen (cv. Bintje und Désirée) wurden unter Beachtung der Knospenordnung des Hauptstengels *in vitro* vermehrt. Es stellt sich nach mehrfachen Subkulturen heraus, dass die Zuwachskapazität der Stecklinge des mittleren Teiles des Pflänzchengrösser ist als diejenige der Extremen. Diese Entwicklungskapazität muss beachtet werden bei umfassender Vermehrung um eine bestmögliche Produktion von Qualitätsmaterial zu gewährleisten.

# Assainissement de l'échalote (*Allium ascalonicum* L.)

## 1<sup>re</sup> partie: semis et multiplication *in vitro*

C. L. LÊ, F. PELET et J. PERKO, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

### Résumé

En vue de l'assainissement virologique de l'échalote, les auteurs décrivent une méthode permettant la germination des graines *in vitro*, la prolifération de pousses feuillées et leur enracinement. Les plantules ainsi obtenues sont exemptes du virus de la bigarrure de l'oignon et du virus latent de l'échalote. Elles produisent des petits caïeux qui, en deuxième année, donnent des plantes vigoureuses et de gros bulbes. En troisième année, on obtient une floraison abondante, ce qui n'est pas usuel chez l'échalote.

### Introduction

Dans le régime alimentaire des populations du sud de l'Europe et du bassin méditerranéen, l'échalote (*Allium ascalonicum* L.), plante potagère de la famille des liliacées, occupe grâce à sa richesse en arômes une place importante.

Ce légume-condiment renferme à l'état frais beaucoup de sels minéraux, de très nombreux oligo-éléments et des vitamines. En médecine, l'usage de l'échalote a pour but de renforcer le rythme cardiaque (tonicardiaque), de régulariser la sécrétion biliaire (cholérétique), ainsi que de favoriser la fonction urinaire.

La production de l'échalote, à l'échelle européenne, est en constante progression. La France, principal pays producteur de la CEE, a vu augmenter ses sur-

faces de culture de 1500 ha en 1982 à 2500 ha en 1986. En Grande-Bretagne, aux 300 tonnes d'échalotes, produites localement en 1985 pour une surface de culture de 20 ha, viennent s'ajouter 938 tonnes importées (WALKEY *et al.*, 1987). En Suisse, la consommation de ce légume a passé de 1080 tonnes en 1983, à 1397 tonnes en 1986 (LÜTHI, 1988).

Contrairement à la multiplication de l'oignon qui s'effectue au moyen de semences, celle de l'échalote se fait par voie végétative, en cultivant les bulbes (ou caïeux) qui se développent sur la plante-mère en cours de végétation. Or, ce mode de reproduction augmente les risques d'infection par des microorganismes pathogènes, en particulier des virus. On connaît les virus occasionnant les baisses de rendement dans les cultures d'échalotes (CADILHAC *et al.*, 1976; BOS, 1976; BOS *et al.*, 1978; VERHOYEN et HORVAT, 1981; DELECOLLE, 1982). Il s'agit du virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV) et du virus latent de l'échalote (SLV). Ces deux agents pathogènes, transmis par des insectes, notamment des pucerons, peuvent causer des pertes de production allant jusqu'à 40% (HENDERSON, 1963). En Suisse, on a signalé récemment que toutes les populations d'échalote cuivrée demi-longue du type Jersey étaient porteuses de ces virus (PELET, 1988); certaines, notamment celles dont est issue la variété Milrac, une nouvelle obtention de la RAC (Centre des Fougères, Conthey), sont relativement tolérantes au virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV), qui sans nul doute s'avère être le plus redoutable de ces agents infectieux. Aussi, dans le but d'obtenir du maté-

riel sélectionné indemne de viroses et de qualité supérieure offrant des garanties sanitaires valables, la Station fédérale de Changins s'efforce-t-elle depuis plusieurs années d'assainir la nouvelle obtention Milrac qui présente des caractères agronomiques intéressants (LÊ, 1985; DARBELLAY *et al.*, 1988).

Il existe différentes techniques permettant l'élimination des virus des plantes cultivées. La technique la plus couramment utilisée pour l'obtention de matériel végétal sain est le renouvellement de clones par voie de semis, quoique certains risques d'infection subsistent pour un petit nombre de végétaux cultivés (PHATAK, 1974). Cette voie présente certes des avantages vu qu'elle ne nécessite pas de moyens sophistiqués. Elle est applicable à une vaste gamme d'espèces végétales, mais elle ne reproduit pas toujours le clone désiré. Encore faut-il trouver les conditions optimales permettant de produire convenablement des semences. Dans le cas de l'échalote, la difficulté d'obtenir des semences dans les conditions naturelles de culture représente un grand obstacle pour les travaux de régénération. En effet, on observe rarement la floraison dans les cultures traditionnelles. Toutefois, lorsque la montée en graines a lieu, les semences peuvent être utilisées pour la production de caïeux dont la valeur commerciale est, semble-t-il, non négligeable pour les variétés existantes (LAROCHET VERHOYEN, 1980).

Nous rapportons dans le présent article les premiers résultats des travaux d'assainissement de l'échalote entrepris de 1986 à 1988 et portant sur des sujets issus de semences cultivées *in vitro*.

Tableau 1. Milieux de culture utilisés dans différentes phases de culture *in vitro*.

	CMS (Collert, 1985)	Murashige et Skoog (1962)
	Germination	Multiplication + Enracinement*
<b>Macro-éléments [mM]</b>		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	10,30
KNO <sub>3</sub>	12,00	9,40
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,50	0,75
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0,62
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,00	-
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	1,50
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	3,00	-
<b>Micro-éléments [μM]</b>		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	30
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	100	100
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50	100
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1	0,1
KI	5,0	5,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,0	1,0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,1	0,1
FeNaEDTA	30	100
<b>Vitamines [μM]</b>		
Thiamine-HCl	-	3,0
Pyridoxine-HCl	-	2,4
Acide nicotinique	-	4,1
Myo-inositol	-	560
<b>Saccharose</b>	2 %	3 %
<b>Agar</b>	0,7 %	0,7 %

\*Milieu de culture de base de Murashige et Skoog dont les macro-éléments sont réduits à moitié de leur concentration.  
Les régulateurs de croissance pour la multiplication (Hussey, 1980) correspondent à 17,76 μM de BA et 5,37 μM d'acide α-naphthylacétique, et pour l'enracinement à 0,05 μM d'acide α-naphthylacétique.

## Techniques et résultats

### Matériel

Le matériel végétal utilisé dans notre essai consiste en semences d'échalote cuivrée demi-longue (type Jersey) du clone T 140, sélectionné par le Centre des Fougères, RAC-Conthey.

### Germination *in vitro*

Les semences sont désinfectées superficiellement dans de l'hypochlorite de sodium à 1,5 % pendant 15 minutes. Ensuite, elles sont lavées trois fois à l'eau distillée stérile et placées dans des boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre, contenant 9 à 10 ml de milieu de culture CMS (COLLETT, 1985) (tabl. 1). Les boîtes de Pétri scellées au Parafilm® sont maintenues pendant cinq jours dans l'obscurité, à 25°C, puis transférées à la lumière avec une photopériode de 16 heures.

Dans ces conditions stériles, les semences germent au bout d'une semaine (fig. 1). A ce stade, un repiquage immédiat sur un nouveau milieu de culture (multiplication) s'avère nécessaire pour permettre aux jeunes plantules de poursuivre normalement leur développement. Un séjour trop long

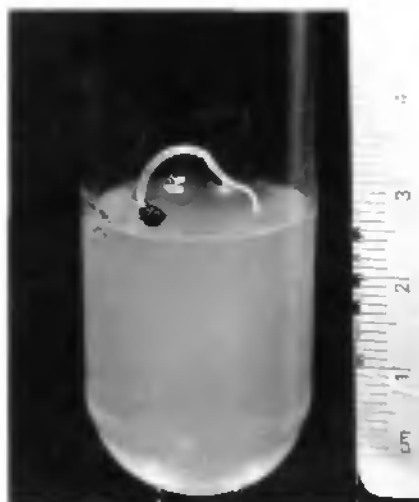


Fig. 1. Germination *in vitro* de l'échalote.

sur le milieu d'installation risque de perturber leur cycle de croissance et diminue ainsi leur chance de prolifération ultérieure.

### Multiplication *in vitro*

Dans le but d'induire la prolifération de nouvelles pousses, les jeunes plantules issues de germination sont transférées très rapidement sur un milieu de culture de base composé de sels miné-

raux de MURASHIGE et SKOOG (1962) modifié, avec du Fe chélaté par EDTA à raison de 40 mg/l, contenant diverses substances de croissance (tabl. 1). Les récipients de culture (tubes de 25 × 150 mm avec fermeture cap-o-test) sont placés dans un environnement où ils sont soumis à une photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures.



Fig. 2. Développement de nouvelles pousses feuillées sur le milieu de base de Murashige et Skoog (1962), renfermant 17,76 μM de Benzyladénine (BA) et 5,37 μM d'acide α-naphthylacétique (ANA).

L'éclairage est assuré par des tubes fluorescents Sylvania de type Cool White de 215 W, donnant 200 μW/cm<sup>2</sup> environ au niveau des récipients de culture. La température est de 20 ± 1°C le jour et de 16 ± 1°C la nuit. Une humidité relative de 55 à 60% est maintenue dans l'enceinte de culture, pendant toute la durée de l'essai.

Dans nos conditions de culture, la production de pousses feuillées demeure encore modeste. Une moyenne de 2 à 3 nouvelles pousses formées par explant et par cycle de 3 à 4 semaines a été obtenue pour l'ensemble de nos cultures (fig. 2).

Nous avons répété cette culture de multiplication pendant plusieurs cycles, et au cours de ces repiquages successifs sur le milieu de multiplication, il apparaît que certains individus sont plus productifs que d'autres (fig. 3), et que les nouvelles pousses feuillées prennent naissance dans la partie périphérique du plateau basal (fig. 4). Ce mode de prolifération a aussi été remarqué par HUSSEY et FALAVIGNA (1980) dans le cas de l'oignon (*A. cepa* L.) cultivé *in vitro*.



Fig. 3. Prolifération excessive de pousses en conditions de culture axéniques.

### Enracinement

Cette phase consiste à prélever des jeunes pousses feuillées de 3 à 4 cm de longueur, obtenues sur un milieu de prolifération, et à les transférer sur un milieu de base de MURASHIGE et SKOOG (1962) modifié, auquel est ajouté 0,05  $\mu$ M d'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA) (tabl. 1).

Les conditions de culture de cette dernière phase restent identiques à celles



Fig. 4. Développement de nouvelles pousses feuillées dans la partie basale de l'explant.

qui sont pratiquées lors de la phase de multiplication.

L'aptitude à former des nouvelles racines, qui permet de reconstituer des plantes entières capables de poursuivre leur cycle de végétation ultérieur, se manifeste sans aucune difficulté particulière chez l'échalote cultivée *in vitro* (ca. 100% de microboutures enracinées). Dans nos conditions d'expérimentation, les ébauches racinaires sont apparues après une semaine de traitement et ont évolué rapidement en donnant naissance à de longues racines (fig. 5). Cette formation rapide des racines adventives permet aux jeunes plantules d'échalote d'acquérir très vite leur autonomie lors de la phase d'acclimatation en serre.



Fig. 5. Microbouture d'échalote après deux semaines de culture sur milieu rhizogène contenant 0,05  $\mu$ M d'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA).

### Contrôles virologiques

Après avoir obtenu des plantes racinées prêtes à subir le sevrage, nous avons procédé à plusieurs reprises à la vérification de leur état sanitaire. Le contrôle de la présence des agents pathogènes chez les individus multipliés *in vitro* est réalisé au moyen d'observations au microscope électronique

et des tests immuno-enzymatiques ELISA, selon CLARK et ADAMS (1977), avec adjonction d'ovalbumine dans le tampon de CLARK.

Effectivement, les sujets issus de semences cultivées *in vitro* se sont révélés exempts de virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV) et du virus latent de l'échalote (SLV), lors de nos examens virologiques (tabl. 2). Cette observation semble donc être en parfait accord avec l'hypothèse selon laquelle les agents pathogènes, particulièrement les virus, ne peuvent être transmis par voie générative (BOS, 1976; PELET, 1988).

### Sevrage et culture en serre

De jeunes microplantes d'échalote racinées *in vitro* sont repiquées sur un substrat de culture contenant un mélange de TKS 1 et de Perlite dans une proportion de 4:1. Elles sont placées ensuite sous une atmosphère saturée d'humidité pendant 72 heures et progressivement ramenées à une aération normale en vue de leur permettre de bien s'adapter au nouvel environnement de culture.

Les plantes ainsi sevrées sont transférées, après quelques semaines de développement, dans des pots d'une contenance de 1 litre, renfermant un terreau classique (1/3 tourbe + 1/3 terre franche stérilisée à la vapeur + 1/3 sable) et placées en conditions de culture de serre.

L'acclimatation selon notre procédé n'a pas présenté de difficultés particulières (85% de réussite); néanmoins, il convient de signaler qu'un contrôle sévère de l'humidité ambiante pendant le passage d'*in vitro* au milieu naturel est indispensable pour réussir de telles cultures.

Dans nos conditions de culture, la durée complète de végétation des microplantes produites *in vitro* est de six mois environ et exige la transplantation en serre en mars ou avril. Les jeunes plantes transférées plus tard subiront un repos pendant les mois d'hiver et ne termineront leur cycle de déve-

Tableau 2. Test immuno-enzymatique ELISA portant sur la présence du virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV) et du virus latent de l'échalote (SLV) chez l'échalote régénérée par voie générative *in vitro*.

OYDV			SLV		
Témoin malade	Témoin sain	Sous-clone <sup>a</sup> T 140	Témoin malade	Témoin sain	Sous-clone <sup>a</sup> T 140
1,445 ± 0,025	0,071 ± 0,002	0,072 ± 0,001	1,240 ± 0,032	0,112 ± 0,010	0,206 ± 0,011

<sup>a</sup> Valeurs moyennes enregistrées sur 18 sous-clones régénérés *in vitro*. Dans ce tableau, les valeurs (moyennes ± erreur type) sont exprimées en densités optiques (DO) mesurées à 405 nm comme bande passante, après 60 minutes. Les témoins sains sont des plants d'oignon de semis.



Fig. 6. Caïeux de petite taille (flèche) obtenus en culture de serre (en haut), et bulbes de gros calibre récoltés en culture de pleine terre (en bas).



Fig. 7. Culture de caïeux de grande taille en pleine terre montrant la vigueur et l'homogénéité des plantes en provenance de culture *in vitro*.

loppement qu'au cours de l'année suivante.

La production de caïeux sur ces *vitro-plants* est limitée à un ou deux exemplaires par plante d'échalote cultivée; leur poids varie entre 2 et 3 grammes chacun (fig. 6).

### Production de caïeux en pleine terre

De petits bulbes récoltés en serre sur des microplantes issues de culture *in vitro* ont été plantés en pleine terre au mois de mars à Conthey, en vue de produire de nouveaux caïeux en conditions de culture traditionnelles.

On dispose à cet effet les bulbes en plates-bandes de quatre lignes avec un passage de 60 cm, cela à raison de 10 à 12 plants par mètre carré. Des travaux d'entretien (désherbage, traitement phytosanitaire, etc.) et de fertilisation ont été opérés de la même façon que pour la culture traditionnelle des échalotes. La récolte a eu lieu au début du mois de septembre et correspond à la phase de maturité de l'échalote cuivrée demi-longue (type Jersey), cultivée en Valais.

Dans nos conditions d'essai, le nombre



Fig. 8. Mise à fleurs de l'échalote assainie au troisième passage en terre.

de bulbes produit par des plants provenant de la culture *in vitro*, après une première année en terre, reste encore faible (tabl. 3). Par contre, leur taille est considérable, pesant 20 à 25 g chacun (fig. 6). Dans le cas présent, bien que la

production de bulbes de qualité commerciale soit nettement inférieure à celle obtenue en culture traditionnelle, le matériel végétal ainsi produit présente cependant un intérêt botanique. En effet, après la remise en terre, les gros caïeux formés au cours de la première année de pleine terre donnent naissance à des plantes vigoureuses montrant une parfaite homogénéité dans leur comportement au champ (fig. 7). Toutefois, ces plantes montent toutes en graines assez rapidement (fig. 8); cette aptitude à fleurir chez l'échalote provenant de plantes culti-

Tableau 3. Poids moyens et taux de multiplication de l'échalote en provenance de culture *in vitro* et de multiplication traditionnelle.

Provenance	Densité de plantation/m <sup>2</sup>	Poids moyen (g)	Taux de multiplication
Culture traditionnelle	10-12 pl.	19-22	10,6-10,7
Culture <i>in vitro</i>	10-12 pl.	20-25	2-3



Fig. 9. Floraison de l'échalote assainie à l'extérieur ▲ et sous abri grillagé ►.

vées *in vitro* se manifeste aussi bien chez les individus maintenus sous abri grillagé que chez ceux qui sont plantés à l'extérieur de celui-ci (fig. 9a + b). D'une manière générale, la mise à fleurs des échalotes n'est qu'occasionnellement observée au champ sous réserve de conditions particulières (température de stockage, date de plantation, etc.). Le pourcentage de floraison obtenu dans ces occasions est même très faible et variable. Cela nous incite à poser la question de savoir si cette floribondité est la conséquence de l'opération d'assainissement viral ou celle de la multiplication *in vitro* sur milieu nutritif riche. Ces hypothèses sont en cours de vérification, de même que la qualité des semences obtenues dans le cadre de ce travail.

## Conclusion

Ces premiers résultats d'expérimentation et d'observation portant sur l'assainissement de l'échalote (clone T140) par semis et multiplication *in vitro* nous permettent d'établir les constatations suivantes :

- la totalité des plantes produites par semis et multiplication *in vitro* est exempte de virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV) et de virus latent de l'échalote (SLV);
- la reconstitution des caïeux à partir de matériel cultivé *in vitro* nécessite deux passages en terre. Le premier passage donne naissance à des petits bulbes qui, à leur tour, mis en terre, produisent de gros bulbes;
- la plantation de ces gros caïeux, à la troisième année, aboutit à la mise à fleurs — fait exceptionnel dans les cultures traditionnelles.

D'un point de vue pratique, ce fait pourrait offrir une nouvelle possibilité de production de caïeux, semblable à celle pratiquée pour la culture de l'oignon, cela pour autant que la qualité des descendants soit conforme aux clones-mères.



## Remerciements

Nos remerciements s'adressent à M<sup>lle</sup> I. CORDEY pour la culture *in vitro*, à M. Christian DARBELLAY pour le sevrage et à MM. G. COPPEY et F. BERTHOUSOZ pour la prise en charge des cultures en pleine terre.

## Summary

In order to obtain virus-free clones of shallot from seeds, the authors experimented a method for germinating seeds *in vitro*, inducing multiple shoot production and rooting these shoots, also *in vitro*. These plantlets were free of onion yellow dwarf and shallot latent viruses. Once transferred to soil, they produced small bulbs that in the second growing season gave vigorous plants with quite large bulbs. In the third growing season, these bulbs grew into floriferous plants, a fact that is unusual for shallot.

## Zusammenfassung

Zur Virusbefreiung bei der Schalotte beschreiben die Autoren eine Methode, die die Keimung von Samen *in vitro* ermöglicht, sowie die Vermehrung von Trieben und deren Bewurzelung. Die auf diese Weise erhaltenen Pflanzen sind frei von dem Virus der Gelbstreifigkeit der Zwiebel (OYDV) und dem Latenten Virus der Schalotte (SLV). Sie produzieren kleine Samenzwiebeln welche im zweiten Jahr kräftige Pflanzen mit grossen Zwiebeln ergeben. Im dritten Jahr erhält man eine reichliche, bei der Schalotte unübliche Blüte.

## Bibliographie

- BOS L., 1976. Onion Yellow Dwarf Virus. CMI/AAB, No. 158.
- BOS L., HUTTINGA H. and MAAT D. Z., 1978. Shallot latent virus, a new carlavirus. *Neth. J. Pl. Path.* 84, 227-237.
- CAOILLIAC B., QUOT J. B., MARROU J. et LEROUX J.-P., 1976. Mise en évidence au microscope électronique de deux virus différents infectant l'ail (*Allium sativum* L.) et l'échalote (*Allium cepa* L. var. *ascalonicum*). *Ann. Phytopathol.* 8 (1), 65-72.
- CLARK M. F. and ADAMS A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.
- COELET G. F., 1985. Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 17 (4), 259-263.
- DARBELLAY C., GRANGES A. et PERKO J., 1988. La Miliac, une nouvelle variété d'échalote. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 20 (4), 219-224.
- DELECOLLE B., 1982. Shallot viruses in France: problems related to a new virus inducing severe symptoms on grey shallot. In: Abstracts 4th conference of the ISHS vegetable virus working group. Wellesbourne, Sept. 1982.
- HENDERSON D. M., 1953. Virus yellows of shallot. *Pl. Path.* 2, 130-133.
- HISSEY G. and FALAVIGNA A., 1980. Origin and production of *in vitro* adventitious shoots in the Onion, *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany* 31 (125), 1675-1686.
- LAROCHE M. et VERHOYEN M., 1980. Essai de multiplication rapide *in vitro* de l'échalote (*Allium ascalonicum* L.). *Med. Fac. Landbouw. Rijks-univ. Gent*, 45/2, 323-333.
- LE C. L., 1985. Rapport d'activité 1984-1985. Publication n° 1412.
- LÜTHI J., 1988. Statistiques de la Centrale suisse de la culture maraîchère (CCM) Oeschberg, 3425 Koppingen.
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-479.
- PELET F., 1988. Les virus de l'échalote. *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 20 (4), 223.
- PHATAK H. G., 1974. Seed-borne plant viruses — Identification and diagnosis in seed health testing. *Seed Sci. and Technology* 2, 3-155.
- VERHOYEN M. et HORVAT F., 1981. Identification des virus de l'échalote (*Allium ascalonicum* L.) en Belgique. *Parasitica* 37, 79-86.
- WALKEY D. G. A., WEBB M. J. W., BOLLAND C. J. and MILLER A., 1987. Production of virus free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *Journal of Horticultural Science* 62 (2), 211-220.

# SUMICO<sup>®</sup>

Un nouveau fongicide vraiment efficace contre la pourriture grise et particulièrement contre les souches résistantes de cette maladie.

## SUMICO<sup>®</sup>

- un produit d'une nouvelle génération
- super-efficace contre toutes les souches de la maladie
- vous procure une vendange saine
- une seule application: début véraison

Classe de toxicité: Ibr  
© Marque enregistrée de Sumitomo Chemical Company Ltd.

Bureau Suisse romande:  
CH-1033 Cheseaux  
tél. 021 731 48 48



**Plüss-Stauffer SA**  
AGRO  
CH-4665 Ottingen  
Tel. 062 99 11 11

9



**A belle exploitation  
bonne assurance.**

**Avant tout contre  
la grêle et les  
autres forces de la  
nature.**



**SUISSE GRÊLE**

Téléphone 01 251 71 72



## *unifroid*

Le spécialiste  
du froid pour  
L'ŒNOLOGIE

Réfrigération  
Congélation  
Récupération d'énergie  
Pompes à chaleur  
Climatisation  
Commerce  
Industrie

Liste de références et  
documentation détaillée  
sur demande

## *unifroid*



1053 CUGY/LAUSANNE – Route de Morrens – Tél. 021/731 26 26  
1214 VERNIER/GENÈVE – 16, ch. des Coquelicots – Tél. 022/4131 60  
3976 NOËS/SIERRE – Rue de la Fraternité – Tél. 027/55 07 30  
3210 CHIÈTRES – Krommenmatte 394 – Tél. 031/95 52 95

Service après-vente dans toute la Suisse romande

# Assainissement de l'échalote (*Allium ascalonicum* L.)

## II. Thermothérapie et culture de méristèmes

C. L. LÉ, F. PELET et J. PERKO, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

### Résumé

On décrit dans cet article une méthode d'élimination du virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV) et du virus latent de l'échalote (SLV) des clones d'échalote sélectionnés en Suisse (Milrac<sup>®</sup>), en combinant le traitement par la chaleur *in vitro* (thermothérapie) et la culture de méristèmes, dans le but de produire un stock de plantes saines servant de matériel expérimental nécessaire à nos travaux d'amélioration.

### Matériel et techniques

#### Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre essai est constitué de clones d'échalote cuivrée demi-longue (type Jersey) de la variété Milrac<sup>®</sup>, obtenus par la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins (Centre des Fougères, Conthey).

Les examens virologiques effectués au microscope électronique et à l'aide des tests immuno-enzymatiques ELISA, ont révélé la présence du virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV) et du virus latent de l'échalote (SLV) sur tous nos échantillons d'échalote.

#### Etablissement *in vitro*

Des bulbes d'échalote en phase de développement (fig. 1), provenant de nos sélections (clones 1, 5, 8, 12 et 13), sont désinfectés superficiellement par un bref passage dans de l'éthanol à 70%, suivi d'un trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant 15 minutes, puis, après un rinçage rapide à l'eau stérile, dans du Kohrsolin<sup>®</sup> à 3% pendant 20 minutes. Ils sont ensuite rincés trois à quatre fois à l'eau stérile et séchés entre deux feuilles de papier filtre stériles.

Sous une hotte à flux d'air laminaire stérile, on enlève d'abord les premières écailles enveloppantes (2 à 3 couches)

### Introduction

Dans la première partie de cet article (Lé *et al.*, 1989), nous avons montré que l'assainissement virologique de l'échalote (*Allium ascalonicum* L.), par semis et multiplication *in vitro*, a permis d'obtenir des plantes indemnes de maladies causées par le virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV) et par le virus latent de l'échalote (SLV).

Nous présentons ici une autre technique de régénération, qui préserve les caractères génétiques de la sélection, où l'on fait intervenir le traitement à la chaleur (thermothérapie) *in vitro* et la culture de méristèmes sur l'échalote Milrac<sup>®</sup> — une nouvelle sélection suisse —, en vue de créer des têtes de clones saines servant de matériel de base pour nos travaux d'amélioration.

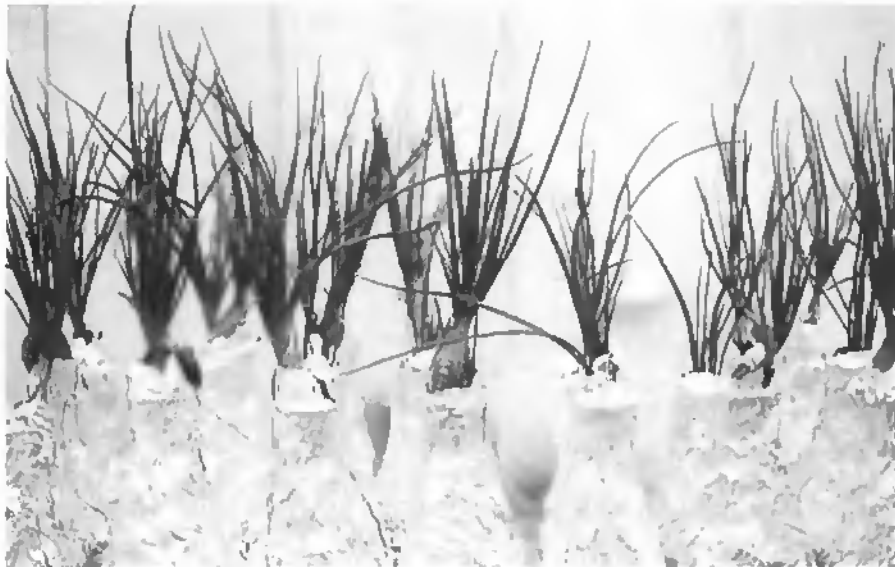


Fig. 1. Echalotes Milrac<sup>®</sup> cultivées en case climatisée.

de façon à dégager suffisamment la plaque basale, que l'on découpe ensuite en plusieurs morceaux de 0,5 cm<sup>3</sup> environ, contenant chacun au moins un point végétatif. Ensuite, on installe les explants, ainsi préparés, sur un milieu de culture renfermant les sels minéraux CMS (COLLET, 1985), additionné de saccharose (3%).

Les cultures sont placées dans une chambre de croissance dont la photopériode est de 16 heures par cycle de 24 heures. L'éclairage, dont l'intensité lumineuse est de 200  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  au niveau des plantes, est fourni par des tubes fluorescents de 215 W (type Sylvania Cool White). La température est maintenue par un système de régulation climatique assurant 23 °C le jour et 18 °C la nuit, durant toute la période de l'essai.

Après une semaine en conditions de culture *in vitro*, les explants débarrassés de leurs agents infectieux en surface sont transférés sur le milieu de prolifération utilisé auparavant (Lé et al., 1989). Toutes les quatre à cinq semaines, les cultures sont à nouveau repiquées sur un milieu neuf, mais de même composition, afin de constituer un stock de plants de base servant de matériel expérimental (fig. 2).

### Thermothérapie *in vitro*

Des microplantes de 3 semaines de croissance *in vitro* sont placées dans une enceinte de culture de 75 × 65 × 60 cm, dont la température initiale est de 27 °C, puis progressivement élevée pendant trois jours à 33 °C au niveau des cultures. Le contrôle de la température effective est réalisé à l'aide d'un thermocouple cuivre-constantan, installé à l'intérieur des tubes de culture et relié à un collecteur de données (Li-100 Datalogger). Cette température est maintenue pendant 20 jours, période pendant laquelle la multiplication des virus est fortement inhibée, alors que se poursuit lentement la croissance des microplantes d'échalote.

### Culture de méristèmes

Après la période de traitement par la chaleur, les dômes méristématiques (fig. 3), au nombre de 40 à 50 explants par clone et par traitement, sont extraits des microplantes sous la loupe binoculaire (grossissement 20 à 30 ×) et sont transférés dans des boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre, contenant un milieu nutritif composé de sels minéraux de GAMBORG *et al.* (1968), de thiamine (0,1 mg/l), de pyridoxine (0,5 mg/l), d'acide nicotinique (0,5 mg/l),



Fig. 2. Développement de nouvelles pousses feuillées sur milieu de prolifération.

de myo-inositol (100 mg/l), de saccharose (3%) et de 0,7% d'agar (Bacto-Difco). Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avant la stérilisation à l'autoclave.

### Contrôles virologiques

Le contrôle de la présence des agents pathogènes (OYDV et SLV) sur les plantes régénérées à partir de méristèmes (mériclones) est réalisé au moyen des tests immuno-enzymatiques ELISA, selon CLARK et ADAMS (1977) avec adjonction d'ovalbumine au tampon d'extraction. Pour le virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV), les réactifs provenaient de Bioreba AG, Bâle, tandis que pour le virus latent de l'échalote (SLV), un sérum brut nous a été donné par L. Bos, à Wageningen. L'extraction et la conjugaison des anticorps du SLV ont été réalisées dans le service de virologie de la Station fédérale de

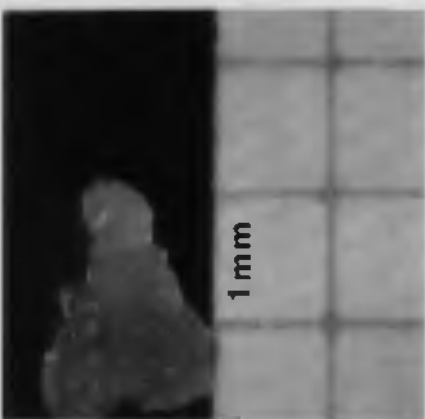


Fig. 3. Point végétatif d'échalote Miltac® montrant le méristème.

Changins. Les observations au microscope électronique ont été effectuées selon les méthodes de décoration et d'aggrégation de MILNE et LUISONI (1975). Dans les cas où les valeurs obtenues avec les tests ELISA, qui sont exprimées en densités optiques (D.O.), étaient très proches de la moyenne des témoins, un examen au microscope électronique s'imposait alors afin de confirmer la présence de virus, ou au contraire de l'infirmer.

## Résultats et discussion

### Installation *in vitro*

L'installation *in vitro* du matériel infecté de viroses (OYDV et SLV), selon notre procédé décrit plus haut, n'a pas présenté de difficultés particulières. En effet, on note une reprise de croissance de l'ordre de 95% pour l'ensemble des explants mis en place après une quinzaine de jours de culture. On note que la part de la contamination par des microorganismes pathogènes (bactéries, champignons, etc.), qui est la conséquence d'une mauvaise désinfection superficielle, ne représente qu'un faible pourcentage de pertes (1 à 2%) sur la totalité des points végétatifs extraits de la plaque basale. D'autre part, un exsudat de couleur jaune foncé, qui est dû probablement à une oxydation des métabolites secondaires rejetés dans le milieu nutritif au cours de l'installation, a été observé sur un certain nombre d'explants, après quelques heures déjà suivant le transfert en conditions de cultures stériles. Toutefois, ce phénomène de pollution du milieu de culture ne semble pas affecter de manière significative la croissance de nos explants, en comparaison avec ceux dont le substrat de culture demeure transparent tout au long de la phase d'établissement.

### Survie des méristèmes

Dans nos conditions, les méristèmes d'échalote ont évolué, après 2 semaines de culture, en de jeunes plantules de 1 à 2 cm de longueur environ, que l'on repique ensuite dans des tubes de 150 × 25 mm pour leur permettre de se développer complètement.

La survie des méristèmes, ayant subi ou non un traitement préalable à la chaleur, est illustrée par la figure 4. On constate, pour l'ensemble des clones expérimentés, une forte diminution du taux de survie des méristèmes après 6 semaines de culture. La perte de la capacité de régénération s'avère toute-

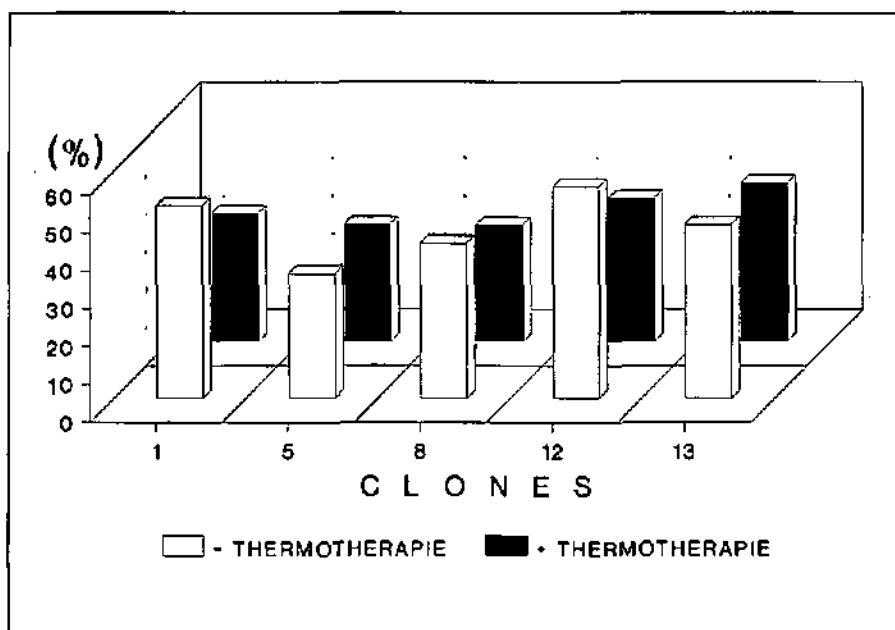


Fig. 4. Influence du mode de traitement sur le taux de survie des méristèmes d'échalote Milrac®.

fois être plus importante, dans nos conditions, pour les méristèmes issus de plantes soumises à une période de haute température, que pour ceux provenant des cultures maintenues à la température de la chambre de croissance. Cette différence peut être expliquée par le fait que d'éventuelles blessures pourraient être occasionnées aux minuscules dômes méristématiques, difficilement reconnaissables de par leur aspect translucide, lors de l'extraction, et que le traitement par la chaleur

aurait effectivement pu ralentir leur croissance, rendant ainsi le développement des méristèmes difficile. Ces observations s'avèrent être en accord avec celles rapportées par LI et COLLET (1985), portant sur la perte de la capacité de développement des méristèmes de pomme de terre de la variété Sangema, lorsqu'on prolonge la période de haute température au-delà d'une semaine de traitement. L'absence de développement des méristèmes en cours de régénération

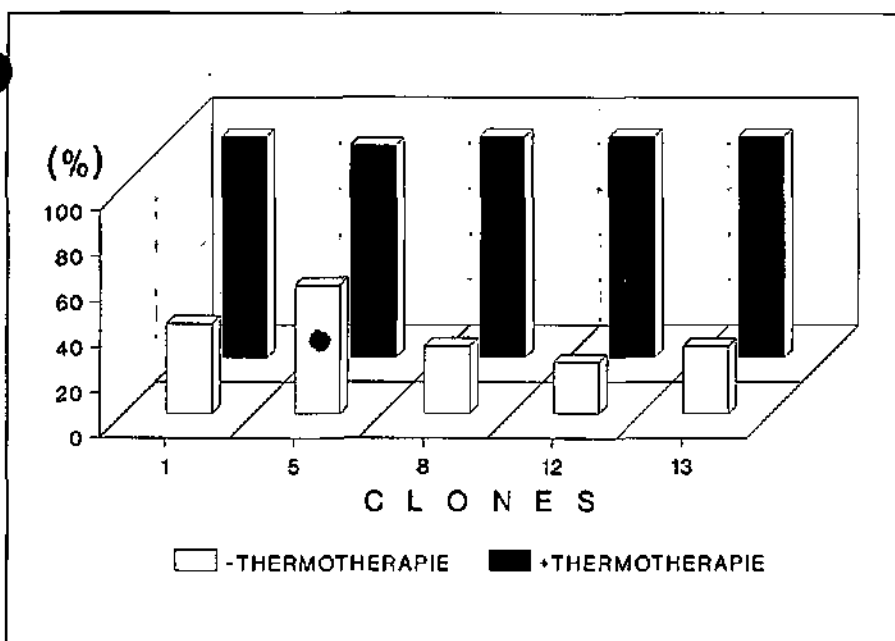


Fig. 5. Influence du traitement par thermothérapie sur le taux de régénération des clones d'échalote Milrac®.

coïncide souvent avec l'apparition de nécroses à la base des explants, qui provoque d'abord un arrêt momentané de la croissance des cellules méristématiques, et enfin la perte totale du pouvoir de régénération.

#### Elimination des viroses

L'examen des résultats présentés dans la figure 5 confirme l'efficacité de l'association d'un traitement par la chaleur à la culture *in vitro* des méristèmes, pour l'élimination du virus de la bigarrure de l'oignon (OYDV) et du virus latent de l'échalote (SLV), après huit semaines de culture.

En effet, la reconstitution de plantes d'échalote indemnes de maladies virales, selon notre technique, a permis d'obtenir un pourcentage élevé d'individus débarrassés complètement d'organismes pathogènes, contrairement à ceux auxquels la période de haute température n'a pas été appliquée. Ces résultats semblables (85%) ont aussi été mentionnés par AYUSO et PENA-IGLESIAS (1981), portant sur l'élimination de l'OYDV sur l'ail. Par contre, WALKER *et al.* (1987) n'ont pas trouvé de différence significative entre les méristèmes ayant subi un traitement à 33°C et ceux qui sont maintenus à la température ambiante, pour l'échalote Noordhollandse Strogel. Le pourcentage de plantes saines obtenu pour ces deux types de traitements demeure toutefois faible (25,7%). Ce fait pourrait être dû au mode de traitement thermothérapie, probablement inefficace sur les bulbes-mères d'échalote et différent de celui qui est utilisé dans nos essais.

Concernant le faible taux de réussite obtenu, dans nos conditions d'expérimentation, avec le seul prélèvement de méristèmes, il est possible que le pouvoir infectieux des agents pathogènes, n'ayant pas été affecté par la chaleur, ait pu encore exercer pleinement son action dans les tissus environnant le méristème et que la contamination ait eu lieu par d'éventuelles blessures causées aux cellules jouxtant celui-ci, lors de son prélèvement. Cette hypothèse recoupe en partie celle qui est avancée par QUIOT *et al.* (1972) à propos de la régénération des clones d'ail (*Allium sativum* L.) infectés par le virus de la mosaïque de l'ail. Ces auteurs ont supposé que le prélèvement d'un méristème trop volumineux, contenant encore quelques cellules virosées, ainsi que la contamination du tissu méristématique avec de la sève infectée lors de son extraction, pouvaient causer des pertes importantes en cours de régénération.



Fig. 6. Mériclones d'échalote Milrac® cultivés en case climatisée.

### Sevrage

Au terme des contrôles virologiques, les microplantes d'échalote sont placées en serre, sous un brouillard «sec» (*Fog system*), et sur un substrat de culture composé d'un mélange de terreau Optima® et Perlite dans une proportion de 4:1, afin de s'adapter à un nouvel environnement de culture. Après une semaine de réadaptation aux conditions de culture de serre, les jeunes plantes d'échalote sont transférées en milieu de culture protégé (case climatisée) pour poursuivre leur cycle de développement.

### Culture en case climatisée

La production des caïeux destinés à la constitution de têtes de clones (mériclones) s'effectue en conditions de culture protégées contre les risques de contamination, où les paramètres d'environnement sont: température (24°C/jour, 20°C/nuît); photopériode (14 h); éclaircissement (180 µW/cm<sup>2</sup>); humidité relative (55-60%). Le substrat de culture utilisé consiste en un mélange de terreau commercial ASB®, de terre franche et de sable (2:1:1). Dans les conditions de culture protégées, les mériclones d'échalote assainies se développent normalement (fig. 6) et forment des bulbes, au nombre de 2 à 3 par plante, après une période de végétation de 4 mois environ. Ces premiers bulbes récoltés sur des microplantes issues de culture *in vitro* sont à nouveau remis en terre afin de constituer rapi-

dement un stock de plants de base nécessaire à nos travaux d'amélioration pour cette nouvelle variété Milrac®.

### Conclusion

Une méthode de guérison des maladies virales (virus de la bigarrure de l'oignon OYDV et virus latent de l'échalote SLV), par le traitement à la chaleur (thermothérapie) *in vitro* associé à la culture de méristèmes, a été mise au point pour l'échalote cuivrée Milrac®.

A la suite de nombreux essais, on constate que les clones d'échalote Milrac® 1, 5, 8, 12 et 13, entièrement infectés de virus OYDV et SLV, peuvent être totalement débarrassés de ces agents pathogènes, moyennant un passage *in vitro* de 20 jours à 33°C, suivi d'un prélèvement de dômes méristématiques qui sont régénérés sur un milieu de culture de GAMBORG *et al.* (1968). Ce moyen d'intervention relativement délicat a permis d'obtenir plus de 90% de plantes régénérées indemnes de viroses. Les premiers bulbes obtenus à partir de plantes assainies sont en cours de multiplication, en vue de créer des têtes de clones servant de matériel d'expérimentation pour les travaux de sélection et d'amélioration. Les observations portant sur le comportement au champ de ces mériclones sont en cours de réalisation et feront l'objet d'une prochaine publication.

### Remerciements

Nous remercions le Dr L. Bos, IPO, Wageningen, qui nous a gracieusement offert le sérum de SLV. Nos remerciements vont également à MM. D. THOMAS, F. TSCHUY et J. DETTWILER pour l'aide technique à la réalisation de ce travail.

### Bibliographie

- AYISO P. and PLINA-IGLESIAS A., 1981. The elimination of garlic viruses by thermotherapy and/or tissue culture. *Cell Biology International Reports* 5 (9), 835.
- CLARA M. F. and ADAMS A. N., 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virol.* 34, 475-483.
- GAMBORG O. L., MILLER R. A. and OJIMA K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50, 151-158.
- LE C. L. et COLLEI G. F., 1985. Assainissement de la variété de pomme de terre Sangema. Méthode combinant la thermothérapie *in vitro* et la culture de méristèmes. Premiers résultats. *Revue suisse Agric.* 17 (4), 221-225.
- LE C. L., PÉFFET F. et PERKO J., 1989. Assainissement de l'échalote (*Allium ascalonicum* L.). I. Semis et multiplication *in vitro*. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortie.* 21 (3), 163-167.
- MILNE R. G. and LUISONI E., 1975. Rapid high-resolution immune electron microscopy of plant viruses. *Virology* 68, 270-274.
- QUIDI J., MESSIAEN C., MARRIÉ J. et LEROUX J., 1972. Régénération par culture de méristèmes de clones d'ail infectés de façon chronique par le virus de la mosaïque de l'ail. *Actas III Congr. Un. Fitopath. Medit.*, 429-433.
- WALKER D. G. A., WEBB J. M. W., BOLLAND C. J. and MILLER A., 1987. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. *J. Hort. Sci.* 62 (2), 211-220.

### Summary

#### Eradication of shallot OYDV and SLV viruses by *in vitro* thermotherapy and meristem culture

A method has been developed to eliminate Onion Yellow Dwarf Virus (OYDV) and Shallot Latent Virus (SLV) from Swiss selected shallot clones (Milrac®), by combining *in vitro* heat therapy (thermotherapy) and meristem culture, in order to produce virus-free stock plant for our breeding purposes.

### Zusammenfassung

#### Eliminierung der OYDV und SLV Viren bei Schalotte durch *in vitro* Wärmebehandlung und Meristemkultur

Eine Methode wird beschrieben zur Eliminierung vom Virus der Gelbsireifigkeit der Zwiebel (OYDV) und dem latenten Virus der Schalotte (SLV) bei ausgewählten schweizerischen Schalottenklonen (Milrac®), durch eine Kombination von *in vitro* Wärmebehandlung und Meristemspitzenkultur zur Schaffung eines virusfreien Bestandes für unsere Verbesserungsarbeiten.

## Micropropagation de porte-greffe de pommier

### III. Acclimatation de *Malus pumila* Mill. (M26, Mac9) et de *Malus domestica* Borkh. cv. Golden Delicious\*

C. L. LÉ et G. F. COLLET, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

#### Introduction

L'une des étapes importantes liées au succès de l'utilisation commerciale des techniques de micropropagation *in vitro* des plantes cultivées est le transfert en conditions de culture traditionnelles (CONGER, 1981; PIERIK, 1988; SHORT, 1990).

Dans la pratique, le passage d'un environnement stérile à un milieu de culture conventionnelle représente pour les plantes micropropagées *in vitro* une modification importante, tant du point de vue morpho-physiologique que de celui de l'environnement physico-chimique dans lequel s'effectue le transfert.

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux travaux ont démontré que la principale cause de la perte du matériel végétal reproduit *in vitro*, lors du sevrage et de l'acclimatation, est due au flétrissement rapide de l'appareil végétatif (SHORT, 1990). Ce flétrissement est imputé d'une part à un manque de formation de cire cuticulaire et épicuticulaire (FUCHIGAMI *et al.*, 1981; SUTTER et LANGHANS, 1982; SUTTER, 1988) et d'autre part à un fonctionnement stomatique défaillant, ne permettant pas la fermeture correcte des cellules de garde (BRAINERD et FUCHIGAMI, 1982; WARDLE et SHORT, 1983). De même, un bilan nutritionnel carboné négatif, provoqué par une activité insuffisante de l'appareil photosynthétique au cours des premiers jours du sevrage, semble aussi être déterminant pour la survie des plantes multipliées *in vitro* (GROUT et ASTON, 1978).

Afin de parer à cet inconvénient, des interventions *in vitro* précédant le transfert, en réduisant le taux d'humidité relative à l'intérieur des récipients de culture, en vue de stimuler la formation de cire épicuticulaire sur le feuillage (SUTTER et LANGHANS, 1982) et d'activer sa transpiration (MAENE et DEBERGH, 1986), ont permis d'éviter le flétrissement de l'appareil végétatif et de réussir le transfert en milieu non stérile. D'autres moyens d'intervention durant le transfert, tels que la réduction progressive de l'humidité relative en milieu confiné (COLLET et LÉ, 1988), ou le séjour sous un brouillard sec (Dry fog), ont aussi contribué à augmenter le taux de survie des miniplantes produites *in vitro* (« vitroplants ») (LÉ, 1989).

Toutefois, si le mécanisme de transpiration et de régulation des cellules stomatiques est bien connu et contrôlé par des interventions au niveau microclimatique, il n'en va pas de même du rôle du substrat de culture utilisé lors de l'acclimatation. Les travaux effectués dans le domaine du substrat sont rares (REGAZZI, 1987; VERMEER et EVERS, 1990).

Dans le présent travail, nous rapportons les résultats d'essais portant sur l'influence des substrats de culture sur le développement des plantes de pommier *in vitro* lors de l'acclimatation.

#### Techniques expérimentales

De jeunes microboutures de pommier de la variété *Golden Delicious* (appelée ci-après Golden) et des porte-greffe M26 et Mac9 multipliés et enracinés *in vitro*, selon les techniques décrites au-

#### Résumé

Les porte-greffe de pommier M26, Mac9 et la variété Golden Delicious sont sevrés et cultivés dans les quatre substrats perlite, tourbe, M-RAC et Optima, en vue de déterminer le comportement de plantes multipliées *in vitro*, lors du transfert en conditions de culture conventionnelles.

La survie et le développement des vitroplants de pommier dépendent de la composition physico-chimique du substrat utilisé, ainsi que de la sensibilité variétale.

paravant (COLLET et LÉ, 1987, 1988), sont utilisées dans nos essais. Rappelons que les cultures sont préparées dans les conditions suivantes: induction racinaire par un Prétraitement Inducteur Bref (PIB) avec une forte teneur en auxine (0,3-3 mM AIA), température au niveau des récipients de culture comprise entre  $22 \pm 1^\circ\text{C}/\text{jour}$  et  $18 \pm 1^\circ\text{C}/\text{nuit}$ ; photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures, avec un éclairage fourni par des tubes fluorescents Mazda AVIVA/TF 65 AVI, donnant une intensité de  $385 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  au niveau des cultures.

La durée de l'enracinement est limitée, dans nos conditions d'expérimentation, à deux semaines de culture, période durant laquelle les microboutures développent un système racinaire capable de supporter, sans trop de difficultés, les manipulations du transfert sur substrats de sevrage.

Afin de pouvoir distinguer les nouvelles racines développées au cours du

\* Pour les parties I et II, voir la bibliographie.

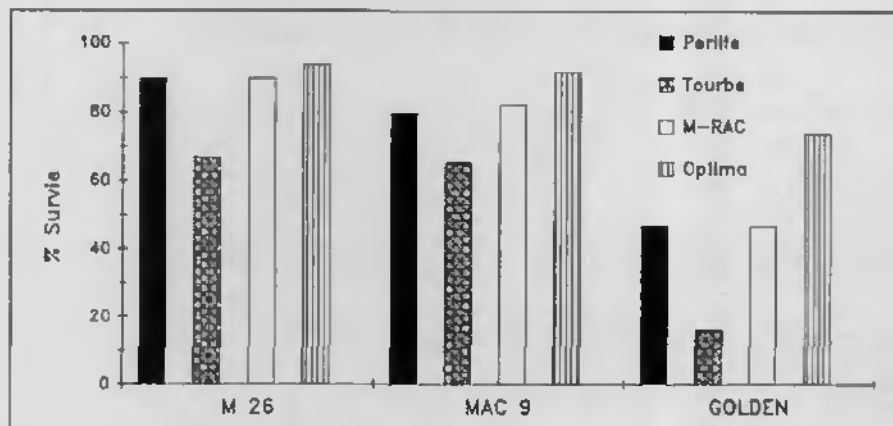


Fig. 1. Survie des vitroplants de pommier M26, Mac9 et Golden cultivés sur perlite, tourbe, M-RAC et Optima.

sevrage de celles qui sont apparues auparavant, un traitement au bleu de méthylène à 1% (ARNOLD et YOUNG, 1990) a été appliqué au système racinaire pendant 20 à 30 secondes juste avant leur mise en place sur différents substrats de culture.

Les vitroplants de pommier enracinés *in vitro* sont repiqués dans les substrats de culture suivants :

- perlite, pH 7,8 ;
- tourbe + perlite (4:1), pH 3,5 ;
- M-RAC : tourbe + sable + Optima® (1:1:1), pH 5,5 ;
- Optima® + perlite (4:1), pH 5,7.

Durant les premiers jours de transfert, les vitroplants de pommier sont maintenus dans un environnement où l'humidité relative est assurée par un système de brumisation (Andeze DE/035), permettant de surmonter le phénomène de flétrissement du feuillage dû à une forte transpiration et un mauvais fonctionnement des cellules stomatiques. Ensuite, ils sont transférés en conditions de culture de serre, où l'humidité de l'air ambiant est progressivement réduite à 60% ; la température est de 20-23°C le jour et de 18-20°C la nuit, avec un éclairage de 680  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  (tubes fluorescents Mazda AVIVA) pendant 14 heures par jour.

La fertilisation des vitroplants s'effectue 1 à 2 fois par semaine, par subirrigation, au moyen d'une solution de 0,1% d'engrais complet Wuxal® (N-P-K: 10-10-7,5).

L'appréciation de la qualité des substrats de culture utilisés dans nos essais porte sur la survie des vitroplants, le nombre moyen des nouvelles racines apparues au cours du sevrage et la croissance des vitroplants après une période de transfert en conditions de serre. Pour chacun des traitements, des observations réalisées sur la base de 20 à 30 sujets de chaque cultivar constituent des données nécessaires aux traitements statistiques.

L'expérience est répétée au moins trois fois et les résultats sont enregistrés après un mois de culture en serre.

## Résultats et discussion

### Survie des vitroplants

La survie des vitroplants de pommier M26, Mac9 et Golden au transfert sur les quatre substrats de culture Perlite, Tourbe, M-RAC et Optima, est illustrée par la figure 1.

On constate, pour l'ensemble des cultivars en expérimentation, une réduction significative du taux de survie des vitroplants repiqués dans le support tourbeux en comparaison avec celui des variantes cultivées sur les autres substrats. Les vitroplants de pommier de la variété Golden se sont montrés particulièrement sensibles au support tourbeux, alors que les porte-greffe M26 et Mac9 semblent être moins marqués par le séjour sur le même substrat de culture. Cette observation s'avère être en désaccord avec les capacités de reprise au sevrage rapportées par REGAZZI (1987) dans son travail sur le porte-greffe de pommier M26. L'auteur a relevé un taux moyen avoisinant 90% pour les vitroplants M26 transférés sur le substrat tourbeux, après une trentaine de jours de culture. Dans nos essais, nous avons obtenu seulement 67% de vitroplants de M26 capables de résister aux suites d'un transfert sur ce même support de culture. Cette différence pourrait être due au pH particulièrement bas de notre substrat préparé avec de la tourbe Novobal®, contrairement au pH obtenu par REGAZZI (1987) sur le TKS1®. Durant l'acclimatation des vitroplants de chêne (*Quercus robur*), VERMEER et EVERS (1990) ont aussi observé un accroissement plus rapide des sujets cultivés sur compost tradi-

tionnel, comparés à ceux qui sont repiqués dans la tourbe.

La mort de nos vitroplants de pommier, survenue au cours du transfert, coïncide souvent avec l'apparition du phénomène de nécrose apicale. Ce fait pourrait être la conséquence d'un changement physiologique profond, caractérisant l'entrée en dormance chez l'espèce ligneuse, comme le suggèrent VERMEER et EVERS (1990).

Par ailleurs, s'il n'existe pas de différence significative entre la variante perlite et le témoin M-RAC pour l'ensemble des trois cultivars, il n'en reste pas moins que les vitroplants sevrés sur la perlite présentent des signes de carence en fer, notamment pour la variété Golden où l'on remarque une chlorose internervaire accentuée sur tout le feuillage des vitroplants (fig. 2). Ce phénomène de carence en fer semble être lié d'une part à un pH élevé (DEMOLON, 1950), caractéristique de la perlite en début de culture, et d'autre part au cultivar Golden lui-même, particulièrement sensible lorsqu'on le cultive sur ses propres racines. VERDONCK et al. (1980) ont cependant remarqué une meilleure croissance des espèces ornementales *Fatsyhedera* et *Dieffenbachia exotica* cultivées sur substrat perlite inerte.

Concernant le substrat Optima, l'effet favorable à la reprise de croissance se manifeste particulièrement sur la variété Golden, si on le compare à la perlite prise comme témoin, alors que pour les porte-greffe M26 et Mac9, la différence de survie des cultures sur ces deux substrats ne semble pas être significative.



Fig. 2. Variété Golden Delicious après sevrage montrant un début de chlorose internervaire sur substrat de perlite.

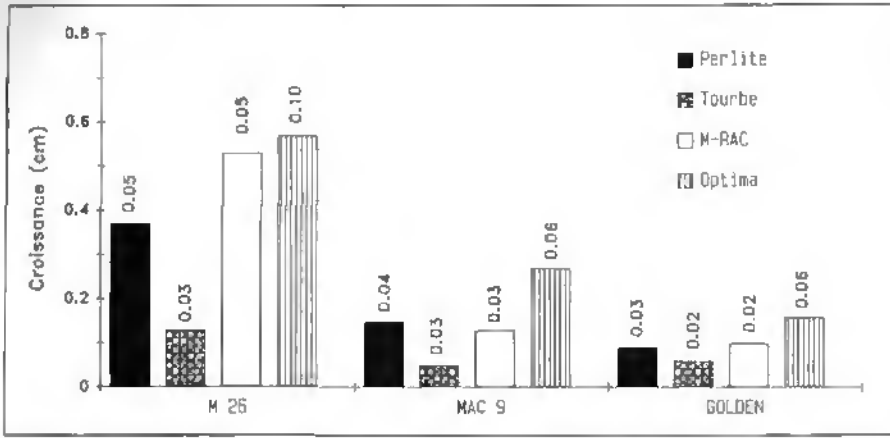


Fig. 3. Croissance des vitroplants de pommier M26, Mac9 et Golden cultivés sur les substrats de perlite, tourbe, M-RAC et Optima. Les chiffres se trouvant au-dessus des barres représentent l'erreur standard.

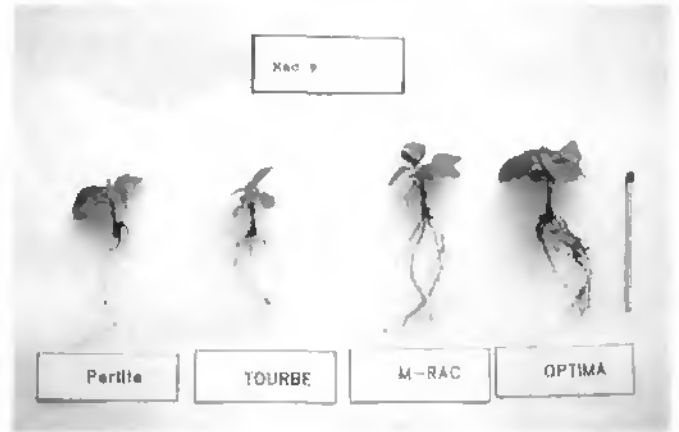
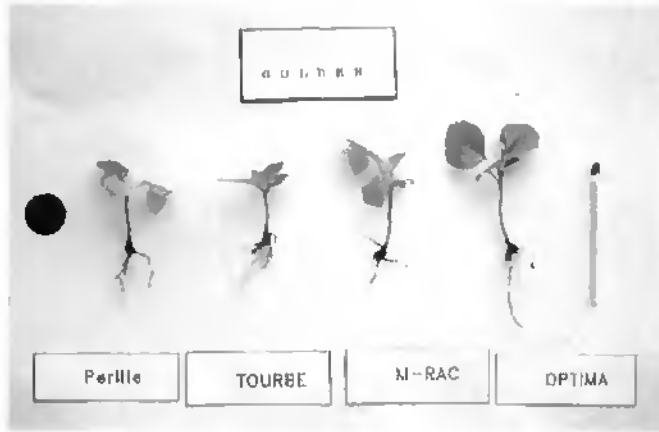


Fig. 4. a) Variété Golden Delicious cultivée sur perlite, tourbe, M-RAC et Optima. b) Porte-greffe Mac9 cultivé sur perlite, tourbe, M-RAC et Optima.

### Croissance des vitroplants

L'examen des résultats exprimés à la figure 3 confirme la supériorité du substrat Optima pour les cultivars Mac9 et Golden, ou au moins équivalente pour le M26 par rapport au substrat M-RAC. La tourbe se révèle à nouveau le substrat le plus défavorable. La faible croissance des vitroplants cultivés sur les substrats les plus simples peut être expliquée par le fait que la perlite, en plus de son pH élevé, possède une capacité d'échange des cations quasi nulle (VERDONCK *et al.*, 1980; RYSER, 1985), ne permettant donc pas la

rétention des éléments nutritifs nécessaires à la croissance, et que la tourbe, dont le pH est trop bas dans le cas présent, pourrait également gêner l'absorption de certains éléments majeurs contribuant au développement des jeunes plantes (PENNINGSFELD, 1969). C'est ainsi que nous avons remarqué que toutes les plantes de pommier cultivées sur les supports perlite et tourbe présentent des entrenœuds écourtés portant de jeunes feuilles plus petites et peu développées, contrairement aux mêmes sujets qui sont maintenus sur M-RAC ou sur Optima (fig. 4a + b).

### Développement des racines

La comparaison du développement des nouvelles racines des cultivars de pommier sur les quatre substrats de culture permet les constatations suivantes (fig. 5) : l'aptitude à former des racines pour les vitroplants de M26 est fortement influencée par le séjour dans le substrat tourbeux (différence significative). On assiste en effet au développement d'un système racinaire beaucoup plus fourni, avec apparition de racines secondaires (fig. 6), contrairement au Mac9 pour le même type de substrat (différences non significatives). La variété Golden ne présente aucune différence quant au développement des nouvelles racines sur les quatre substrats expérimentés. Ce fait nous laisse supposer que le type de cultivar de pommier pourrait aussi jouer un rôle important quant à la capacité de former des nouvelles racines (COLLET *et al.*, 1988). Concernant la morphologie des racines développées dans les substrats de culture, il est intéressant de relever que les racines ont tendance à s'allonger beaucoup plus dans la perlite que dans les autres substrats de culture (fig. 7). Ce phénomène est aussi remarqué par RIGAZZI (1987), qui attribue ce fait à la pauvreté chimique de la perlite obli-

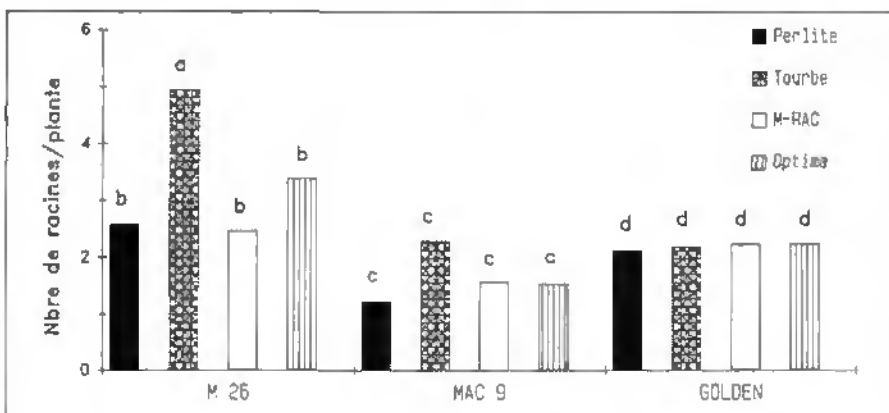


Fig. 5. Développement de nouvelles racines des vitroplants de pommier M26, Mac9 et Golden, cultivés sur perlite, tourbe, M-RAC et Optima. Les traitements portant la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5%.

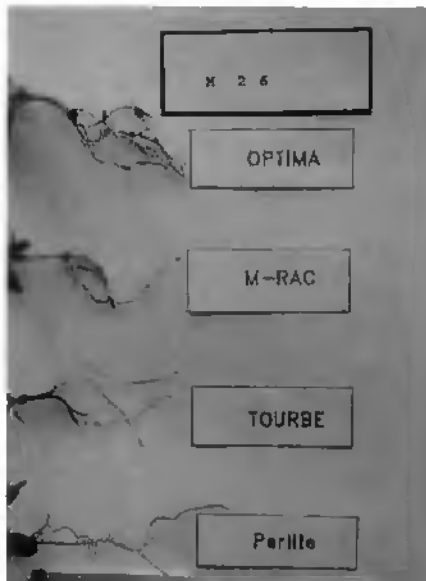


Fig. 6. Porte-greffe M26 cultivé sur de la tourbe, montrant un système racinaire fourni.

geant les racines à explorer toujours plus loin en direction des réserves nutritives.

## Conclusion

Les observations portant sur l'influence du type de substrat de culture lors du transfert en conditions de culture traditionnelles nous permettent de souligner les points importants suivants :

- L'aptitude d'adaptation à un nouvel environnement de culture chez les plantes de pommier produites *in vitro* dépend de la composition physico-chimique du substrat, qui doit assurer à la fois une aération suffisante et une bonne alimentation en substances nutritives.
- Le caractère variétal des cultivars de pommiers utilisés dans ces essais

(porte-greffe ou variété) peut également jouer un rôle important dans le développement des vitroplants en milieu traditionnel.

## Remerciements

Nos remerciements vont à MM. D. THOMAS, F. TSCHUY et J. DETTWILER qui ont apporté leur aide technique fort appréciée.

## Bibliographie

- ARNOLD M. A. and YOUNG E., 1990. Use of Dyes to facilitate measurement of new root growth of apple. *Hort. Science* 25 (1), 116-118.
- BRAINERD K. E. and FUCHIGAMI L. H., 1982. Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA and CO<sub>2</sub>. *J. Exp. Bot.* 33 (134), 388-392.
- COLLET G. F. et LÉ C. L., 1987. Micropropagation de porte-greffe de pommier et de poirier. I. Etablissement et multiplication *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, M27, MM106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. (A). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 19 (4), 253-259.
- COLLET G. F. et LÉ C. L., 1988. Micropropagation de porte-greffe de pommier et de poirier. II. Enracinement *in vitro* de *Pyrus malus* L. (M25, M26, M27, MM106, M9 type Jork) et de *Cydonia oblonga* Mill. (A). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 20 (2), 131-138.
- CONGER B. V., 1981. Agronomic crops. In: Cloning agricultural plants via *in vitro* techniques. Ed. Conger B. V., CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 273 p.
- DEMOLON A., 1950. Principes d'agronomie. II. Croissance des végétaux cultivés. Ed. Dunod, Paris, 477 p.
- FUCHIGAMI L. H., CHEN T. Y. and SOELDNER A., 1981. Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106 (4), 519-522.
- GRANT B. W. W. and ASTON M. J., 1978. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Hort. Res.* 17, 65-71.
- LÉ C. L., 1989. Microbouturage *in vitro* du thym (*Thymus vulgaris* L.). *Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 21 (6), 355-358.
- MAENE L. J. and DEBRERG P. C., 1986. Optimization of plant micropropagation. *Med. Fac. Land-bouw Rijksuniv. Gent.* 51, 1479-1486.

- PENNINGSFELD P. et KIRZMANN P., 1969. Cultures sans sol ou hydroponiques et sur tourbe. Ed. La Maison rustique, Paris, 219 p.
- PIERIK R. L. M., 1988. *In vitro* culture of higher plants as a tool in the propagation of horticultural crops. *Acta Hort.* 226, 25-40.
- REGAZZI M., 1987. Comparaison de quelques substrats artificiels dans le sevrage de porte-greffe d'arbres fruitiers produits *in vitro*. Travail de diplôme — ETS, ESVOA (Changins), 92 p.
- RYSER J.-P., 1985. Les substrats horticolaes. *Rev. Hort. Sul* 56 (6), 127-135.
- SHORT K. C., 1990. Application of *in vitro* techniques for the production and the improvement of horticultural plants. In: The impact of Biotechnology in Agriculture. Ed. R. S. Sangwan and B. S. Sangwan — Norreel, Kluwer Academic Publishers, 15-27.
- SUTTER E., 1988. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113 (2), 234-238.
- SUTTER E. and LANGHANS R. W., 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tip culture. *Can. J. Bot.* 60, 2896-2902.
- VERDONCK O., DE VLEESCHAUWER D. and DE BOODT M., 1980. Growing ornamental plants in inert substrates. *Acta Hort.* 99, 113-118.
- VERMEER E. and EVERS P. W., 1990. The influence of the substrate during acclimatization of *Quercus robur* *in vivo* after induction of rooting *in vitro*. *Acta Bot. Neerl.* 39 (1), 107.
- WARDLE K. and SHORT K. C., 1983. Stomatal responses of *in vitro* cultured plantlets. I. Responses in epidermal stripes of *Chrysanthemum* to environmental factors and growth regulators. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 178, 619-624.

## Zusammenfassung

Massenvermehrung von Apfelunterlagen. III. Akklimatisierung von *Malus pumila* Mill. (M26, Mac9) und *Malus domestica* Borkh. cv. Golden Delicious

Unterlagen der Apfelsorten M26, Mac9 und Golden Delicious wurden auf vier Substrate (Perlite, Torf, M-RAC und Optima) akklimatisiert und kultiviert um die Verhaltensmerkmale von *in vitro* vermehrter «Vitropflanzen» bei der Überführung in normalen Kulturbedingungen festzustellen.

Das Überleben und die Entwicklung der Apfel-Vitropflanzen werden in dieser Studie von dem verwendeten Substrat sowie von der Empfindlichkeit der Sorte bedingt.

## Summary

Micropropagation of apple-rootstock. III. Acclimatization of *Malus pumila* Mill. (M26, Mac9) and *Malus domestica* Borkh. cv. Golden Delicious

The apple-rootstocks M26 and Mac9, and the variety Golden Delicious were acclimatized and cultivated on four substrates Perlite, Peat, M-RAC and Optima in view of determining the behaviour of *in vitro* apple-«vitroplants» at the time of transferring them to soil conditions. Survival and growth of apple vitroplants were found to depend on the physico-chemical composition of the substrate, and on the variety.

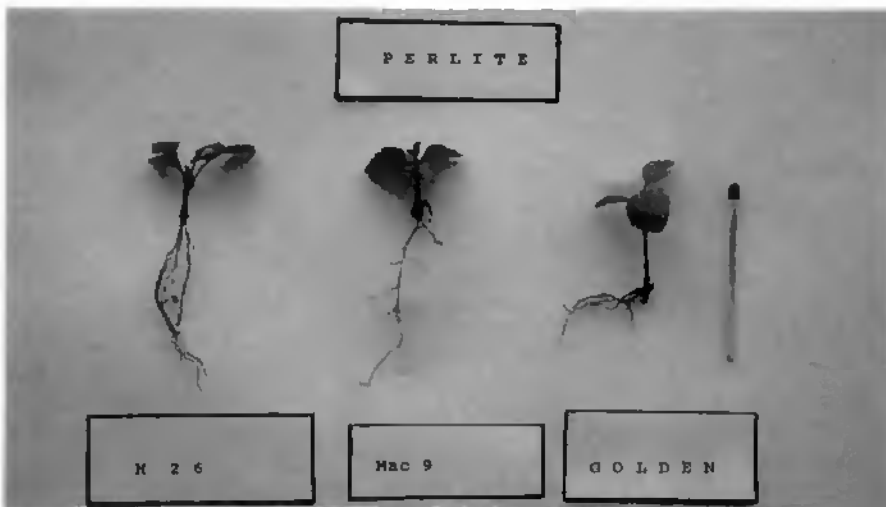


Fig. 7. Porte-greffe M26, Mac9 et variété Golden cultivés sur de la perlite.

## The *in vitro* Culture of *Artemisia annua* L.

C. L. Lê and G. F. Collet

Station fédérale de recherches agronomiques de Changins (RAC) CH-1260 Nyon

(Directeur: A. Vez)

### SUMMARY

#### The *in vitro* culture of *Artemisia annua* L.

Multiple shoots were obtained from shoot tip explants of *Artemisia annua* L. (cv. China) on a basal medium, Murashige and Skoog (MS) supplemented with 1,0 mg/l Benzyladenine (BA) and 0,1 mg/l  $\beta$ -indolylbutyric acid (IBA). Root formation of the *Artemisia* species was achieved by exposure of shoots to 0,5 mg/l of  $\beta$ -indolylbutyric acid. Regenerated plantlets were successfully transferred to soil where they continue to grow with a survival rate of more than 95%.

*Artemisia annua* L., an annual dicotyledon belonging to the *Asteraceae* (*Compositae*), is mainly distributed throughout the temperate regions. This plant has the potential to become an important medicinal drug as it contains Artemisinin (QINGHAOSU), a sesquiterpenoid lactone peroxide (LIU *et al.*, 1979), which has been widely used over a thousand years in Chinese traditional medicine for reducing fevers and malaria therapy (KLAYMAN, 1985 ; DENYS *et al.*, 1990).

Since 1986, culture of *Artemisia annua* in Switzerland, for the production of antimalarial drug artemisinin, was successfully achieved with different original plant sources including China, Spain, Yugoslavia, Romania, Hungary, Argentina, West Virginia and Italia. Artemisinin analysis of these *Artemisia annua* sources have revealed that important artemisinin content has been found in the chinese genotype in comparison with the remaining ones (DELABAYS, 1990). Nevertheless, the chinese strain failed to show any capacity of flowering under our field culture conditions, which may lead to bring in difficult the propagation of the artemisinin high-yielded cultivar.

In the present communication, a successful method for the *in vitro* mass propagation of *Artemisia annua* L. (cv. China), as an alternative source for the large scale production of pharmaceutically desirable compound, is reported.

Seeds of *Artemisia annua* L. (cv. China) provided from the WRAIR (Walter Reeds Army Institute of Research, Washington, D.C.) were germinated and grown under green-house conditions. Shoot tips approximately 2-3 cm long were taken from selected cultures and washed under running tap water for approximately 30 to 60 minutes. Surface disinfection involved soaking in 0,8% sodium hypochlorite solution plus a few drops of Teepol<sup>R</sup>, a wetting agent, for 15 minutes, followed by three rinses in sterile distilled water. Shoot tips 0,5 cm long (Fig. 1) were then transferred aseptically to basal agar medium containing MURASHIGE and SKOOG (1962) mineral salts, 3% sucrose, 0,7% agar (Difco Bacto Agar), 1 mg/l thiamine, 0,5 mg/l pyridoxine, 0,5 mg/l nicotinic acid and 100 mg/l myo-inositol.

The pH was adjusted to 5,7 before adding agar and the medium was sterilized by autoclaving at 121°C (1,1 kg.cm<sup>-2</sup>) for 15 minutes.

After one week on basal medium, surviving explants were transferred to media containing various growth regulators concentrations.

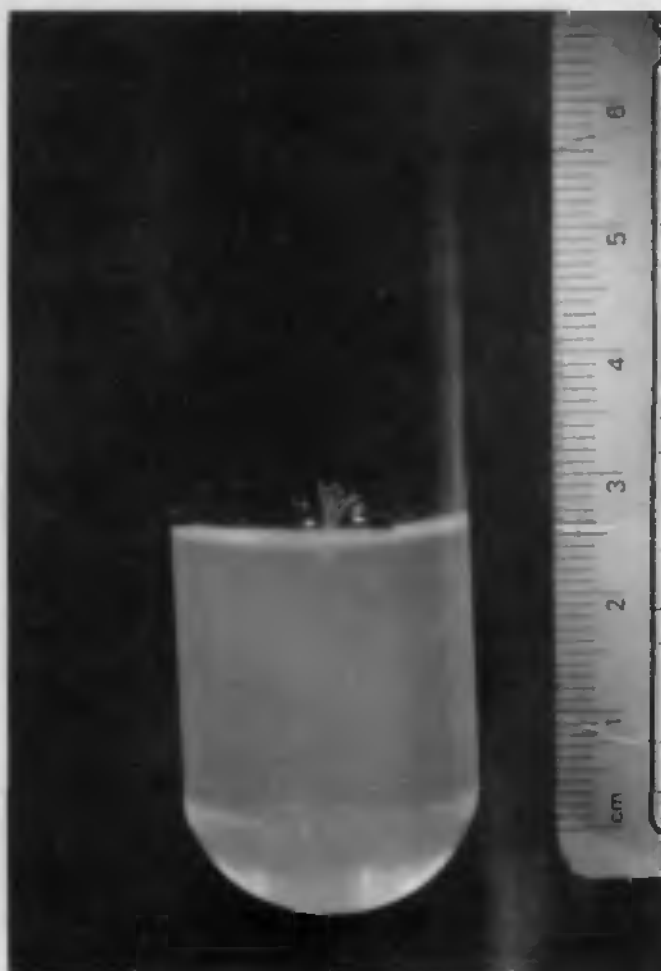


Fig. 1 *In vitro* establishment of *A. annua* L. (cv. China) shoot tip explant.

Cultures were incubated under a cycle of 16 h light at 22°C and 8 h dark at 18°C. The light source was cool white fluorescent tubes providing approximately 850  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  at the cultures level. Humidity of the growth chamber was maintained at 55-60%.

All treatments were replicated at least 16 to 20 times and the experiments were repeated thrice.

The process of organogenesis in *Artemisia annua* tip explants was controlled by growth substances supplied by the medium. The development of shoots depended mainly on the concentration of auxin and cytokinin. Best response was achieved under our conditions of culture with (IBA) 1,0 mg/l benzyladenine in combination with 0,1 mg/l  $\beta$ -indolylbutyric acid (IBA). In general, about four to six weeks after inoculation, new shoots were initiated from the initial explants and developed rapidly into clumps showing compact proliferated axillary shoots (Fig. 2). These shoots (0,5 cm in length) when subcultured on fresh medium supplemented with the same growth substance concentrations produced on an average 10-15 new shoots after a six weeks period.



Fig. 2 Development of multiple shoots from *Artemisia annua* L. (cv. China) shoot tip explant in a treatment containing 1 mg/l Benzyladenine (BA) and 0,1 mg/l  $\beta$ -indolylbutyric acid (IBA): 6-8 weeks after transfer on proliferation medium.

In order to induce adventitious root formation, newly formed shoots 0,5-1 cm in length removed individually from cultures of proliferating shoots were transferred to basal medium containing solely  $\beta$ -indolylbutyric acid at different concentrations (0-1 mg/l) for a month. Cultured shoot tips required exogenous auxin for initiation of adventitious roots. Roots were initiated most rapidly from shoots cultured on medium supplemented with 0,5 mg/l IBA; however, a low concentration of IBA (0.1 mg/l) failed to stimulate root initiation. On the contrary, IBA at higher concentrations (1 mg/l) resulted in the formation of a pale green callus at the basal part of shoots, and the extent of callus formation increased with increasing concentrations.



Fig. 3 Rooting of an isolated shoot of *A. annua* L. (cv. China) on medium containing 0,5 mg/l B-indolylbutyric acid (IBA) after 3 weeks of culture.

In general, root system proliferation was readily observed within 2 to 3 weeks on all the plantlets (Fig. 3). Nevertheless, it should be also mentioned about that spontaneous formation of roots in the medium containing cytokinin (BA) was occasionally observed. However, this was presumably coming from the old cultures, which had already been induced before transferring to the rooting medium. Afterwards, rooted plantlets were removed from the rooting culture medium and rinsed thoroughly in tap water to remove excess agar from the root system. The plants were then transferred to a potting mix composed of 70% ASB<sup>TM</sup> compost, 15% sand and 15% soil, and maintained under a fog system for one week. Once established, they were transplanted to potted soil with a 1:1 soil: ASB<sup>TM</sup> substrate (v:v) mixture, and cultivated under green-house conditions (Fig. 4) from February till April, and later transplanted to the field where they continue to grow normally without any aberration.



Fig. 4 *In vitro* regenerated *Artemisia annua* L. (cv. China) plants after 8 weeks in soil.

Our results show that *A. annua* L. (cv. China) shoot tip explants can undergo organogenesis *in vitro* under the control of growth regulators. Shoots were first initiated on the cytokinin rich medium, and later cultured on a modified MS medium supplemented solely with auxin to enable the formation of adventitious root system. More than 95% of rooted plantlets derived from *in vitro* survived the transfer to soil conditions after acclimatization.

These results provide a practical method for large scale clonal propagation of this valuable medicinal plant which failed to produce seeds under our conditions, at a faster rate all through the year.

#### Acknowledgment

The authors wish to thank Dr. D.L. Klayman, Walter Reeds Army Institute of Research (Washington, D.C.) USA, for kindly providing the plant material used in this study. We are thankful to Dr. A. Benakis, Department of Pharmacology, C.M.U., Geneva, Switzerland, for helpful advice on the provision of the original plant sources.

## ZUSAMMENFASSUNG

### *In vitro* Kultur von *Artemisia annua* L.

Mehrere Sprossen wurden von *Artemisia annua* L. (cv. China) Triebspitzenexplantate erzielt auf einem veränderten Murashige & Skoog Medium mit 1,0 mg/l Benzyladenin (BA) und 0,1 mg/l  $\beta$ -Indolylbuttersäure (IBA). Die Wurzelbildung der *Artemisia* species wurde erzielt durch Behandlung der Sprossen mit 0,5 mg/l  $\beta$ -Indolylbuttersäure. Die regenerierten Stecklinge wurden erfolgreich in gärtnerische Substrate verpflanzt, wo sie weiter gedeihen mit einem Überlebensgrad von mehr als 95%.

## RESUME

### Culture *in vitro* de l'*Artemisia annua* L.

De nombreuses pousses ont été obtenues à partir d'Apex de tige d'*Artemisia annua* L. (cv. Chine) cultivés sur un milieu de base de MURASHIGE et SKOOG (MS) renfermant 1,0 mg/l de Benzyladénine (BA) et 0,1 mg/l d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (IBA). La formation des racines adventives a été réalisée en traitant les microboutures avec 0,5 mg/l d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique. Des plantes ainsi régénérées ont été transférées avec succès en conditions de culture sur substrat terreux, et ont poursuivi leur croissance avec un taux de survie supérieur à 95%.

## LITERATUR CITED

- DELABAYS, N., 1990: Premières observations sur la mise en culture de nouvelles espèces médicinales. Rev. suisse Vitic., Arboric., Hort., 22, 149–152.
- DENYS, J. C., SIMON, J. E., WOOD, K. V., HEINSTEIN, P., 1990: Germplasm variation in Artemisinin content of *Artemisia annua* using an alternative method of Artemisinin Analysis from crude plant extracts. J. Nat. Prod., 53 (1), 157–160.
- KLAYMAN, D. L., 1985: Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. Science 228, 1049–1055.
- LIU, J. M., NI, N. Y., FAN, J. F., TU, Y. Y., WU, Z. H., QU, Y. L., CHOU, M. S., 1979: Structure and Reaction of Arteannuin. Acta chim. sin., 37, 142–143.
- MURASHIGE, T., SKOOG, F., 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473–497.

# XV Micropropagation of *Nematanthus*

C.L. Lê<sup>1</sup>

## 1 Introduction

*Nematanthus* Schrader, a member of the family Gesneriaceae, resulted from the cross of *Hypocyrtia* and *Nematanthus* (Moore 1973), is classified into 26 neotropical species (Chautems 1985). Wiehler (1979, 1983), based on the morphology of flowers and leaves, and ecological distribution, has clearly defined the genus *Nematanthus* as epiphytic, ornithophilous, perennial herbs and subshrubs, restricted to southeastern Brazil. The basic chromosome number for all *Nematanthus* species is  $n = 8$ . The leaves of these species are characterized by the presence of hypodermis. The corollas, which might be orange, red, or yellow, are usually pouched or enlarged at the bottom and more or less laterally compressed. The fruit is a displayed capsule type.

The genus *Nematanthus*, an endemic group closely related to the coastal rainforest of Brazil, grows between 14 and 29° latitude south (Chautems 1985). Most of them are found along the coast of Rio de Janeiro, Sao Paulo, Pasana, and Santa Catarina, at an altitude between 500 and 1200 m. It has been noted that each species settled an area more or less gregariously under these natural growth conditions (Chautems 1985).

In horticultural practice, *Nematanthus* is propagated by seed or vegetatively from shoot cuttings. These techniques can be employed at any time of the year (Reist 1979).

Seed propagation is relatively easy, but not advisable due to the fact that seed progeny is extremely heterogeneous. The growth rate of plants obtained from seed germination is low, and flowering will take place about 18 months after the seedlings have been sown (Reist 1978b, 1979). However, this procedure is now used only for genetic improvement programs (Chautems 1985). On the other hand, cutting is the preferred method for traditional mass propagation. Reist (1978b) showed that tip cuttings of *N. gregarius* with four to eight leaf pairs, removed from mother plants and placed on a rooting medium without growth regulators and under mist environment, root with 100% success after 1 month. After being potted and pinched back to two or three pairs of leaves, the cultures are continued from 8 to 10 months more – depending on the period of propagation – to reach the flowering stage.

<sup>1</sup> Station fédérale de Recherches Agronomiques de Changins (RAC), 1260 Nyon, Switzerland

At present, *N. gregarius*, with its highly attractive foliage and bloom, is almost exclusively produced for the pot plant market. Recently, some of the existing species, e.g., *N. fissus*, *N. fritschii*, *N. hirtellus*, *N. longipes*, *N. nervosus*, *N. perianthomegus*, *N. strilligosus*, and *N. wettsteinii*, have given rise to a number of valuable hybrids which could be of interest for indoor plant production (Reist 1978a).

Despite the ease with which most gesneriads, including the genus *Nematanthus*, can be propagated by conventional methods, in vitro culture techniques could offer a valuable alternative (Lê 1984) for the rapid clonal multiplication of new cultivars if rapid breeding is to be done.

## 2 In Vitro Studies

The successful application of tissue culture methods to mass propagation of a number of gesneriads has been widely demonstrated during the last decade (Start and Cumming 1976; Johnson 1978a, b; Hughes and Barni 1978; Bilkey and McCown 1979; Lê 1980; Lê and Collet 1981). However, little is known about in vitro clonal multiplication of *Nematanthus*, except for our preliminary work (Lê 1984, 1988). The method used to regenerate complete plantlets of *Nematanthus* through in vitro tissue culture is reported here.

### 2.1 Establishment of Shoot Cultures

Actively growing shoots (2–4 cm long) can be excised from the floral branches of mother plants cultivated under greenhouse conditions at any time of the year, but plant material should preferably be collected from February till June if to obtain high rate of explant growth during the establishment stage is desired (unpubl.).

Leaves were removed and washed for 30 min under running tap water. The washed material was then surface sterilized by dipping in 70% ethanol for a few seconds to break surface tension, and soaked twice for 10 min in 0.5% (vol/vol) sodium hypochlorite containing 2 drops Teepol (per 100 ml) as a wetting agent. The shoot pieces were then rinsed three times with sterile distilled water. Finally, 5-mm-long apices (Fig. 1) were excised from the surface sterilized shoot tips, using a scalpel and a pair of forceps, and transferred to the culture medium.

### 2.2 Media and Culture Conditions

The basal nutrient medium consisted of Murashige and Skoog's (MS) (1962) inorganic salts supplemented with 0.4 mg/l thiamine-HCl, 0.5 mg/l nicotinic acid, 0.5 mg/l pyridoxine-HCl, 100 mg/l Myo-inositol and 3% sucrose. Various combinations of auxin and cytokinin were added to the basal medium in order to induce shoot proliferation. For further growth into complete plantlets, regenerated shoots (1–2 cm long) were excised from shoot-proliferating explants and transferred to the



Fig. 1. An initial explant using shoot tip (0.5 cm in length) at the time of culture. Bar 1 mm

basal medium containing various concentrations of indole-3-butyric acid (IBA), which was the sole growth regulator supplement, in the range of 0.01 to 5.0 mg/l. Sucrose was reduced to 2% in all treatments of rhizogenesis. The media were solidified with 0.7% Difco-Baco Agar and the pH was adjusted to 5.7 prior to autoclaving at 121 °C (1.1 kg/cm<sup>2</sup>) for 15 min.

All cultures were incubated in a temperature-controlled environmental chamber at 23 °C in complete darkness for 3–6 days; afterwards, they were placed in a 16-h photoperiod and 23 °C day/18 °C night temperature regime. The irradiance was 850  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  (measured over the range of wavelengths 400–700 nm) provided by cool white fluorescent lamps (Mazda Aviva TF/65AV1).

### 2.3 Mineral Salts

Experiments carried out in our laboratory using shoot tip explants showed that the *Nematanthus* spp. required a high concentration of MS macronutrients for rapid proliferation of shoot primordia (Fig. 2). At low concentrations (one-quarter or one half) of the basal MS medium, the frequency of shoot explants forming new shoots was relatively reduced; shoots thus obtained were dwarf and etiolated in appearance, and most of them were unavailable for further subculturing operations. While increasing the concentration from one half to four-fifths of the basal MS medium, a significant increase in the number of shoot tip explants giving rise to vigorous shoots was found. At full strength of the MS macronutrients, more than 95% of the initial explants developed shoots.

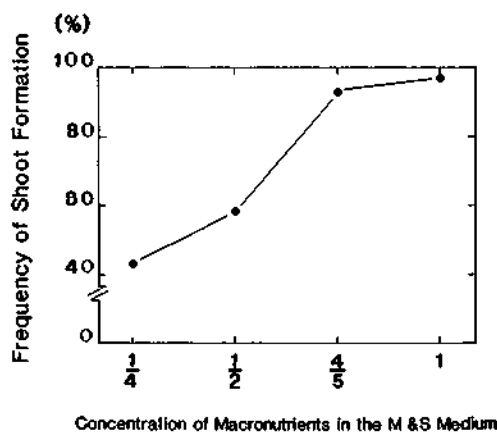


Fig. 2. Effect of various concentrations of the macronutrients in the MS basal medium on frequency of shoot formation from shoot explants of *Nematanthus* sp

## 2.4 Effect of Growth Regulators

### 2.4.1 Effect of NAA

The incorporation of naphthalene-acetic acid (NAA) into the basal medium at 0.01 mg/l did not show any apparent effect on shoot proliferation (Fig. 3). At low concentration (0.01 to 0.01 mg/l), NAA stimulated root development after several weeks of culture, whereas increasing NAA level from 1 to 2 mg/l resulted in stimulation of callus formation, which had an inhibitory effect on the initiation of shoot primordia on shoot tip explants.

### 2.4.2 Effect of BA

Shoot tip cultures on the basal medium containing 0.1 to 1.0 mg/l 6-benzylaminopurine (BA) as the sole growth regulator source led to moderately developed shoots (Fig. 3). Most of them were deformed and appeared to be injured. At higher concentrations of BA (2.0 mg/l), shoot growth was severely inhibited and profuse friable callus formation took place in the basal cut ends.

### 2.4.3 NAA/BA-Interaction

As shown in Fig. 3, the incubation of shoot tip explants on the medium supplemented with BA and NAA resulted in higher shoot proliferation rates, as opposed to those where BA or NAA was added singly to the medium. In cultures grown in the presence of 1.0 mg/l BA and 0.01 or 0.1 mg/l NAA, a maximum development of normal shoots was observed within 6 weeks of transfer from basal medium (Fig. 4). The addition of NAA at the concentration of 0.1 mg/l or more yielded limited shoot proliferation or did not promote shoot initiation when 0.1 mg/l BA was supplied in the basal medium.

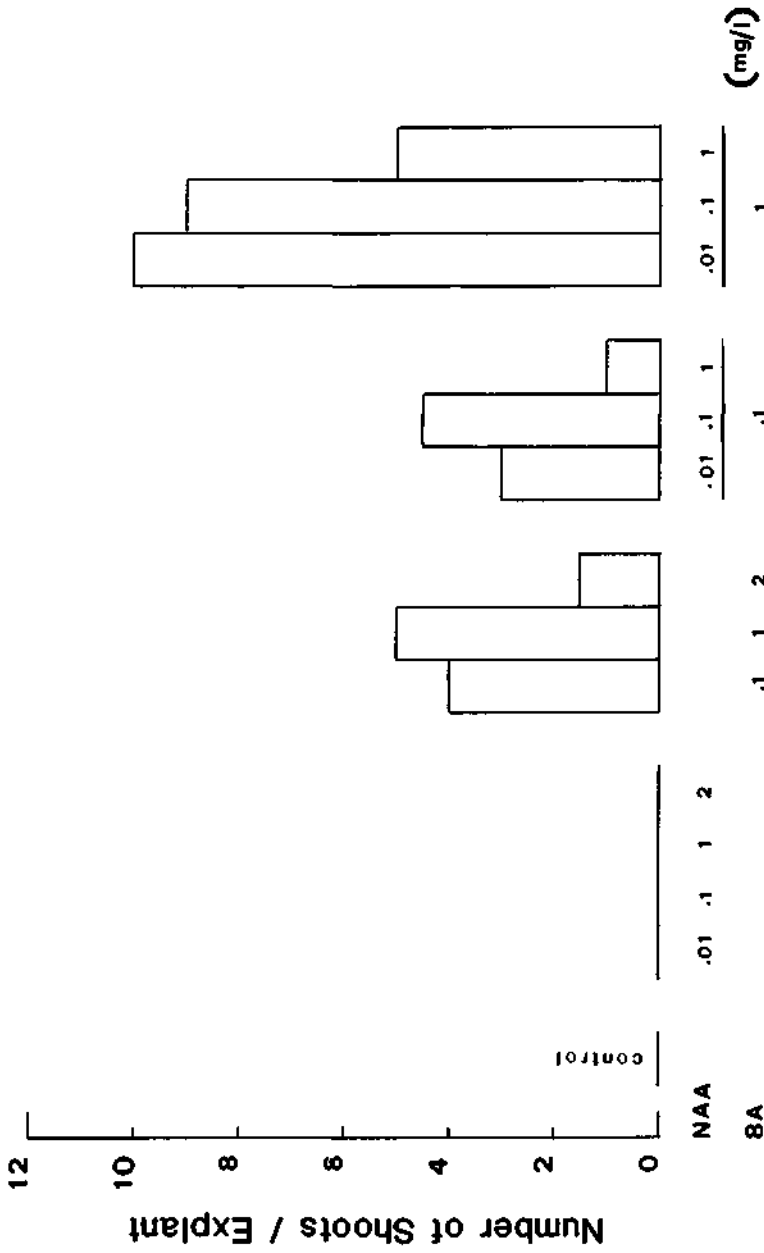


Fig. 3. Effect of BA and NAA on shoot proliferation of *Nematanthus* shoot explants



Fig. 4. Shoot development from shoot tip explant on MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 0.01 mg/l NAA. Bar 1 cm

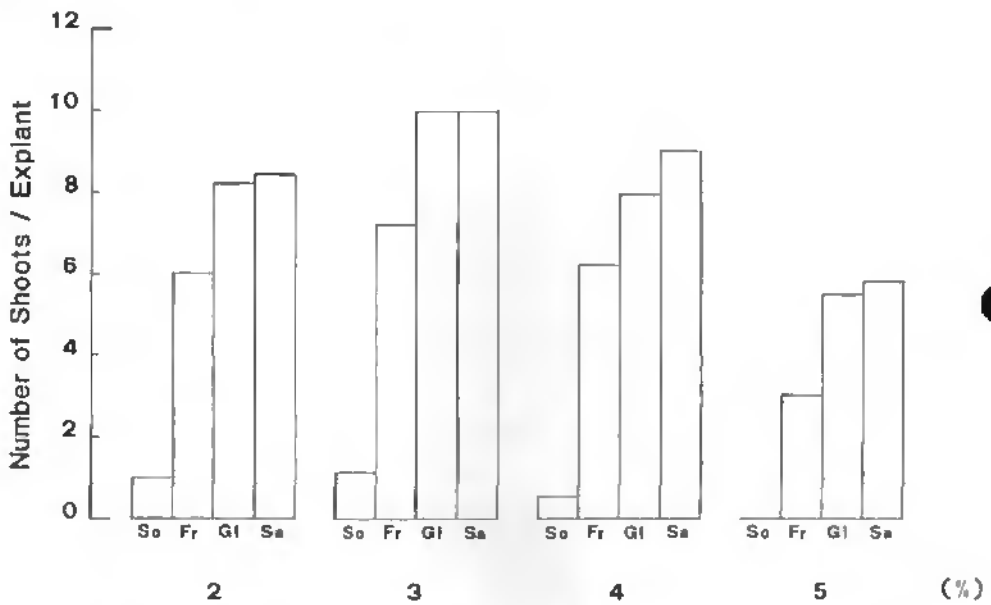


Fig. 5. Effect of different carbon sources on shoot formation from shoot tip explants So sorbitol; Fr fructose; Gl glucose; Sa sucrose

## 2.5 Carbon Sources

The carbon source in the medium seems to play a role for in vitro growth of *Nematanthus*. The effect on in vitro development of different carbon sources such as sucrose, glucose, fructose, and sorbitol ranging from 2 to 5% have been investigated. As shown in Fig. 5, glucose and sucrose at a concentration of 3% were found to be optimal for new shoot development, while fructose at all concentrations tested yielded growth rate less than glucose and sucrose treatments. If sorbitol is added in the medium as the sole source of carbon, the growth rate of initial explants was severely reduced and the formation of new shoots failed to occur at higher concentrations (up to 4%).

## 2.6 pH

The optimum pH for in vitro growth of *Nematanthus* was in the range of 5.5 to 5.8. pH lower than 5.5 could retard the induction of shoot development on initial explants, whereas increasing pH to higher than 6 significantly decreased the multiplication rate per subculture.

## 2.7 Subculture of Shoots

For repeated subculturing, shoots 0.5–1 cm in length excised from growing shoot clusters were transferred to the basal medium supplemented with reduced BA concentration at the level of 0.5 mg/l, in combination with 0.1 mg/l NAA. This procedure has been now maintained for more than 30 subcultures without any loss of morphogenetic responses. The multiplication rate was ten fold per subculture at 4-6-week intervals.

## 2.8 Rooting

Adventitious root formation could be induced on indole-3-acetic acid (IAA) as well as on indole-3-butyric acid (IBA), but the rooting frequency with IAA treatment was very low in comparison with IBA treatment. Moreover, if the medium was supplied with naphthalene-acetic acid (NAA), the risk of forming profuse callus at the basal cut end of the cuttings was extremely high during the rooting stage. For these reasons, all rooting treatments were performed with various concentrations of IBA, which led to satisfactory results. The most effective concentrations of IBA for root induction was 0.05 mg/l under our conditions of experiments (Fig. 6). Roots occurred, without callus formation, in a great number of 3 weeks of culture and were concentrated on the proximal part of the cuttings. Complete inhibition of rooting accompanied by callus development occurred at higher concentration (up to 2.0 mg/l) (Lê 1988). It was also noted that the percentage of shoots forming roots improved with increasing subcultures.



Fig. 6. Root initiation on shoot explant at 3 weeks after transfer to the medium containing 0.05 mg/l IBA. Bar 1 cm



Fig. 7. Regenerated *Nematanthus* plantlets growing in the greenhouse

## 2.9 Transfer to the Greenhouse

In the greenhouse, plantlets regenerated in vitro were removed from the culture containers and rinsed in tap water to discard excess agar from roots before transferring to soil mixture using peat:perlite (5:1). They were then maintained under intermittent mist conditions for hardening during the first 10 days, and were allowed to grow on their own after the mist period (Fig. 7). More than 90% of plants transferred to greenhouse conditions continued to grow normally and were identical to the parents.

## 3 Summary and Conclusion

The present results demonstrate that, with appropriate media and environmental conditions, the culture and regeneration of *Nematanthus* can be achieved by using shoot tip explants from mature plant material. This finding can offer an adequate technique as potential for the rapid clonal propagation of valuable cultivars of *Nematanthus* for commercial production in addition to the conventional methods of multiplication.

## 4 Protocol

1. Establishment of surface sterilized shoot tips (0.5 cm long) on basal MS medium containing 10 mg/l BA and 0.1 mg/l NAA.
2. Shoot multiplication can be induced on the basal medium supplemented with 1.0 mg/l BA and 0.01 mg/l NAA. Repeated subculturing can be achieved at 4- to 6-week intervals onto fresh medium with reduced BA concentration (0.5 mg/l).
3. Rapid rooting is accomplished by culturing isolated shoots on the basal medium supplied with 2% sucrose and 0.05 mg/l IBA as the sole inducing agent.
4. Plantlets with well-developed root system are transferred to a peat:perlite (5:1) mixture and gradually acclimatized to greenhouse conditions.

## References

- Bilkey PC, McCown BH (1979) In vitro culture and propagation of *Episcia* sp. (Flame violet). *HortScience* 14: 109-114
- Chautems A (1985) Révision taxonomique et possibilités d'hybridation de *Nematanthus* Schrader (Gesneriaceae), genre endémique de la forêt côtière brésilienne. PhD Thesis, Université de Genève (Switzerland)
- Harney PM (1982) Tissue culture propagation of some herbaceous horticultural plants. In: Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry. Univ. Guelph, Ontario, Canada, pp 187-208

- Hughes KW, Barni B (1978) Regeneration of *Kohleria amabilis* (Gesneriaceae) from leaf and petiole explants. Symp Prop high plants through Tiss Cult, Univ Tennessee, Knoxville, April 16-19
- Johnson BB (1978a) In vitro propagation of *Gloxinia* from leaf explants. HortScience 13: 149-150
- Johnson BB (1978b) In vitro propagation of *Episcia cupreata*. HortScience 13: 596
- Lê CL (1980) Microbouturage in vitro de l'*Aeschynanthus hildebrandii* Hemsl. Rev Suisse Vitic, Arboric, Hortie 12(5): 245-248
- Lê CL (1984) Multiplication végétative in vitro de *Nematanthus* hybride. Rev Suisse Vitic, Arboric, Hortie 16(4): 185-188
- Lê CL (1988) Rapid propagation of *Nematanthus* hybrid in vitro. Acta Hortie 226: 635-638
- Lê CL, Collet GF (1981) Avantages et contraintes de la multiplication in vitro de *Saintpaulia ionantha* Wendl. Rev Suisse Vitic, Arboric, Hortie 13(5): 265-270
- Moore HE (1973) Comments on cultivated Gesneriaceae. Baileya 19: 35-41
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497
- Reist A (1978a) Il n'y a plus d'*Hypocyrtia*. Hort Mar Rom 12: 5-7.
- Reist A (1978b) *Nematanthus gregarius*, multiplication et culture. Hort Mar Rom 12: 7-13
- Reist A (1979) Growing *Nematanthus gregarius*. Gloxinian 29: 19-23
- Start ND, Cumming BG (1976) In vitro propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. HortScience 11: 204-206
- Wiehler H (1979) Generic delimitation in a new classification of the neotropical Gesneriaceae. PhD Thesis, Univ Miami, Fl
- Wiehler H (1983) A synopsis of the neotropical Gesneriaceae. Selbyana 6 (1-4): 1-219

## **Multiplication *in vitro* du Châtaignier (*Castanea sativa* Mill.)**

### **1. Etablissement et Multiplication *in vitro*.**

C. L. Lé\*

Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon  
(Directeur: A. Vez)

#### **RÉSUMÉ**

Dans cet article nous décrivons une technique de multiplication *in vitro* des clones de châtaignier sélectionnés en Suisse. L'importance du mode de préparation et le choix de l'explant sur le taux de réussite à l'établissement sont mis en évidence. La composition du milieu de culture en regard des génotypes peut jouer un rôle important dans le développement d'une technique de propagation.

#### **Introduction**

Introduit à large échelle en Europe du sud par les grecs, le châtaignier, espèce ligneuse de la famille des fagacées, originaire de l'Asie du sud-ouest, est cultivé principalement pour son fruit (aliment et fourrage) et pour son bois (construction) (SMITH, 1979).

En Suisse, la castanéiculture constitue dans la partie sud des Alpes un élément important pour sa valeur économique et écologique. Or l'espèce indigène, *Castanea sativa*, implantée dans les châtaigneraies de cette contrée se montre sensible à la maladie du chancre de l'écorce qui est provoquée par l'agent pathogène *Cryphonectria (Endothia) parasitica* (MURRIL) P. J. BARR & H. W. ANDERSON (BAZZIGHER et MILLER, 1991). Des dégâts importants occasionnés par cette épidémie désastreuse ont amené la Suisse à entreprendre, dès les années cinquante, un programme de sélection de clones de châtaignier résistants à la maladie du chancre (BAZZIGHER et MILLER, 1987). De ces travaux, les clones de châtaignier reconnus résistants à l'*Endothia* ont été effectivement sélectionnés et ont donc constitué une source de génotypes d'un grand intérêt économique. Cependant, pour le développement et la diffusion de ces ressources à des fins expérimentales et aux utilisateurs potentiels, le sélectionneur est confronté, avec les techniques traditionnelles de multiplication (greffage, marcottage), à des difficultés relevant de la variabilité des semis, de l'incompatibilité des greffes, de l'infection en cours de greffage, tant et si bien que la production régulière de plants de base ne peut être assurée. Aussi, la culture *in vitro* a été choisie, dans le cas présent, comme moyen de propagation intensive et conforme pour l'obtention rapide de matériel sélectionné nécessaire aux travaux d'amélioration.

Dans ce travail, nous rapportons les premiers résultats concernant l'établissement et la multiplication *in vitro* des clones de châtaignier sélectionnés pour leur caractère résistant à l'*Endothia parasitica* (BAZZIGHER et MILLER, 1987).

Le présent travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre l'Institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage de Birmensdorf, le groupe de

\*) Avec la collaboration technique de M<sup>me</sup> B. DÉCORVET.

travail sur le châtaignier au Tessin et le service de Biologie végétale (groupe Culture *in vitro*) de la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins.

## Matériel et Méthodes

### Matériel végétal

Des plantes de Châtaignier comprenant une vingtaine de clones (tab. 1) cultivés en pépinière, à Lattecaldo, sont utilisées dans nos essais.

Tabl. 1. Liste des clones de châtaignier suisses cultivés *in vitro* au 7.7.1992.

Clones	Provenance	Matériel	Etabl.	Multi.
6259	Osogna	Adulte	+	+
1071	Osogna	Adulte	+	+
54-478	Lattecaldo	Jeune	-	
K-5526	Lattecaldo	Jeune	+	+
54-1046	Lattecaldo	Jeune	+	
65-1140	Lattecaldo	Jeune	-	
65-1242	Lattecaldo	Jeune	+	
68-1630	Lattecaldo	Jeune	+	
71-3312	Lattecaldo	Jeune	+	
71-3520	Bellinzona	Jeune	+	
71-6786	Lattecaldo	Jeune	+	
71-6473	Lattecaldo	Jeune	+	
71-7110	Lattecaldo	Jeune	+	
73-1638	Lattecaldo	Jeune	+	
73-3067	Lattecaldo	Jeune	-	
73-3316	Lattecaldo	Jeune	+	
73-3746	Lattecaldo	Jeune	+	
KL-5587	Lattecaldo	Jeune	-	
Malcantone	Taverne	Adulte	-	
M. Di Sagno	Taverne	Adulte	-	
Torcione	Taverne	Adulte	+	
Verdesa	Taverne	Adulte	+	+
Ludiano	Ludiano	Adulte	-	

(+): Clones établis et multipliés *in vitro*

(-): Clones récalcitrants

## Techniques

### Installation du matériel non débouffé

Des rameaux de 20 à 25 cm de longueur prélevés sur des pieds-mères aux mois de janvier et février, sont découpés en segments de 1 à 2 nœuds.

Ces segments sont désinfectés, après un bref passage dans de l'éthanol à 70%, par un double trempage, d'abord dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1%, additionné d'un mélange d'antioxydants (acide ascorbique 1% + acide citrique 1,5%) et de quelques gouttes de mouillant (Tween 80), pendant 20 minutes. Puis, après un bref rinçage à l'eau stérile, ils sont transférés dans une solution de Kohrsolin® (Glutaraldéhyde, N,N'-bis-(hydroxyméthyle) Urée (Bode & Co, Hamburg) à 3%, pendant 20 minutes.

Ensuite ils sont lavés abondamment dans de l'eau stérile contenant 50% (v/v) d'un antioxydant (acide ascorbique 1% + acide citrique 1.5%) et séchés entre deux feuilles de papier filtre stériles.

Sous une loupe binoculaire (grossissement 10 ×), les apex de châtaignier mesurant environ 2 mm (Fig. 1 a, b) sont extraits des bourgeons et placés sur un milieu d'établissement.

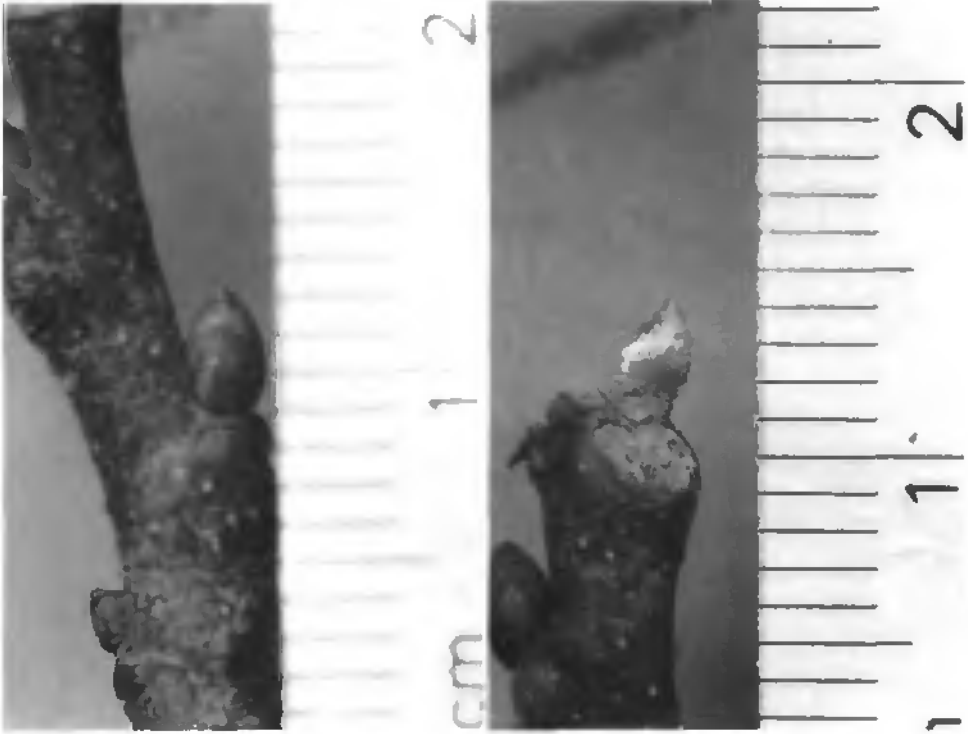


Fig. 1: Segment de rameau de châtaignier montrant le bourgeon axillaire avant le prélèvement (a) et au moment de l'excision (b)

#### *Installation du matériel débourré*

Des rameaux de châtaignier récoltés en pépinière (fig. 2) sont mis à débourrer sur un lit de Perlite abondamment humidifiée, sous un brouillard sec (Fog system). Des applications d'un fongicide (Benlate®) ont été également pratiquées sur le matériel végétal au cours du débourrement, ceci en vue de réduire les risques d'infection par des microorganismes lors de l'établissement.

Une partie du matériel expérimental est mis à débourrer à l'obscurité, afin de prévenir la production de composés phénoliques toxiques pour les jeunes tissus apicaux.

La désinfection en surface du matériel végétal débourré suit le même procédé que celui qui est pratiqué pour le matériel non débourré, mentionné plus haut.

La mise en culture des pousses développées en serre, contrairement à l'établissement des apex de bourgeons non débourrés, consiste à prélever uniquement des segments comportant chacun au moins un bourgeon (noeud), ceci après avoir débarrassé toutes les parties altérées par la désinfection, et à les placer sur le milieu d'établissement.



Fig. 2: Rameaux de châtaignier mis en débourrement forcé en serre à brouillard sec (fog system)

## Milieux de culture

### Milieu d'établissement

Les explants initiaux sont cultivés dans des tubes de culture de 25 × 150 mm contenant 15 ml d'un milieu de base de MURASHIGE et SKOOG (1962) dont la teneur en nitrate est réduite de moitié. A ce milieu sont ajoutés 1,0 mg/l de thiamine, 0,5 mg/l de pyridoxine, 0,5 mg/l d'acide nicotinique, 100 mg/l de myo-inositol, 0,2 mg/l de Benzylaminopurine (BAP), 25 mg/l de Cystéine et 100 mg/l de Pénicilline G. Le pH est ajusté à 5,7 avec du NaOH ou de l'HCl à 0,1 N avant l'autoclavage à 121°C (1,1 kg/cm<sup>2</sup> de pression), pendant 15 minutes.

Afin de déterminer si la nature physique du milieu nutritif peut influencer la réussite à l'établissement *in vitro*, les explants initiaux sont maintenus sur deux types de milieu de culture, solidifié ou non avec de l'Agar à 0,7%.

L'effet du sulfate d'hydroxyquinoléine (8-HQS) sur la réduction du taux d'infection durant la phase d'installation a été également examiné selon le procédé de LAIMER *et al.* (1991).

### *Milieu de prolifération*

Dans nos expériences préliminaires, il a été observé que la croissance des explants initiaux paraissait influencée par la composition minérale du milieu nutritif. Aussi avons-nous testé les sels minéraux des milieux suivants:

- MURASHIGE et SKOOG (1962) (MS) avec  $\frac{1}{2}$   $\text{NO}_3^-$ ;
- GRESSHOF et DOY (1972) (GD);
- HELLER (1953);
- LLOYD et MCCOWN (1980) (WPM).

### *Conditions de culture*

Les cultures sont maintenues pendant les trois premiers jours à l'obscurité, puis sont transférées à la lumière, avec une photopériode de 16 heures par jour. L'intensité lumineuse est de  $850 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  fournie par des tubes fluorescents, Mazda Aviva TF/65. La température est de  $23^\circ\text{C}$  pendant le jour et de  $18^\circ\text{C}$  la nuit. L'humidité relative est de  $55\% \pm 5\%$  dans la chambre de culture.

## **Résultats et discussion**

### **Etablissement *in vitro***

L'une des étapes importantes et délicates dans le processus de multiplication des végétaux ligneux, notamment le châtaignier, est l'établissement de matériel exempt de microorganismes pathogènes qui sont susceptibles de compromettre leur croissance et développement ultérieurement en milieu axénique. Aussi, une désinfection minutieuse du matériel végétal selon notre procédé mentionné plus haut (cf. Matériel et Méthodes), renforcée par divers modes de préparation et de prélèvement des explants initiaux a été expérimentée afin de réduire les risques de contamination au départ de toutes nos cultures.

### *Influence du mode de prélèvement des explants*

L'influence du mode de prélèvement, en rapport avec la manière dont on prépare les explants de châtaignier, sur le taux d'infection à l'établissement *in vitro* est illustrée par la figure 3. Pour les deux types de matériel préparé (non débourré et débourré), on note que, dans nos conditions de culture, les bourgeons non encore développés, mais dont la dormance est levée, ont un pourcentage de contamination élevé. Des pertes importantes de matériel prélevé en présence du tissu sous-jacent (avec talon) (65%) sont causées par la contamination de microorganismes, en général de bactéries, et par la nécrose des apex. Une légère diminution du taux d'infection (45%) a été observée pour les explants ne contenant pas de tissu sous-jacent (sans talon).

Par contre, l'installation du matériel provenant de bourgeons développés en serre à brouillard sec (Fog system), a permis d'obtenir une diminution importante du taux d'infection (25%) sur l'ensemble de nos clones de châtaignier expérimentés. Cela pourrait être expliqué par le fait que les jeunes bourgeons débourrés en conditions de serre, ont pu bénéficier pleinement d'une protection efficace contre les risques d'infection, et ceci d'une part grâce aux traitements préventifs avec un anticryptogamique à large spectre Benlate® durant la période de débourement, et d'autre part par l'adjonction au milieu

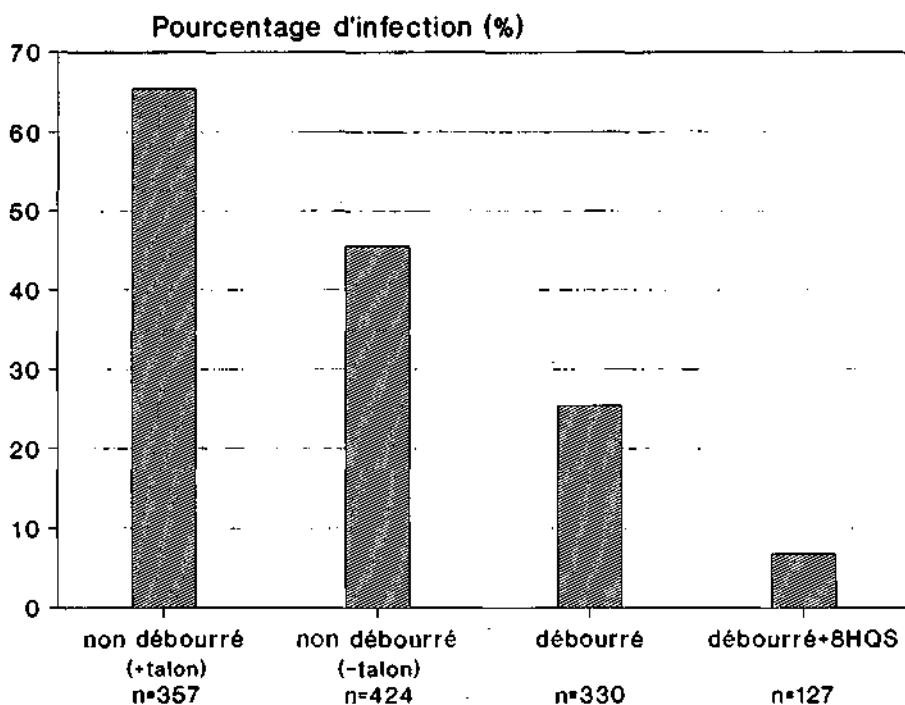
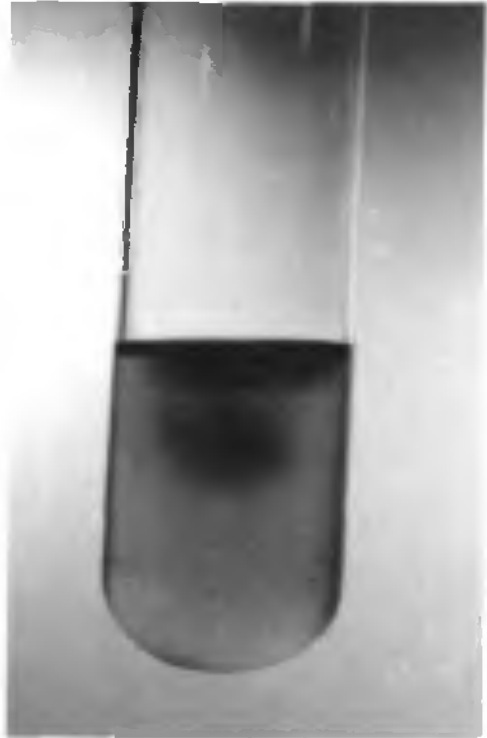


Fig. 3: Influence du mode de prélèvement des explants sur le taux d'infection à l'établissement.

de culture d'un antibiotique, la pénicilline G (100 mg/l), qui empêche le développement des microorganismes. Cette observation corrobore celles qui sont obtenues par HEN-NERTY *et al.* (1988), portant sur l'effet bénéfique de la pénicilline à l'établissement des explants initiaux du porte-greffe de pommier M26.

L'incubation des explants dans une solution de sulfate d'hydroxyquinoléine (8-HQS) à 0,1%, selon LAIMER *et al.* (1991), au premier jour de l'établissement, a également contribué à diminuer le taux d'infection à un seuil supportable (6,8%). La présence du 8-HQS dans le milieu de culture a permis non seulement d'empêcher le développement des microorganismes de par son action antimicrobienne et bactéricide connue, mais encore de réduire le phénomène de brunissement du milieu nutritif (fig. 4) grâce à son action inhibitrice sur l'activité des polyphénoloxydases. L'oxydation des composés phénoliques libérés dans le milieu nutritif par le tissu végétal fraîchement installé, principalement chez les fagacées dont fait partie le châtaignier, représente une des difficultés majeures lors de l'établissement des explants initiaux.

Pour parer à cet inconvénient, VIEITEZ et VIEITEZ (1980) propose le trempage du matériel végétal dans l'eau stérile pendant deux à trois heures avant de le transférer sur le milieu de culture, ceci pour éliminer les exsudats chargés de tanins, alors que MUL-LINS (1987) suggère des transferts fréquents de l'explant initial sur un milieu neuf, de même composition, pour améliorer sa croissance.

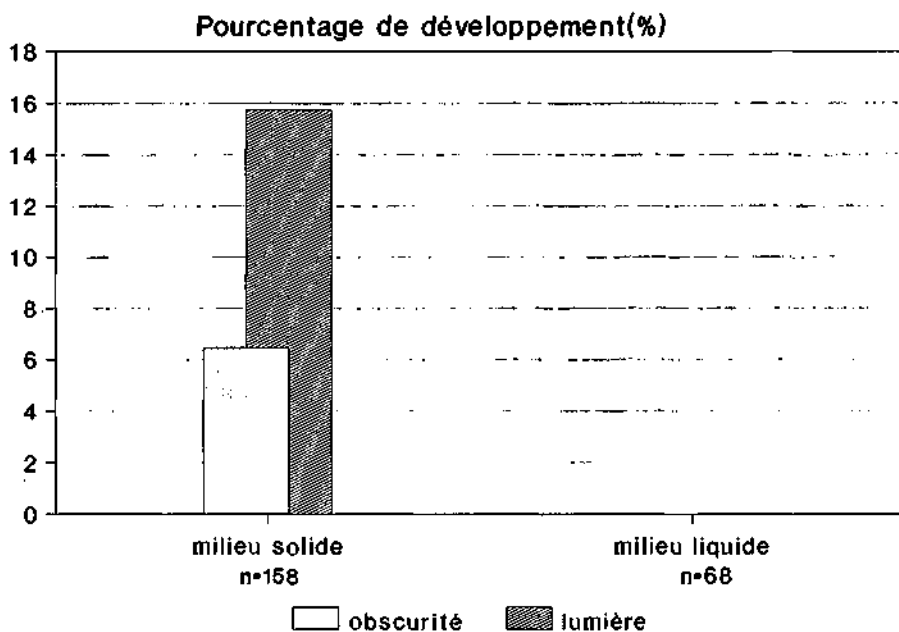


*Fig. 4:* Milieu nutritif rendu inapproprié à la croissance des explants par l'oxydation des composés phénoliques relargués par le tissu végétal.

#### *Reprise de croissance*

Afin de permettre aux explants de se développer dans des conditions optimales de culture, nous avons tenté, dans nos conditions d'expérimentation, d'éliminer les risques de brunissement du milieu nutritif en les soumettant à divers modes de préparation et de culture (cf. Matériel et Méthodes).

Comme le montre la figure 5, seul le milieu nutritif agarisé convient au développement des explants initiaux. L'absence de développement des explants sur le milieu de culture liquide coïncide, dans le cas présent, avec le brunissement général du matériel végétal au cours des premiers jours de culture. Cette observation suggère donc l'état d'anoxie du milieu liquide, qui pourrait être à l'origine du phénomène de brunissement et de l'arrêt de croissance de nos explants. Alors que sur le milieu solide, la reprise de croissance des explants initiaux semble être plus favorisée par le traitement effectué en conditions de débourement à la lumière que par celui qui est pratiqué à l'obscurité. Cette différence peut être expliquée par le fait que les explants provenant du matériel développé en conditions de lumière en serre à brouillard sec, malgré une forte teneur en composés phénoliques, possèdent une meilleure vigueur quant à la croissance de l'apex, au début de l'établissement, et par conséquent résistent mieux à l'opération de désinfection. Par contre, le matériel végétal débourent à l'obscurité s'avère être plus fragile et développe des pousses étiolées sensibles à la désinfection. L'apparition des nécroses apicales a été également observée indifféremment sur les explants débourents dans les deux conditions de préparation avec et sans lumière.



**Fig. 5:** Influence du mode de débourement et de culture sur le taux de développement des explants initiaux.

Aussi, l'installation *in vitro* des clones de châtaignier sélectionnés, selon nos procédés mentionnés plus haut, nous a permis d'obtenir, malgré nombre de difficultés relevant des conditions de l'environnement de culture, des têtes de clones intéressants (tabl. 1). Cependant, il apparaît au cours des essais d'établissement que certains génotypes expérimentés sont plus récalcitrants que d'autres pour ce qui est de leur faculté de s'adapter au milieu de culture artificiel. Il en résulte leur perte après quelques transferts *in vitro*. Alors que pour d'autres clones de châtaignier, l'établissement du matériel sélectionné en milieu axénique ne présente pas de difficulté particulière.

### **Multiplication *in vitro***

#### *Choix de l'explant initial*

En nous référant aux résultats des travaux de micropropagation des porte-greffe de pommier et de poirier (COLLET et LE, 1987), il apparaît que le choix du matériel végétal, servant de source d'explants, peut être déterminant pour assurer, au cours de multiples cycles de culture, un taux de prolifération intéressant et régulier. Des bourgeons provenant des parties proximale (bas) et distale (haut) des pousses débourees de trois rameaux (cv. Verdesa) sont suivis durant une dizaine de cycles de multiplication, afin d'évaluer leur capacité de développer de nouveaux bourgeons. La figure 6 montre que le développement de l'ensemble des bourgeons est plus fort dans la partie proximale que dans la partie distale. Dans le cas présent, une plus grande concentration de bourgeons caulinaires observée à la base (partie proximale) de la pousse initiale semble être à

l'origine de cette différence quant à leur capacité de prolifération. Toutefois, on note une perte importante de matériel végétal durant les premières subcultures, provoquée par le phénomène de nécrose du bourgeon apical. Concernant des bourgeons en milieu de prolifération, VIEITEZ *et al.* (1983) signalent la disparition de son matériel cloné déjà après quatre subcultures à cause de la nécrose des bourgeons. MULLINS (1987) mentionne également que plus de 30% de pousses développées au cours des repiquages successifs présentent le symptôme de nécrose apicale, ceci malgré des modifications apportées au niveau des éléments nutritifs.

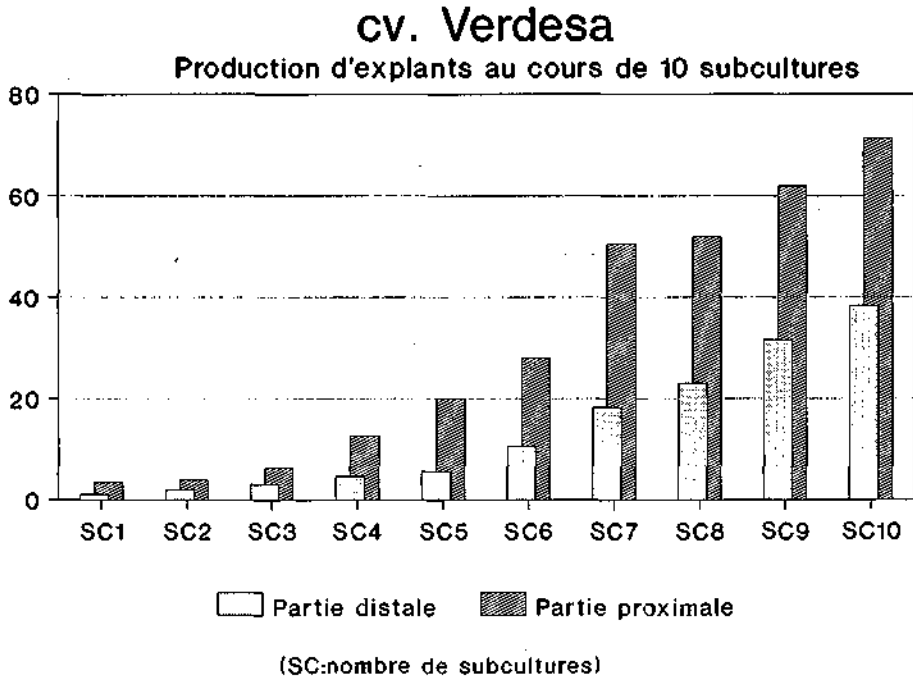


Fig. 6: Influence de la position de l'explant initial sur le taux de prolifération.

#### Choix du milieu nutritif

Divers milieux de base sont examinés afin de pouvoir réduire le phénomène de dégénérescence du bourgeon apical. L'examen des résultats obtenus avec le clone 6259 (fig. 7) montre que les milieux de base de HELLER (1953) et de GRESSHOFF et DOY (1972) (GD) ont permis d'obtenir un taux moyen de 4 bourgeons, dont 2 utilisables (NBU), par cycle de 4 semaines. Par contre, le milieu MURASHIGE et SKOOG (1962) avec  $\frac{1}{2}$   $\text{NO}_3^-$  ( $\text{MS } \frac{1}{2} \text{NO}_3^-$ ) ne produit qu'en moyenne 2 bourgeons (dont 1 NBU) pour la même durée de culture. Il en est de même pour le milieu de MCCOWN (1980) (WPM), qui est

## Cl. 6259

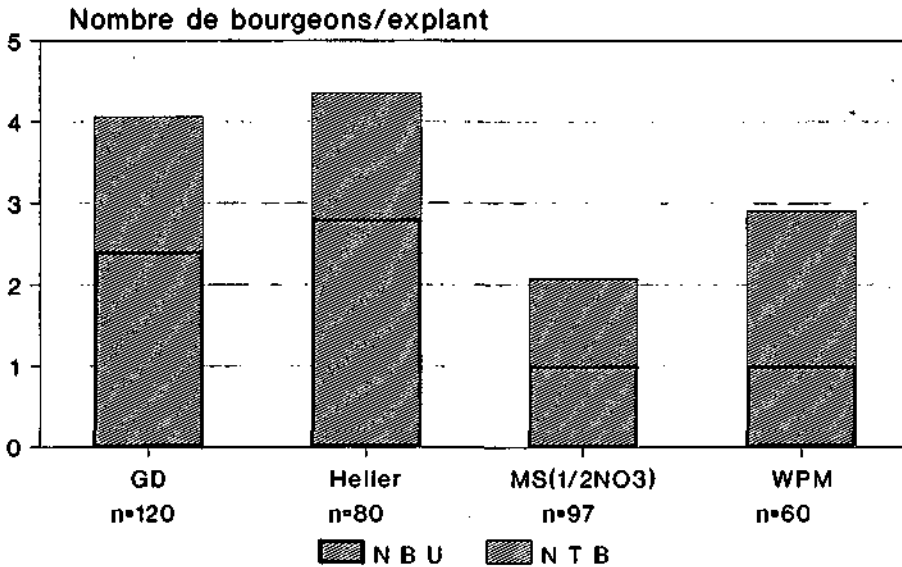


Fig. 7: Influence des milieux minéraux de base sur le taux de développement des explants initiaux. NTB: nombre total de bourgeons développés; NBU: nombre de bourgeons utilisables.

d'ailleurs reconnu comme le milieu favorable à la multiplication des espèces ligneuses. Concernant le comportement des nouveaux bourgeons développés sur ces milieux de culture respectifs, il apparaît que le milieu  $MS \frac{1}{2} NO_3^-$  favorise le phénomène de nécrose du bourgeon apical, responsable de la mort des explants au cours des subcultures. Les bourgeons cultivés sur le milieu de HELLER, malgré leur taux de prolifération plus grand, présentent des signes de vitrification et de chlorose prononcée. Cette observation confirme les résultats des travaux de VIEITEZ *et al.* (1983) et de MULLINS (1987). Pour le milieu GD, on note une croissance satisfaisante de bourgeons (fig. 8) sans symptôme de vitrification, mais accompagnée parfois d'un cal à la base des explants. Toutefois, le développement de nouveaux bourgeons ne semble pas être gêné par la présence de celui-ci. Aussi avons-nous retenu ce milieu minéral pour la suite des travaux de multiplication.

### Variabilité clonale

La capacité de prolifération des clones de châtaignier établis *in vitro* a été comparée sur milieu GD, considéré dans nos conditions d'expérimentation, comme le meilleur.

Les premiers résultats relatifs à la capacité de développement de nouveaux bourgeons sur nos clones de châtaignier sélectionnés (1071, K-5526, 6259 et Verdesa) sont illustrés par la figure 9. On constate, après six cycles de multiplication, une différence importante concernant le taux moyen de développement des explants obtenu sur les clones expérimentés. Selon le génotype cultivé, ce taux de développement peut varier du simple (clone K-5526) au double (clone 6259). VIEITEZ et VIEITEZ (1982/1983) ont



Fig. 8: Développement de nouveaux bourgeons sur le milieu GD (clone 6259).

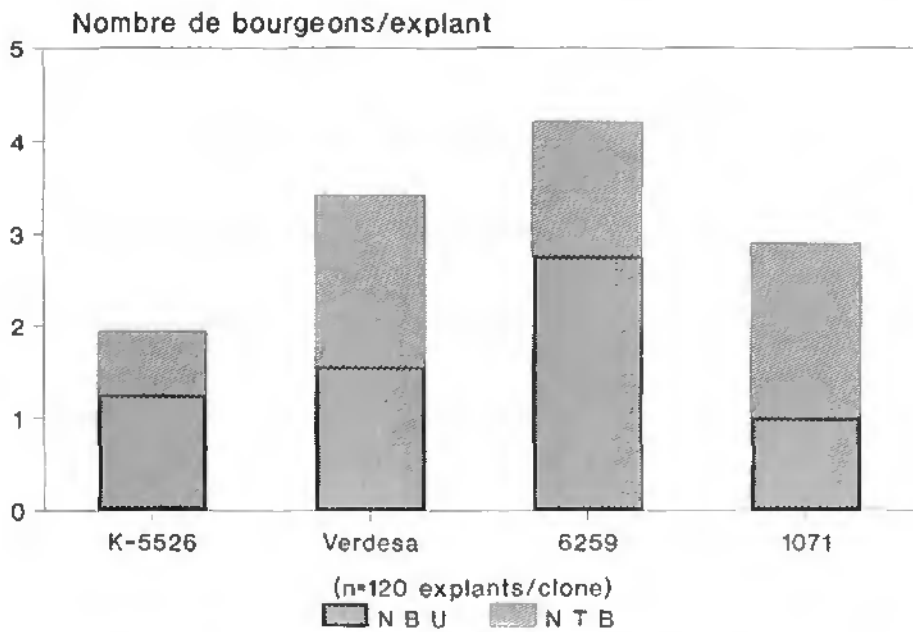


Fig. 9: Influence du génotype sur le taux de prolifération de nouveaux bourgeons.

aussi remarqué cette variabilité clonale indifféremment sur les deux types de matériel végétal jeune et adulte. Ces auteurs suggèrent par la suite que des différences variétales à la base des génotypes pourraient être à l'origine de différents comportements morphogénétiques manifestés *in vitro*.

### Conclusions

A la suite de nombreux essais concernant les phases d'établissement et de multiplication *in vitro* des clones de châtaignier suisses sélectionnés, on constate que :

- l'installation des explants initiaux constitués d'apex de bourgeons débouffés en serre à brouillard sec (fog system), en association avec des traitements anticryptogamiques (Benlate® 1%) et d'un antibiotique (Pénicilline G 100 mg/l), permet de réduire de manière importante les risques d'infection par des microorganismes;
- le maintien des explants fraîchement installés sur un milieu enrichi de 8-HQS contribue aussi à empêcher le développement des agents pathogènes à un seuil supportable;
- le débouffement en conditions de serre avec apport de lumière s'avère être favorable à la reprise de croissance des explants initiaux;
- les explants provenant de la partie proximale de la pousse feuillée sont, en général, plus productifs que ceux qui sont développés dans la partie distale;
- les sels minéraux de base de GRESSHOFF et DOY (1972) semblent convenir au développement de nouvelles pousses ne présentant pas de symptôme de vitrification ou de chlorose;
- le caractère génotypique du matériel végétal expérimenté dans ces essais peut également jouer un rôle important dans l'aptitude à former de nouveaux bourgeons et doit être pris en considération lors du processus de micropropagation.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions M<sup>me</sup> U. Heiniger, institut fédéral de recherches sur la forêt, la neige et le paysage de Birmensdorf, M. G. Mauri, servizio fitosanitario cantonale ticinese, Bellinzona, pour les informations concernant la sélection des clones de châtaignier en Suisse, M. M. G. Tettamanti, Vivaio forestale cantonale, à Lattecaldo, pour la fourniture du matériel sélectionné, et l'Action COST-87 BRIDGE pour l'appui financier nécessaire à la réalisation de ce travail.

## SUMMARY

**«*In vitro* propagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.).**

### **I. Establishment and *in vitro* propagation»**

A technique for *in vitro* propagating selected clones of chestnut in Switzerland is described. The importance of the mode of preparation and the choice of the explant on the rate of *in vitro* establishment were shown. The composition of culture media with respect to the genotypes can play a role in the development of a technique for rapid micropropagation.

## ZUSAMMENFASSUNG

**«*In vitro* Vermehrung des Kastanienbaums (*Castanea sativa* Mill.).**

### **I. Etablierung und *in vitro* Vermehrung»**

Eine Methode zur *in vitro* Vermehrung für Selektion Kastanien in der Schweiz wird beschrieben. Die Bedeutung der Vorbereitung und der Wahl der Explantate für die Etablierungserfolgsrate wird beschrieben. Die Zusammensetzung der Nährlösung im Vergleich zur Genotype spielt auch eine grosse Rolle in der Entwicklung einer Methode zur raschen Massenvermehrung.

## BIBLIOGRAPHIE

- BAZZIGHER G., G. MILLER, 1987. Selektion Endothia - Widerstandsfähige Kastanien in der Schweiz - eine Quelle wertvollen Erbgutes. Schweiz. Z. Fortstwes., 138 (9), 799-813.
- BAZZIGHER G., G. MILLER, 1991. Blight-Resistant chestnut selections of Switzerland: A valuable Germ plasm Resource. Plant Disease 75 (1), 5-9.
- COLLET G. F., C. L. LE, 1987. Micropropagation de porte-greffe de pommier et de poirier. I. Etablissement et multiplication *in vitro* de pyrus malus L. (M25, M26, M27, MM106, M9 type York) et de Cydonia oblonga Mill (A). Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic. 19 (4), 253-259.
- GRESSHOFF P. M., C. H. DOY, 1972. Development and Differentiation of Haploïd Lycopersicon esculentum (Tomato). Planta Berl. 107, 161-170.
- HELLER R., 1953. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. Ann. Sci. Nat. (Botanique) Biologie Végétale, 14, 1-223.
- HENNERTY M. J., M. E. UPTON, P. A. FURLONG, D. P. HARRIS, R. A. EATON, D. J. & JAMES, 1988. Microbial contamination of *in vitro* cultures of apple rootstock M 26. Acta Hort. 225, 129-137.
- LAIMER da CAMARA MACHADO M., A. da CAMARA MACHADO, V. HANZER, B. KALTHOFF, H. WEISS, D. MATTANOVICH, F. REGNER & H. KATINGER, 1991. A new, efficient method using 8-hydroxy-quinolinsulfate for the initiation and establishment of tissue cultures of apple from adult material. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 27, 155-160.
- LLOYD G., B. McCOWN, 1980. Commercial feasible Micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Proc. Int. Plant Propagator's Society 30, 421-427.
- MULLINS K. V., 1987. Micropropagation of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Acta Hort., 212, 525-530.
- MURASHIGE T., F. SKOOG, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15, 473-497.
- SMITH P. M., 1979. Minor Crops. In: Evolution of Crops Plants. Edit. Simmonds, Publ. Longman Inc., New York. ISBN 0-582-44496-9, p. 307.
- VIEITEZ A. M., M. L. VIEITEZ, 1980. Culture of chestnut shoots from buds *in vitro*. J. Hortic. Sci., 55 (1), 83-84.
- VIEITEZ A. M., M. L. VIEITEZ, (1982/1983). *Castanea sativa* plantlets proliferated from axillary buds cultivated *in vitro*. Scientia Hort., 18, 343-351.
- VIEITEZ, A. M., A. BALLESTER, M. L. VIEITEZ & E. VIEITEZ, 1983. *In vitro* plantlets regeneration of mature chestnut. J. Hort. Sci., 58 (4), 457-463.

## Tubérisation *in vitro* de la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L. var. Bintje)

C. L. LÊ, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

### Résumé

Des explants de nœuds (miniboutures) de pomme de terre (cv. Bintje) cultivés sur un milieu de base CMS (COLLET, 1985), en présence de 8% de saccharose et de différentes concentrations de benzyladénine (BA), ont été testés pour leur capacité de tubériser *in vitro*. L'influence du type de support de culture et de la photopériode sur la tubérisation a été également examinée.

### Introduction

L'utilisation de minitubercules produits *in vitro* se révèle actuellement être l'un des moyens pratiques et efficaces pour la propagation de matériel de base et la conservation des variétés de pomme de terre cultivées après assainissement (WANG et HU, 1982; CHANDRA *et al.*, 1988; LÊ et COLLET, 1985, 1988).

Les conditions de l'environnement de culture qui caractérisent l'aptitude à la tubérisation *in vitro* ont été ainsi examinées par plusieurs auteurs (PALMER et SMITH, 1969; LO *et al.*, 1972; HUSSEY et STACEY, 1984; TOVAR *et al.*, 1985), cela pour de nombreux génotypes (LENTINI et EARLE, 1991).

Dans un premier article (LÊ, 1990), nous avons montré que la tubérisation *in vitro* des miniboutures de pomme de

terre de la variété Agria a été rendue possible par un contrôle précis des exigences énergétiques et du type de régulateur de croissance entrant dans la composition des milieux de culture.

Dans le présent travail, nous présentons un autre essai où l'on examine divers paramètres portant sur l'influence du type de support de culture, la teneur en régulateurs de croissance ainsi que sur celle de la lumière sur la capacité de tubériser des miniboutures *in vitro*.

### Techniques expérimentales

#### Matériel végétal

Des miniplantes de la variété de pomme de terre Bintje cultivées *in vitro* selon la technique décrite auparavant (LÊ, 1991) sont utilisées dans cette étude.

#### Milieux de culture

Les explants (ou miniboutures) prélevés sur la miniplante *in vitro*, comportant chacun un bourgeon axillaire, sont cultivés sur un milieu de base CMS (COLLET, 1985). A ce milieu sont ajoutés 1,0 mg/l de thiamine, 0,5 mg/l de pyridoxine, 0,5 mg/l d'acide nicotinique, 100 mg/l de myo-inositol et diverses concentrations de benzyladénine

(BA) allant de 11,1  $\mu$ M à 44,4  $\mu$ M. Le saccharose est apporté à la concentration de 8%, qui, selon les résultats obtenus auparavant avec la variété Agria (LÊ, 1990), nous a donné une meilleure tubérisation.

Pour la comparaison des types de support de culture, les explants sont cultivés, à l'obscurité, sur les trois milieux suivants:

- milieu liquide statique;
- milieu liquide agité (60 tours/min.);
- milieu solidifié avec 0,7% d'Agar (Difco-Bacto-Agar).

Le pH est ajusté à 5,7 avec du NaOH à 0,1 N avant l'autoclavage.

Les milieux sont stérilisés à l'autoclave pendant 15 minutes à 121 °C (1,1 kg/cm<sup>2</sup> de pression).

#### Conditions de culture

Afin de déterminer si la lumière peut influencer la capacité de tubériser des miniboutures, une partie des cultures sont placées dans une chambre de croissance dont la photopériode est de 8 heures par cycle de 24 heures, le restant est maintenu à l'obscurité pour tous les essais.

L'éclairage, dont l'intensité lumineuse est de 55  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/sec au niveau des cultures, est fourni par des tubes fluorescents de 40 W (type Mazda/Aviva TFRS 65/AVI).

La température est de 20  $\pm$  1 °C le jour et 18  $\pm$  1 °C la nuit, cela pendant toute la période de l'essai.

L'évaluation du pourcentage de tubérisation, de la grosseur moyenne des minitubercules produits par explant, ainsi que de leur poids frais, est réalisée sur la base de 16 à 20 explants par traitement. L'expérience a été répétée quatre fois.

## Résultats et discussion

### Influence de la teneur en benzyladénine

Comme le montre le tableau 1, la présence de la benzyladénine (BA) dans le milieu nutritif s'est révélée déterminante pour induire la tubérisation sur les miniboutures de pomme de terre Bintje cultivées *in vitro*. L'absence totale de régulateur de croissance ne permet pas, dans le cas présent, le développement de minitubercules, alors que l'adjonction de benzyladénine au milieu de culture entraîne une augmentation significative du pourcentage de tubérisation sur l'ensemble des explants expérimentés (fig. 1). Le meilleur développement, dans nos conditions, a été obtenu avec le traitement renfermant 11,1  $\mu\text{M}$  (2,5 mg/l) de BA, qui provoque une augmentation du taux de tubérisation de 97% sur les explants cultivés dans les mêmes conditions (tabl. 1). Ce fait semble être en accord avec celui rapporté précédemment sur les miniboutures des variétés d'Ulster Sceptre et Red Craigs Royal (HUSSEY et STACEY, 1984) et sur celle



Fig. 1. Tubérisation *in vitro* de la variété de pomme de terre Bintje.

Tableau 1. Influence de la concentration de benzyladénine (BA) sur la tubérisation des miniboutures de pomme de terre (cv. Bintje).

Concentration de benzyladénine ( $\mu\text{M}$ )	Tubérisation (%)	Diamètre des minitubercules (mm)	Poids frais moyen des minitubercules (mg)
Témoin (0)	0	0	0
11,1	97a	3,40 $\pm$ 0,14a	31,12 $\pm$ 2,64a
22,2	80b	3,70 $\pm$ 0,15a	33,27 $\pm$ 3,05a
44,4	22c	3,56 $\pm$ 0,16a	24,05 $\pm$ 1,04b

Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p = 0,05$ ), selon le test de DUNCAN.

d'Agria (LÉ, 1990). En revanche, à une concentration plus importante en BA (22,2  $\mu\text{M}$ ) (5,0 mg/l), on constate un fléchissement de la capacité de produire des minitubercules *in vitro* (80%), contrairement aux observations faites par WANG et HU (1982) sur les variétés Nohrin n° 1 et Kennebec. La plus forte concentration, soit 44,4  $\mu\text{M}$  (10 mg/l), provoque également une diminution importante de la capacité de tubérisation sur les miniboutures de pomme de terre Bintje (22% d'explants capables de former des minitubercules). Concernant le poids frais et la grosseur des minitubercules développés sur ces milieux, nous n'avons pas remarqué de différence importante entre les deux concentrations 11,1 et 22,2  $\mu\text{M}$  de BA; alors qu'à 44,4  $\mu\text{M}$ , un effet défavorable sur le poids moyen des minitubercules est nettement remarqué (tabl. 1). La réduction progressive du taux de tubérisation obtenue avec l'augmentation graduelle des concentrations en BA, dans nos conditions d'expérimentation, semblerait donc refléter un effet inhibiteur dû à une surconcentration en régulateur de croissance. PALMER et SMITH (1969) ont également signalé l'extrême sensibilité de la tubérisation sur des explants de germe de pomme de terre (cv. Norgold Russet), en présence d'une forte concentration en BA.

### Influence du support de culture

L'examen des résultats présentés dans le tableau 2 montre que le milieu de culture solidifié avec de l'agar permet le développement des minitubercules, après 5 semaines de culture *in vitro*. En

Tableau 2. Influence du milieu de culture sur la tubérisation des miniboutures de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje).

Types de milieu nutritif	Tubérisation (%)
Agar	96
Liquide statique	0
Liquide agité	98

revanche, il n'y a pas de formation de minitubercules sur les explants cultivés en milieu liquide statique, malgré un apport optimal d'éléments nutritifs nécessaires dans le milieu de culture. Ce fait coïncide souvent avec l'absence de développement des axillaires sur les miniboutures en cours de culture. Cette observation suggère l'état d'anoxie du milieu liquide statique, qui provoque l'asphyxie de nos explants, alors que la croissance des axillaires capables de tubériser est favorisée lorsque les explants sont cultivés sur un milieu liquide agité, assurant effectivement une meilleure aération indispensable au développement des minitubercules. Des résultats similaires sont également obtenus par TOVAR *et al.* (1985).

En ce qui concerne le comportement des minitubercules développés au cours de la culture, on note une tendance à la formation des lenticelles proéminentes (cals?) pour les minitubercules évoluant à l'intérieur du milieu nutritif (fig. 2). Ce défaut au niveau des lenticelles, provoqué par une sursatura-



Fig. 2. Minitubercule de pomme de terre (cv. Bintje) montrant la formation des lenticelles proéminentes.

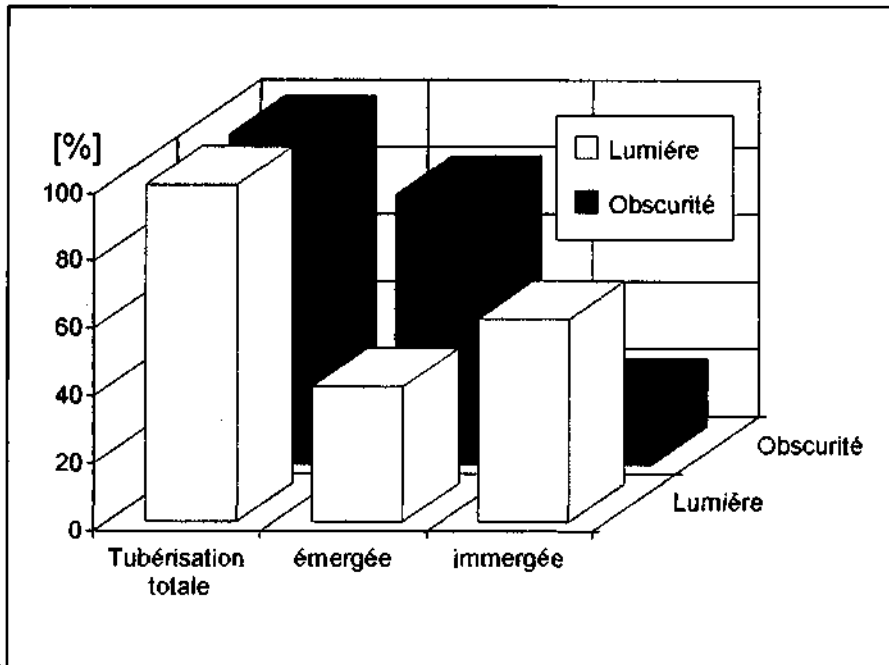


Fig. 3. Influence de la lumière sur la tubérisation *in vitro* des miniboutures de pomme de terre (cv. Bintje).

tion d'eau dans l'environnement de culture (SLIMMON *et al.*, 1989), présente, par conséquent, une perte non négligeable des microtubercules après la récolte.

### Influence de la photopériode

L'apport d'une période de lumière au cours de la culture n'améliore pas la capacité de tubériser chez les miniboutures de pomme de terre Bintje cultivées *in vitro*. En effet, aucune différence significative n'apparaît si l'on compare les taux de tubérisation obtenus entre les explants maintenus à l'obscurité et ceux qui sont cultivés avec un régime d'éclaircissement de 8 h/jour (fig. 3). Néanmoins, on note que la croissance des explants dure longtemps et que les minitubercules éclairés verdissent rapidement en comparaison avec ceux qui sont maintenus à l'obscurité totale. Par ailleurs, l'endroit où se développent les minitubercules est également influencé, dans nos conditions de culture, par la lumière. En

effet, on observe plus de 60% de tubercules formés dans le milieu nutritif (tubérisation immergée) lorsqu'on applique aux cultures une période d'éclaircissement; alors que la plupart des explants (80%) maintenus à l'obscurité totale tubérisent à l'extérieur du milieu de culture (tubérisation émergée) (fig. 3). SLIMMON *et al.* (1989) ont aussi rapporté des réactions comparables sur les quatre géotypes Red Pontiac, Shepody, Kennebec et Yukon Gold en présence d'une photopériode.

### Conclusion

Au terme des essais, nous constatons que la tubérisation *in vitro* des miniboutures de pomme de terre (cv. Bintje) est favorisée par un apport important en énergie (8% de saccharose) et une teneur suffisante en benzyladénine (BA). En revanche, aucune différence significative n'a été démontrée lorsque les explants sont maintenus sur un sup-

port de culture solidifié par de l'Agar ou en milieu liquide agité. Une photopériode de 8 heures ne permet pas d'augmenter le taux de tubérisation, mais accroît la tubérisation immergée défavorable.

### Remerciements

Nous remercions M. D. THOMAS pour son aide technique à la réalisation de cette étude.

### Bibliographie

- CHANDRA R., DODDS J. H. and TOVAR P., 1988. *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). Newsletter, International Association for Plant Tissue Culture 55, 10-20.
- COLLET G. F., 1985. Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.* 17 (4), 259-263.
- HUSSEY G. and STACEY N. J., 1984. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Bot.* 53, 565-578.
- LÉ C. L., 1990. Facteurs influençant la tubérisation *in vitro* des microboutures de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. var. Agria). *Revue suisse Agric.* 22 (2), 115-116.
- LÉ C. L., 1991. Aspects pratiques de la micropropagation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Revue suisse Agric.* 23 (6), 357-358.
- LÉ C. L. et COLLET G. F., 1985. Assainissement de la variété de pomme de terre Sangema. Méthode combinant la thermothérapie *in vitro* et la culture de méristèmes. Premiers résultats. *Revue suisse Agric.* 17 (4), 221-225.
- LÉ C. L. et COLLET G. F., 1988. Conservation *in vitro* de l'assortiment suisse des variétés de pomme de terre. *Revue suisse Agric.* 20 (5), 277-281.
- LENTINI Z. and EARLE E. D., 1991. *In vitro* tuberization of potato clones from different maturity groups. *Plant Cell Reports* 9, 691-695.
- LO F. M., IRVINE B. R. and BARKER W. G., 1972. *In vitro* tuberization of the common potato (*Solanum tuberosum*) is not a response to the osmotic concentration of the medium. *Canadian Journal of Botany* 50, 603-605.
- PALMER C. E. and SMITH O. E., 1969. Cytokinins and tuber initiation in the potato *Solanum tuberosum* L. *Nature* 221, 279-280.
- SLIMMON T., SOUZA MACHADO V. and COFFIN R., 1989. The effect of light on *in vitro* microtuberization of potato cultivars. *Am. Potato J.* 66, 843-848.
- TOVAR P., ESTRADA R., SCHILDE-RENTSCHLER L. and DODDS J. H., 1985. Induction and use of *in vitro* potato tubers. *CIP Circular* 13 (4), 1-5.
- WANG P. J. and HU C. Y., 1982. *In vitro* mass tuberization and virus-free seed-potato production in Taiwan. *Am. Potato J.* 59, 33-37.

### Summary

*In vitro* Tuberization of commonly grown potato (*Solanum tuberosum* L. var. Bintje)

Single-node explants (minicuttings) of potato cultivar Bintje cultured on CMS basal medium (COLLET, 1985), supplemented with 8% saccharose and various levels of benzyladenine (BA), were tested for their capacity of tuberization *in vitro*. The influence of the types of culture medium as well as the photoperiod on the tuberization were also considered.

### Zusammenfassung

*In vitro*-Knollenbildung von Kartoffel (*Solanum tuberosum* L. var. Bintje)

Achselknospen (Ministecklingen) der Kartoffelsorte Bintje wurden auf ein CMS basal-Nährmedium (COLLET, 1985), welches 8% Saccharose und verschiedenen Konzentrationen der BA enthält, kultiviert, um die *in vitro*-Knollenbildungskapazität zu bewirken. Die Wirkung von verschiedenen Kulturunterlagen und Photoperioden auf die Knollenbildungskapazität wurden auch untersucht.

Des articles fondamentaux, des fiches techniques et de variétés, tirés de nos publications, sont actuellement à votre disposition auprès du Service Information-Documentation de la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon, tél. 022/363 41 51 ou 363 41 54.

Une réduction de prix est consentie pour les commandes groupées d'un même titre: 10% dès 100 ex. Attention, certaines de ces publications sont en nombre limité. Pour les commandes inférieures à Fr. 10.-, en joignant le paiement en timbres-poste à votre demande, vous économiserez les frais d'expédition.

## NOUVEAU:

Nos		Fr.
	<b>Principaux cépages cultivés en Suisse</b> – Portfolio de 21 fiches indépendantes. Format A4 en couleurs	14.—
115	<b>Les systèmes de verger: 8 modes de conduite comparés sur fiches en couleur</b> (16 pages)* Ph. Monney, Ch. Blaser, A. Widmer et Ch. Krebs	4.—
114	<b>Les auxiliaires, plus que de simples croqueurs de ravageurs</b> (16 pages)* – S. Keller	4.—
113	<b>Les stades repères de la vigne</b> (4 pages) – M. Baillo et M. Baggioini	1.—
112	<b>Plantes cultivées: ressources génétiques en Suisse</b> (16 pages)* Monique Derron, G. Kleijer et R. Corbaz	4.—
111	<b>Le travail du sol: une synthèse</b> (16 pages)* – W. G. Sturmy	4.—
110	<b>Maladies fongiques du colza en Suisse: identification, manifestations, conditions de développement, comportement des variétés</b> (8 pages)* – W. Winter et D. Gindrat	2.—
109	<b>La race brune en Suisse</b> (12 pages)* – H. Herzog	3.—
104	<b>Les dépérissements des arbres fruitiers dus à des champignons du genre <i>Phytophthora</i> en Suisse romande et au Tessin.</b> 1. Nature et importance des dégâts; espèces identifiées (12 pages) – A. Boley	3.—
103	<b>Autoenrichissement des moûts et libération d'arômes dans les vins</b> (2 pages) – Ph. Cuénat, Rose-Marie Canal-Llaubères et C. Leyat	—.60
102	<b>La prairie temporaire ou artificielle</b> (8 pages) E. Mosimann, M. Amaudruz et J.-P. Charles	2.—
101	<b>Mélanges standard pour la production fourragère. Révision 1992-1995</b> (8 pages)* E. Mosimann, J.-P. Charles, J. Lehmann, E. Rosenberg et P. Bassetti	1.50
100	<b>Liste 1993-1994 des variétés de plantes fourragères</b> (8 pages)* – E. Mosimann, C. Chalet, J. Lehmann, U. Briner et P. Bassetti	1.50
91	<b>La politique agricole en mutation à la fin du XX<sup>e</sup> siècle</b> (8 pages)* – Prof. B. Lehmann	2.—
99	<b>La rave d'automne Zefa. Fiche culturale</b> (2 pages)*	—.60
98	<b>Le chou lrisé à pied court de Plainpalais. Fiche culturale</b> (2 pages)*	—.60
97	<b>Hyménia, un légume foliacé à fines côtes. Fiche culturale</b> (2 pages)*	—.60
96	<b>Choux-fleurs de différentes couleurs. Fiche culturale</b> (2 pages)*	—.60
95	<b>Quelle précision peut-on attendre des modèles de précision simples? Exemple des pucerons des céréales</b> (4 pages) – J. O. Derron	1.—
94	<b>Liste officielle des variétés de céréales 1992</b> (8 pages)	1.50
93	<b>Intérêt pratique de la traite mobile au pâturage</b> (8 pages)* – J. Troxler, F. Jans, J.-B. Wettstein, P. Monteleone et P. Gmür	2.—
92	<b>Jambe noire et pourriture bactérienne de la pomme de terre provoquée par <i>Erwinia carotovora</i></b> (8 pages)* W. Jäggi, H. R. Oberholzer et F. A. Winiger	2.—

89	<b>Fédération suisse d'élevage Holstein</b> (6 pages)* J. Chavaz	Fr. 2.—
90	<b>Cultures énergétiques et de diversification: rendement du topinambour, du sorgho sucré et d'une euphorbe oléagineuse</b> (8 pages) W. Reust	2.—
88	<b>Les nématodes à kystes ravageurs des cultures maraichères de Suisse romande</b> (11 pages) R. Vallotton	2.60
87	<b>Maladies de la tomate: mycoses du feuillage et des fruits – mycoses vasculaires et racinaires – bactérioses – viroses et maladies analogues</b> (8 pages)*	2.—
80	<b>Comparaison de clones et de sélections de pinot noir</b> (5 pages) – F. Murisier et J.-L. Simon	1.20

### Encore disponibles:

#### Les ravageurs de nos vergers et de nos vignobles

Cette série comprend huit planches en couleurs avec les commentaires au verso, réunies en cahier de 16 pages. Chaque série Fr. 4.—. Les 5 séries Arbo: Fr. 18.—

- **Arbo 1:** Carpocapse des pommes et des poires – Tordeuse de la pelure – Mouche de la cerise – Psylle commun du poirier – Acarien rouge, acarien jaune et typhlodromes – Tavelure des arbres à pépins – Moniliose – Oïdium du pommier et du pêcher.
- **Arbo 2:** Bostryche disparate et scolyte du pommier – Chermite brumeuse et hyponomeutes – Teigne des fleurs et anthronome du cerisier – Lépidoptères ravageurs du bois et des écorces – Cécydomyies du pommier et du poirier – Hémicampes des pommes et des prunes – Carpocapse des prunes.
- **Arbo 4\*:** Maladies du cerisier: maladie criblée, cylindrosporiose, pourriture amère des cerises – Maladies du cognassier: moniliose, entomosporiose, oïdium – Pourriture du collet due aux *Phytophthora* spp. – Maladies de conservation des pommes – Pou de San José et cochenilles similaires – Cochenille virgule et diverses autres cochenilles – Ver des jeunes fruits et petite tordeuse des fruits – Mineuses.
- **Arbo 5\*:** Cloque, balai de sorcière, pochettes, chancre bactérien du cerisier, chancres sur arbres fruitiers, ériophyides des fruits à pépins (pommier et poirier), ériophyides du prunier, taupa et campagnol terrestre, petits campagnols, rouille du prunier et maladie du plomb.
- **Arbo 6\*:** Tordeuses des bourgeons, autres tordeuses de la pelure, tordeuses des buissons, maladies à virus du pommier, du poirier, maladies à mycoplasmes du pommier et du poirier, maladies à virus du cerisier, du prunier.
- **Viti 1\*:** Vers de la grappe: Eudémis et cochytiis – Acarien rouge et acarien jaune commun, acariose, ériose, typhlodromes – Cicadelle verte et thrips de la vigne – Phylloxéra, cochenille, punaise verte – Cigarier de la vigne, oïdiorhynque de la vigne – Pourriture du raisin – Oïdium et mildiou de la vigne – Rougeot, excoriose.
- **Viti 2\*:** Dégénérescence infectieuse – Maladie de l'enroulement, maladie du bois strié, maladie de l'écorce liégeuse – Flavescence dorée – Carences en éléments majeurs – Carences en oligo-éléments – Dégâts causés par des herbicides (2 planches) – Dessèchement de la rafle, coulure, gel, accidents divers.
- **Viti 3\*:** Noctuelles de la vigne – Black-rot – Eutypiose – Esca et anthracnose – Pourridié, coïtre, mélanose infectieuse – Principales adventices des vignobles résistantes aux triazines (I et II) – Le thrips de la vigne.

\* Aussi disponible en allemand. Deutsche Fassung nach Wunsch.

Il est important que votre nom et votre adresse soient écrits en caractères bien lisibles sur votre commande!

## Multiplication clonale du lisianthus (*Eustoma grandiflorum* [Griseb.] Schinners)

C. L. LÉ, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

### Résumé

On décrit dans cet article une technique de propagation du lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) en conditions de culture stériles. Des extrémités de tige d'*Eustoma* en croissance active ont été placées sur un milieu agarisé renfermant les sels minéraux de base de MURASHIGE et SKOOG (1962), additionné de 4,44  $\mu\text{M}$  de benzyladénine (BA) et de 0,5  $\mu\text{M}$  d'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA) pour favoriser le développement de nouveaux bourgeons. La formation des racines a été réalisée en traitant les microboutures avec 2,5  $\mu\text{M}$  d'acide  $\alpha$ -naphthylacétique. Des plantes enracinées ont ainsi été acclimatées avec succès sur un substrat de culture traditionnel.

### Introduction

*Eustoma grandiflorum* (Gentianacées), cultivée sous le nom de *Lisianthus russellianus* (NICHOLSON, 1938), est une espèce annuelle herbacée originaire des États-Unis d'Amérique. Elle s'installe principalement dans les prairies humides s'étendant du Nebraska au Colorado, ainsi qu'au Texas (HALEVY et KOFRANEK, 1984). Actuellement, elle présente un grand intérêt en floriculture, notamment en tant que fleurs coupées et plantes fleuries en pots pour les marchés régionaux (HALEVY et KOFRANEK, 1984; REIST, 1992). Les arguments avancés en faveur de la culture de cette nouvelle espèce florale sont multiples:

- haut rendement;
- coloris plaisants;
- cultivable hors sol (REIST, 1992).

Toutefois, la multiplication par voie

conventionnelle des hybrides nouvellement sélectionnés se heurte à la difficulté d'une longue période de préparation de plantons de base qui, dans le contexte actuel, ne peut guère satisfaire les demandes grandissantes du marché floral. Par conséquent, la micropropagation *in vitro* représente, pour l'heure, une alternative avantageuse permettant d'obtenir rapidement du matériel de base conforme, nécessaire à la production de cette nouvelle espèce florale (SEMENIUK et GRIESBACH, 1987).

L'objectif de ce travail est de déterminer, chez *Eustoma*, les conditions de culture favorisant la croissance et le développement *in vitro* de jeunes plants afin de mettre au point un protocole de production pour cette espèce.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration entre le service de biologie végétale (groupe culture *in vitro*) de Changins et le service d'horticulture générale à Conthey.

### Matériel et méthodes

#### Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans nos essais consiste en plantes-mères (cv. Sakata Yodel blue) cultivées en serre au centre d'arboriculture et d'horticulture des Fougères (Conthey).

#### Préparation des explants

Des extrémités de jeunes pousses, appelées explants, de 1 à 2 cm de longueur, ont été prélevées et leur extrémité coupée a été obturée à la paraffine.

#### Désinfection

La désinfection du matériel végétal ainsi préparé s'effectue après un bref passage dans une solution de Teepol utilisé comme mouillant, par un trempage dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0,8%, pendant 15 minutes. Puis, après un rinçage à l'eau stérile, il est transféré dans une solution de Kohrsolin® (Glutaraldéhyde, N,N'-bis-(hydroxyméthyle) Urée (Bode & Co., Hambourg) à 3%, pendant 20 minutes. Ensuite, il est lavé 3 à 4 fois à l'eau stérile, avant de sécher sur une feuille de papier filtre stérile.

#### Etablissement *in vitro*

Les explants sont rafraîchis, après désinfection, à environ 1 cm de longueur et placés sur un milieu de base MS (MURASHIGE et SKOOG, 1962) mo-

difié. A ce milieu sont ajoutés 1,0 mg/l de thiamine, 0,5 mg/l de pyridoxine, 0,5 mg/l d'acide nicotinique, 100 mg/l de myo-inositol, 0,1 mg/l d'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA), 1,0 mg/l de benzyladénine (BA), et 3% de saccharose.

Afin d'éviter l'altération du milieu nutritif provoquée par l'oxydation des métabolites secondaires libérés lors de la préparation des explants initiaux, les cultures sont maintenues à l'obscurité totale pendant les trois premiers jours suivant l'établissement.

### Prolifération *in vitro*

Dans le but d'induire la prolifération de nouvelles pousses, les explants sont transférés, après un mois en établissement *in vitro*, sur un milieu de base MS modifié renfermant différentes combinaisons de régulateurs de croissance (tabl. 1 et 2).

### Enracinement *in vitro*

Pour l'induction de l'enracinement, les jeunes pousses sont séparées des touffettes et placées individuellement sur un milieu minéral de base MS, dont la concentration en macroéléments est réduite de moitié, contenant diverses concentrations d'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA) (fig. 2).

### Conditions de culture

Sauf indications spéciales, les explants sont cultivés dans des tubes de verre DURAN® (25 x 150 mm), contenant chacun 15 ml de milieu approprié aux différentes phases de développement. Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,7 avec du NaOH 0,1 N et les milieux sont solidifiés avec 0,7% d'agar (Difco Bacto-Agar) avant l'autoclavage (121 °C, 1,1 kg/cm<sup>2</sup> de pression) pendant 15 minutes.

Les cultures sont maintenues dans un environnement climatique à la température de 23 ± 1 °C de jour et de 18 ± 1 °C de nuit, et sont éclairées pendant 16 heures par cycle de 24 heures. L'éclairage dont l'intensité est de 55  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  au niveau des tubes de culture est fourni par des tubes fluorescents (Mazda AVIVA TFRS 65/AVI). L'humidité relative a été maintenue à 55-60% dans l'environnement de culture.

L'évaluation de diverses combinaisons de régulateurs de croissance est réalisée sur la base de 20 explants par traitement. L'expérience a été répétée au moins trois fois.

**Tableau 1. Influence de diverses cytokinines sur la prolifération des nouveaux bourgeons chez *Eustoma grandiflorum*.**

Régulateurs de croissance [ $\mu\text{M}$ ]	Nombre de pousses/explant <sup>1</sup>	Formation de cal <sup>2</sup>
Témoin [0]	0,50 ± 0,03d	-
Kinéline [4,65]	1,58 ± 0,46c	++
ANA [0,53]		
BA [4,44]	3,02 ± 0,42a	++
ANA [0,53]		
Zéatine [2,85]	2,62 ± 0,43ab	+++
ANA [0,53]		
2iP [4,92]	2,35 ± 0,40ab	+++
ANA [0,53]		

<sup>1</sup> Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p = 0,05$ ).

<sup>2</sup> Le nombre de signes + indique l'intensité relative de la formation du cal (-: aucun; +: faible; ++: moyen; +++: fort).

### Sevrage

Après une période d'acclimatation de 48 à 72 heures, durée pendant laquelle les jeunes plantes d'*Eustoma* sont ramenées progressivement d'une atmosphère saturée d'humidité à un environnement normal de culture, les plantes racinées *in vitro* sont retirées des tubes et repiquées sur un substrat horticole traditionnel composé de terre franche, de Perlite et de terreau ASB® (1 : 1 : 1) pour poursuivre leur croissance et développement ultérieurement.

## Résultats et discussion

### Désinfection

Les infections bactériennes et fongiques apparues sur des explants fraîchement installés représentent une des difficultés majeures lors de l'établissement *in vitro*, aussi l'obtention de matériel sain semble-t-elle être vitale pour la réussite de la culture en axénie (YEOMAN et MACLEOD, 1977). Avec le procédé de désinfection mentionné

plus haut, seulement 5% des explants sont contaminés par des micro-organismes. Dans le cas présent, l'infection observée sur la plupart des explants initiaux est provoquée par des bactéries.

### Etablissement *in vitro*

L'initiation de la croissance des explants initiaux dépend principalement, dans nos conditions d'expérimentation, de l'équilibre phytohormonal entrant dans la composition du milieu nutritif. Aussi, l'installation *in vitro* du matériel végétal selon le procédé mentionné plus haut (cf. Matériel et méthodes) nous a permis d'obtenir sans trop de difficulté plus de 95% d'explants initiaux ayant repris leur croissance sur l'ensemble des cultures.

### Multiplication *in vitro*

#### • Influence des cytokinines

Lorsque les pousses atteignent une taille de 1 cm environ, elles sont transférées sur différents milieux dont la nature des cytokinines est modifiée. Comme le montre le tableau 1, on dé-

**Tableau 2. Influence de différents types d'auxine sur le développement des nouveaux bourgeons chez *Eustoma grandiflorum*.**

Régulateurs de croissance [ $\mu\text{M}$ ]	Nombre de pousses/explant <sup>1</sup>	Formation de cal <sup>2</sup>
Témoin [0]	1,37 ± 0,12c	-
BA [4,44]	1,70 ± 0,26bc	++
AIA [0,57]	4,25 ± 0,56a	++
BA [4,44]		
AIB [0,50]	2,12 ± 0,37b	++
BA [4,44]		
ANA [0,53]	4,73 ± 0,88a	++
BA [4,44]		
2,4-D [0,45]	0,15 ± 0,05d	+++
BA [4,44]		
ANA [0,53]	0,36 ± 0,07d	+++

<sup>1</sup> Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes ( $p = 0,05$ ).

<sup>2</sup> Le nombre de signes + indique l'intensité relative de la formation du cal (-: aucun; +: faible; ++: moyen; +++: fort).



Fig. 1. Développement de nouveaux bourgeons sur milieu de prolifération renfermant  $4,44 \mu\text{M}$  de BA et de  $0,53 \mu\text{M}$  d'ANA.

nombre, après 4 à 5 semaines de culture, une moyenne de trois nouveaux bourgeons utilisables développés sur le milieu contenant la benzyladénine (BA). Alors que pour les milieux de culture enrichis de zéatine ou de 2iP, le développement de nouvelles pousses est légèrement moins favorisé. La croissance des bourgeons néoformés est par ailleurs fortement inhibée lorsqu'on remplace la BA par la kinétine. Sur ce milieu, les bourgeons tendent à s'allonger avec des déformations au niveau de la tige. De même, le maintien du matériel végétal sur le milieu dépourvu de régulateurs de croissance (témoin) entraîne une diminution signi-

ficative du taux de développement de nouveaux bourgeons. La formation d'un cal à la base des explants est également observée avec toutes les cytokinines utilisées, mais la prolifération des primordia caulinaires, dans le cas présent, semble ne pas être gênée par celui-ci. Cette observation confirme les résultats obtenus par SEMENIUK et GRIESBACH (1987) sur la variété Dwarf Purple. Ces auteurs ont effectivement fait état de la formation de nouveaux bourgeons à partir du cal développé à la base de l'explant.

#### ◆ Influence des auxines

Le développement de nouvelles pousses requiert la présence dans le milieu nutritif d'un régulateur de croissance, en l'occurrence la BA (tabl. 2). Cependant, certaines combinaisons obtenues entre deux types de régulateurs (auxine et cytokinine) peuvent encore améliorer le développement de ceux-ci (LÈ, 1992). Aussi, l'adjonction de l'acide  $\alpha$ -naphthylacétique (ANA) au milieu de base contenant de la BA a favorisé, dans nos conditions d'expérimentation, l'apparition de nouveaux bourgeons avec un taux moyen supérieur à quatre nouvelles pousses utilisables par explant (fig. 1). Cette observation s'avère être en désaccord avec celle rapportée par SEMENIUK et GRIESBACH (1987) qui n'ont pas trouvé de différence significative entre les explants cultivés en présence d'une combinaison auxine-cytokinine et ceux maintenus sur un milieu sans auxine. Ce fait pourrait être dû à la forte teneur en cytokinine ( $13 \mu\text{M}$  BA) utilisée par ces auteurs, qui a sans doute modifié l'effet exercé par l'équilibre des régulateurs en place.

Dans nos conditions, le nombre de nouveaux bourgeons formés n'a pu être amélioré lorsqu'on a remplacé l'ANA par d'autres types de régulateurs, notamment l'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA) ou de l'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB). Par ailleurs, l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est inefficace pour induire le développement des bourgeons sur les explants d'*Eustoma*. Sur ce dernier milieu, on note d'abord l'arrêt de croissance des explants caractérisé par un jaunissement du feuillage, puis une prolifération intense de cal inhibant finalement tout l'explant. De même, la présence de l'auxine seule (ANA) dans le milieu de culture ne permet pas d'obtenir de nouveaux primordia caulinaires évoluant ultérieurement en de jeunes pousses feuillées.

#### Enracinement *in vitro*

Les résultats présentés dans la figure 2 montrent qu'en l'absence de régulateur de croissance ( $0 \mu\text{M}$ ), le taux de développement des racines sur les miniboutures d'*Eustoma* demeure faible (ca. 20%). L'adjonction dans le milieu nutritif d'une concentration de  $0,05 \mu\text{M}$  d'ANA suffit pour induire la formation des racines chez 44% des miniboutures. L'utilisation des concentrations élevées en auxine entraîne, dans nos conditions de culture, une augmentation progressive du nombre de miniboutures ayant développé un système racinaire fonctionnel (fig. 3). Le taux de formation des racines adventives atteint son maximum (85%) à la concen-

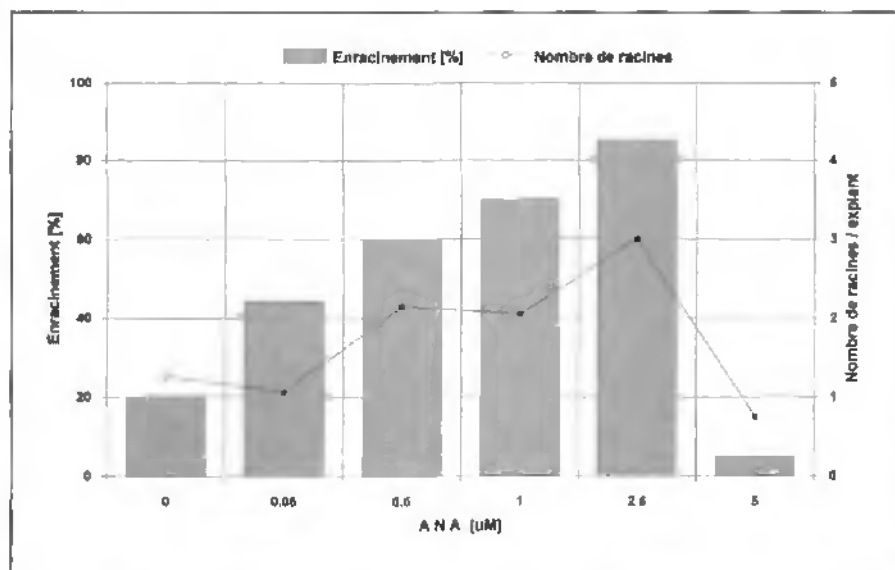


Fig. 2. Influence de différents types d'auxine sur le développement des nouveaux bourgeons chez *Eustoma grandiflorum*.



Fig. 3. Formation de racines adventives sur milieu contenant  $0,25 \mu\text{M}$  d'ANA.



Fig. 4. Formation de racines secondaires sur milieu enrichi de 2,5  $\mu\text{M}$  d'ANA.

tration de 2,5  $\mu\text{M}$  d'ANA. A une concentration plus élevée (5,0  $\mu\text{M}$ ), un effet inhibiteur est nettement marqué dans nos conditions, contrairement à ce qui a été obtenu auparavant par SEMENIUK et GRIESBACH (1987). Ces résultats vont également dans le même sens que pour le nombre de racines produites par explant (fig. 2). Concernant la qualité de l'enracinement obtenue durant cette phase, on remarque que les miniboutures développent des racines épaisses et courtes, pourvues de racines secondaires (fig. 4) et parfois de cals, lorsque l'ANA est apporté à des concentrations élevées (2,5  $\mu\text{M}$  et plus). En revanche, les traitements ne contenant pas ou peu d'ANA développent des racines souvent irrégulières, qui demeurent fines et allongées au terme de la phase d'enracinement, rendant par conséquent délicate l'opération de sevrage ultérieurement. Des essais effectués avec d'autres types de régulateurs de croissance en vue d'améliorer la qualité de l'enracinement des miniplantes produites *in vitro*, sont en cours de réalisation et feront l'objet d'un prochain article.

### Sevrage

A la fin du cycle des cultures *in vitro*, les miniplantes d'*Eustoma* sont sevrées sous un brouillard sec (*Fog system*) pendant une semaine. Ensuite, elles sont transférées en serre pour pour-



Fig. 5. Plantes d'*Eustoma* sevrées sur substrat de culture traditionnel, après 8 semaines de culture en serre.

suivre ultérieurement leur cycle de développement. L'acclimatation des plantes produites *in vitro*, selon notre procédé décrit plus haut (cf. Matériel et méthodes), n'a pas présenté de difficultés particulières et nous a permis d'obtenir plus de 95% de plantes ayant repris leur croissance une fois transférées dans le milieu de culture conventionnel (fig. 5).

### Conclusion

Au terme de nombreux essais, il a été démontré que les extrémités de tiges d'*Eustoma* sont capables de développer de nouveaux bourgeons évoluant en plantes entières, cela sous l'action d'un équilibre de régulateurs de croissance précis.

Le protocole expérimental mis au point dans cette étude peut donc constituer, en l'absence d'une technique de multiplication fiable et reproductible, une

### Summary

#### Clonal multiplication of *lisianthus* through tissue culture

A technique for *in vitro* propagation of *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) is described in this study. Actively growing shoot explants of *Eustoma* were cultivated on a MURASHIGE and SKOOG (1962) medium, supplemented with 4,44  $\mu\text{M}$  Benzyladenine and 0,5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -naphthylacetic acid (NAA) for proliferating new shoot buds. Adventitious root formation was achieved by exposure of minicuttings to 2,5  $\mu\text{M}$  of  $\alpha$ -naphthylacetic acid (NAA). Regenerated plantlets were successfully established in soil.

alternative avantageuse permettant l'obtention rapide de matériel de base indispensable à la diffusion de cette nouvelle espèce florale.

### Remerciements

Nous remercions M. D. PIVOT, Service d'horticulture générale à Contthey, pour sa collaboration à la culture *in vitro*, M. A. REIST pour la fourniture du matériel végétal, ainsi que M. F. TSCHUY pour ses travaux de sevrage à Changins.

### Bibliographie

- HALEVY A. H. and KOFRANEK A. M., 1984. Evaluation of *Lisianthus* as a new flower crop. *HortScience* **19** (6), 845-847.
- LE C. L., 1992. Micropropagation of *Nematanthus*. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 20 - High-Tech and Micropropagation IV (ed. by Y. P. S. Bajaj) - Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 213-222.
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* **15**, 473-479.
- NICHOLSON G., 1938. Dictionnaire pratique d'horticulture et de jardinage. Tome I, Edit. Dein et Co, Paris, 169-170.
- REIST A., 1992. Programmes de plantation, méthodes de culture et qualité des fleurs coupées de *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum* [Raf.] Shinn.). *Revue suisse Vitic., Arboric., Hort.* **24** (4), 241-243.
- SEMENIUK S. and GRIESBACH R. J., 1987. *In vitro* propagation of prairie gentian. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* **8**, 249-253.
- YROMAN M. M. and MACLEOD A. J., 1977. Tissue culture (callus) techniques. In: *Plant Tissue and Cell Culture - Botanical Monographs* **11**, sec. edit., edited by H. E. Street, Univ. of Calif. Press, 31-35.

### Zusammenfassung

#### Klonal Vermehrung von *Lisianthus* Gewebekultur

In diesem Artikel wurde eine *in vitro* Gewebekulturtechnik für *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) beschrieben. Triebspitzen von *Eustoma* wurden auf einem Agarährmedium kultiviert, die die grundsätzlichen Mineralsalze von MURASHIGE und SKOOG (1962) enthält, ergänzt durch 4,44  $\mu\text{M}$  Benzyladenin (BA) und 0,5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -naphthyllessigsäure (NES), um die Bildung von neuen Knospen zu bewirken. Die Bildung von Adventivwurzeln wurde erzielt, durch Behandlung der Sprossen mit 2,5  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -naphthyllessigsäure (NES). Bewurzelte Pflanzen konnten mit Erfolg in gärtnerische Substrate verpflanzt werden.

## Apport de l'électrophorèse dans l'identification des variétés de pomme de terre cultivées en Suisse

C. L. LÉ<sup>1</sup>, Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon

### Résumé

L'analyse électrophorétique des variétés de pomme de terre de l'assortiment suisse, cultivées *in vitro*, par isoélectrofocalisation (IEF) des systèmes peroxydases et estérases, permet d'obtenir des profils électrophorétiques caractéristiques, qui sont utiles à l'identification variétale.

### Introduction

L'analyse électrophorétique\* des systèmes isoenzymatiques\* se révèle actuellement être l'un des moyens importants pour caractériser les populations végétales (TANKSLEY et ORTON, 1983). Dans la pratique, l'utilisation des caractères morphologiques et agronomiques, qui sont souvent influencés par les conditions environnementales provoquant des variations phénotypiques (PONTIKIS *et al.*, 1980), ne donne pas satisfaction (BAILEY, 1983). Par conséquent, il est important de disposer de marqueurs fiables qui permettent d'identifier sans ambiguïté les variétés de plantes cultivées. Les isozymes\* sont à cet égard des marqueurs biochimiques de choix (MOORE et COLLINS, 1983) contribuant à l'évaluation de la diversité génétique du monde végétal, à la cartographie génétique des populations, à l'identification des génotypes, à l'entretien des ressources génétiques

<sup>1</sup> Avec la collaboration technique de M. D. Thomas.

\* Les mots suivis d'un astérisque sont définis dans le lexique encadré.

et à l'amélioration des plantes (SIMPSON et WITHERS, 1986; PEREZ de la VEGA, 1983).

Appliquées dans le domaine du marquage génétique, les isozymes ont connu un essor considérable, notamment dans l'identification des variétés de plantes cultivées (ALMGARD et CLAPHAM, 1975; PONTIKIS *et al.*, 1980; LEE et ELLSTRAND, 1987; COLLET *et al.*, 1991; MANGANARIS et ALSTON, 1993; PROTOPAPADAKIS et YANNITSAROS, 1994). Dans ce travail, nous rapportons les résultats d'analyses électrophorétiques des systèmes isoenzymatiques peroxy-

dases\* et estérases\* obtenus sur les variétés de pomme de terre cultivées en Suisse, dans le but d'établir l'identité de celles-ci.

### Matériel et techniques

#### Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre étude comporte principalement des variétés de pommes de terre de l'assortiment suisse (REUST, 1993) cultivées *in vitro* selon LÉ (1991). Ce matériel est assuré indemne de viroses, d'après les

### Lexique

**Alliquotes:** fractions égales d'une solution ou d'un extrait de plante.

**Electrophorèse:** méthode d'analyse basée sur le déplacement différentiel de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique, dont une application est l'isoélectrofocalisation.

**Estérases:** enzymes catalysant des réactions d'hydrolyse.

**Exons:** séquences ou régions actives dans l'expression d'un gène.

**Isoélectrofocalisation:** méthode de migration des protéines en fonction de leurs points isoélectriques. Au point isoélectrique, les molécules de protéines placées dans un champ électrique sont neutres; elles focalisent à l'endroit où le pH est égal à leur propre pHi.

**Isoenzymes (isozymes):** différentes formes moléculaires d'une même enzyme possédant des fonctions identiques.

**Peroxydases:** enzymes dont la fonction primaire est l'oxydation des molécules aux dépens du peroxyde d'hydrogène.

**pHi:** il existe, pour chaque protéine, un pH défini auquel la somme des charges positives et négatives est égale à zéro. Ce pH est appelé le point isoélectrique (pI).

**Zymogramme:** profil constitué d'un ensemble de bandes (ou isoenzymes) obtenues après chaque révélation enzymatique.

tests immuno-enzymatiques ELISA, cela afin d'éviter les interférences qui peuvent être occasionnées par les infections virales (LOESCHKE et STEGEMANN, 1966).

### Extraction et dosage des protéines

200 mg de poids frais de feuilles sont congelés dans de l'azote liquide et broyés dans un mortier préalablement refroidi à 0 °C. On y ajoute 150 µl/100 mg de poids frais de tampon d'extraction contenant 2% d'acide ascorbique et 0,1% de Triton X 100, et on homogénéise le broyat. L'extrait est ensuite récupéré et centrifugé à 13 000 t/minute pendant 20 minutes à 4 °C. On prélève enfin le surnageant qui sera utilisé d'une part pour la séparation électrophorétique et d'autre part pour le dosage des protéines solubles pratiqué selon la méthode de BRADFORD (1976), utilisant le sérum d'albumine de boeuf (BSA) comme référence. Les extraits fractionnés en parties aliquotes sont ainsi conservés à -70 °C jusqu'à leur utilisation.

### Isoélectrofocalisation (IEF)

La séparation des protéines non dénaturées en fonction de leurs points isoélectriques\* est réalisée sur les sup-

ports de gel en polyacrylamide ultra-fins Servalyt® précotés (pHi 3 à 11). Des échantillons contenant une quantité de 10 à 15 µg de protéines sont déposés sur le gel, placé dans une cuve thermostatée à 10 °C (type Multiphor II-EKB), et sont soumis à une séparation dans le sens horizontal, sous une tension de 200 V au départ fournie par un générateur de courant (BioRad 3000 Xi). La migration des protéines vers les pôles acide et basique dure 3 heures. La tension atteint alors 1400 V, correspondant à une puissance de 7 W.

### Révélation des systèmes isoenzymatiques

Les réactions de coloration des systèmes enzymatiques peroxydases (POX, E.C.1.11.1.7) et estérases (EST, E.C.3.1.1.2) sont effectuées selon les techniques de VALLEJOS (1983).

### Interprétation des profils électrophorétiques

La comparaison des profils électrophorétiques obtenus avec les deux systèmes enzymatiques peroxydases et estérases est réalisée sur la base de la présence ou de l'absence de bandet(s) caractéristique(s), en relation avec leur intensité de coloration, ainsi que sur les enregistrements densitométriques ef-

fectués à l'aide d'un vidéodensitomètre BioRad-620, généré par le programme d'analyse I-D Analyst II.

## Résultats et discussion

### Peroxydases

L'analyse des profils électrophorétiques des isoperoxydases montre la présence de 2 groupes d'isoenzymes POX 1 et POX 2, caractéristiques des variétés de pomme de terre cultivées en Suisse (fig. 1). De ces groupes, nous avons retenu en premier lieu les isoperoxydases à pHi acides (POX 1) qui sont, en général, représentatifs pour la distinction de nos cultivars. Cependant, nous tenons également compte des isoperoxydases du groupe POX 2 lorsque les profils électrophorétiques du groupe POX 1 ne permettent pas de les distinguer correctement.

Ainsi apparaissent, dans le groupe POX 1 (pHi 3-4), des isoenzymes dont l'intensité, exprimée en fonction de leur activité peroxydasique, varie considérablement d'un cultivar à l'autre. On note la présence de 3 à 5 bandes bien distinctes mettant en évidence, selon leur emplacement et leur intensité de coloration, des profils qui sont spécifiques pour chacun de nos cultivars (fig. 1). Sur la base des varia-

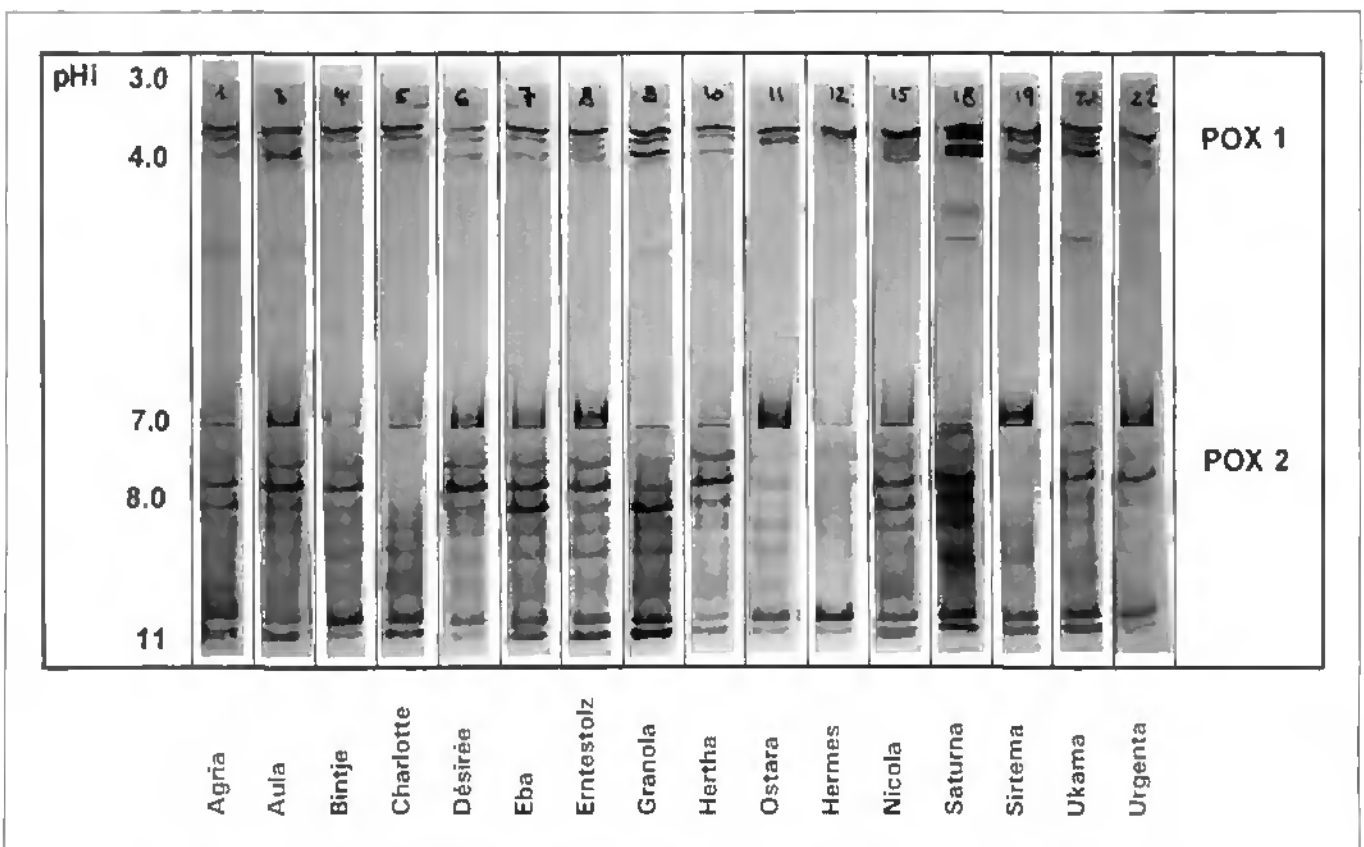


Fig. 1. Profils électrophorétiques des isoperoxydases obtenus sur différentes variétés de pomme de terre cultivées en Suisse.

tions densitométriques obtenues dans ce groupe d'isoperoxydases, nous avons pu comparer et établir, dans le cas présent, l'identité de la plupart de nos variétés cultivées, à l'exception des variétés Bintje, Eba, Hertha et Urgenta; lesquelles possèdent une certaine ressemblance quant au nombre de bandes isoenzymes apparues et leur intensité correspondante. Néanmoins, avec les isoperoxydases basiques POX 2 (pHi 7-11) la variété Eba a pu être distinguée de ces dernières si l'on considère la forte intensité de l'isoenzyme révélée à pHi 8 chez ce cultivar (fig. 1).

L'identification variétale basée sur le polymorphisme des peroxydases a été également réalisée notamment pour le blé (ASINS *et al.*, 1981), le pois (BASSIRI et ADAMS, 1978) et le pommier (COLLET *et al.*, 1991; MANGANARIS et ALSTON, 1993). Etant donné leur stabilité durant l'extraction et la conservation (KUHNS et FRETZ, 1978), les peroxydases demeurent un excellent système enzymatique, polymorphe. En ce qui concerne la pomme de terre, DESBOROUGH et PELOQUIN (1968) ont trouvé pour l'ensemble des 45 variétés nord-américaines, 11 profils électrophorétiques différents basés sur 8 isoperoxydases révélées sur des extraits de tubercule. Dans notre essai, nous avons pu distinguer 13 profils caractéristiques pour les 16 variétés examinées avec moins de bandes isoenzymes. Cette différence pourrait être expliquée, dans le cas présent, par la révélation des isoperoxydases provenant de tissu foliaire cultivé *in vitro* d'une part, et par la séparation des isoenzymes en fonction de leurs points isoélectriques (pHi) d'autre part. En matière de pHi à gradients, NIETO *et al.* (1990) ont aussi fait mention de l'utilisation des isoperoxydases, après une isoélectrofocalisation (pHi 3,5 à 9,5), comme base pour éclaircir les doutes

qui subsistent sur des zymogrammes\* obtenus avec l'électrophorèse à pHi constants. Ces auteurs ont effectivement trouvé que les groupes d'isoperoxydases à pHi 6,5-7,0 sont les plus caractéristiques dans les extraits de tubercules; alors que nous avons obtenu, dans les extraits de feuilles, des bandes isoperoxydases spécifiques essentiellement dans la partie acide (pHi 3-4). Par ailleurs, la migration des protéines sur un support de gel polyacrylamide ultrafin réalisée dans cette étude, pourrait également contribuer à améliorer la séparation des bandes isoenzymes.

### Estérases

L'activité des isoestérases, bien qu'elle soit beaucoup moins stable que celle des peroxydases lors des opérations d'extraction et de migration, paraît également être un marqueur biochimique important pour la distinction des espèces végétales cultivées. Dans notre essai, la révélation de l'activité estérasiqne est effectivement plus faible que celle qui a été obtenue pour les isoperoxydases. Néanmoins, les différents profils obtenus sur les gels révélés pour cette activité enzymatique peuvent être reconnus distinctement en nous basant principalement sur les 2 groupes Est 1 et Est 2 (fig. 2). Le premier groupe Est 1 (pHi 4,5-7,0) montre des isoenzymes dont l'intensité de coloration varie énormément avec les cultivars examinés. Dans ce groupe on note, d'après les enregistrements densitométriques, la présence de 2 à 6 bandes isoenzymes qui sont spécifiques de chacune de nos variétés. A l'instar des peroxydases, ce groupe d'isoestérases acides est effectivement polymorphe et représentatif, permettant de distinguer clairement nos différentes variétés, contrairement au deuxième groupe d'isoestérases (pHi 7,0-8,0), où l'on relève 2 à 3 bandes

isoenzymes qui sont monomorphiques pour la plupart des cultivars examinés. Aussi, avons-nous établi, sur la base de ces variations, les profils d'isoestérases caractéristiques de nos variétés.

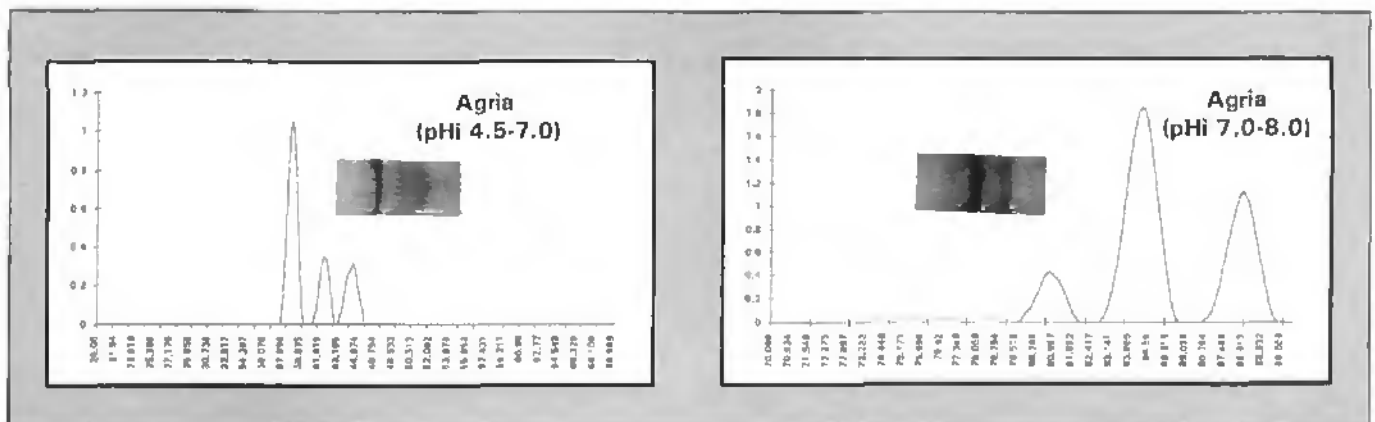
STEGEMANN et LOESCHKE (1976) ont établi un répertoire de variétés de pomme de terre cultivées en Europe, sur la base des isoestérases et de protéines extraites de tubercules. MARTINEZ-ZAPATER et OLIVER (1986) ont trouvé, en se basant sur 7 bandes isoenzymes, 17 phénotypes d'estérases sur 67 variétés de pomme de terre analysées, après une électrophorèse à pHi constant. Dans notre cas, les isoenzymes révélées à partir du matériel cultivé *in vitro* sont identifiées en fonction des bandes isoélectriques (pHi). Les profils électrophorétiques des isoestérases, bien différents de ceux qu'on obtient avec le tissu de tubercules, se concentrent principalement dans 2 zones (pHi 4,5-7,0 et pHi 7,0-8,0). Ils nous permettent effectivement d'obtenir autant de profils que de variétés examinées sur la base du polymorphisme généré par leur activité. Des résultats comparables, obtenus sur gel à pHi acide, ont été aussi rapportés par CHOI *et al.* (1991) pour un échantillon de 26 cultivars de pomme de terre.

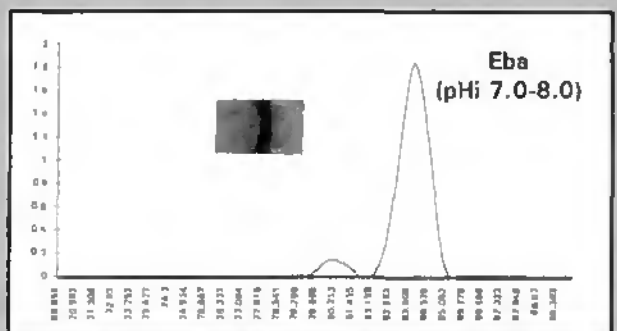
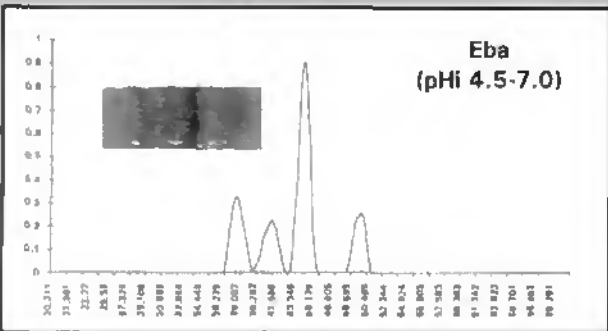
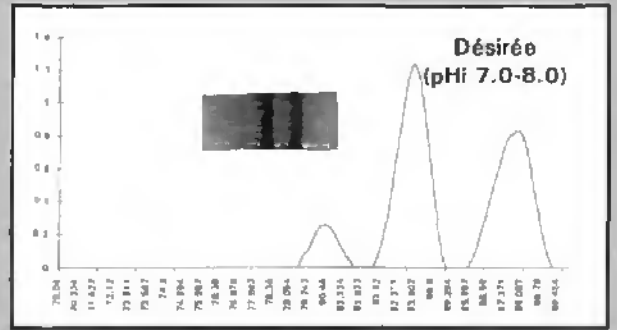
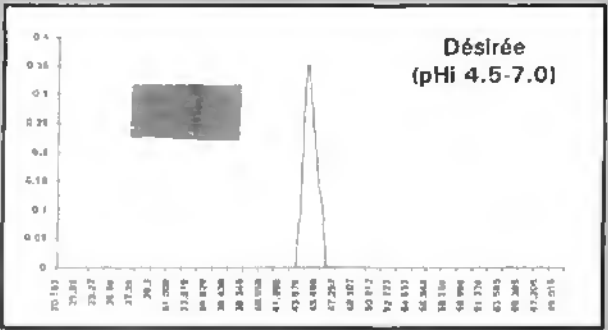
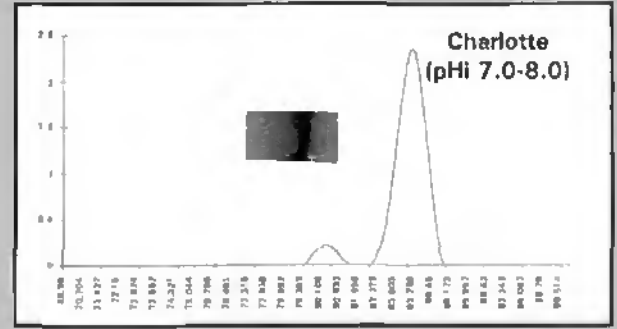
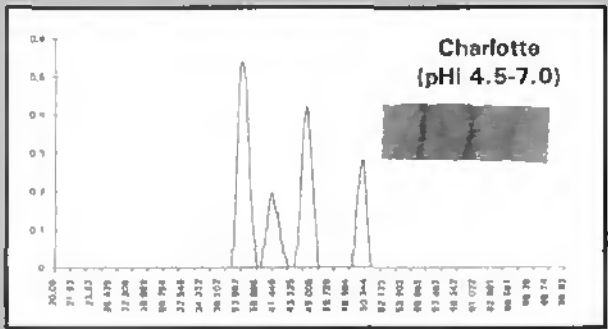
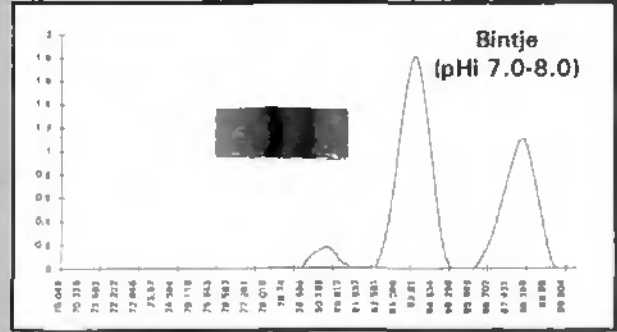
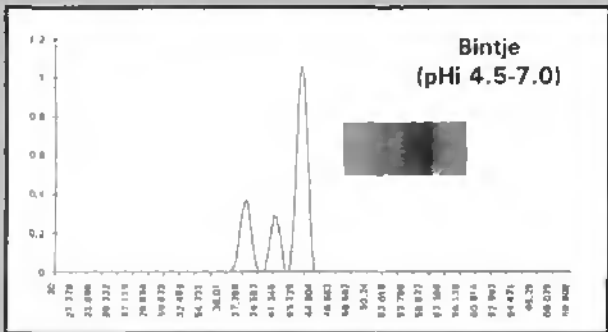
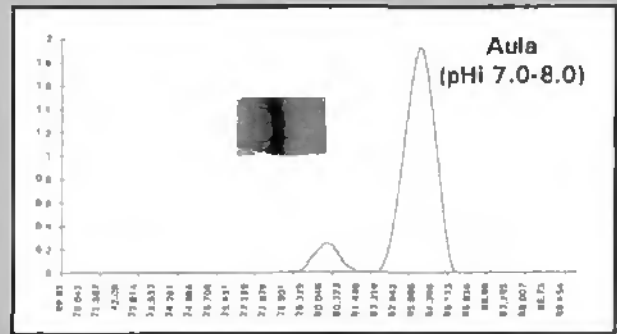
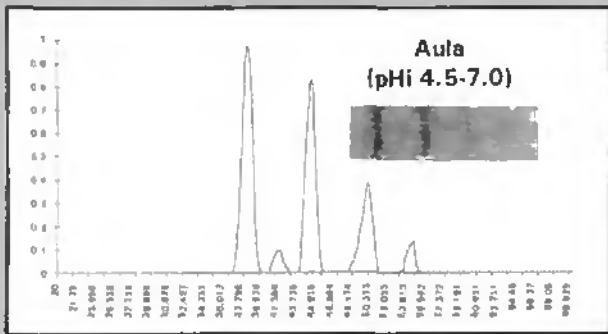
### Conclusions

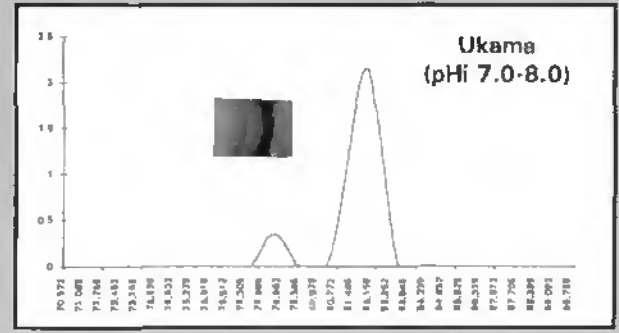
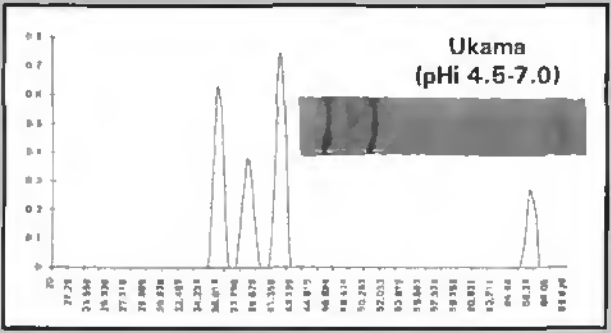
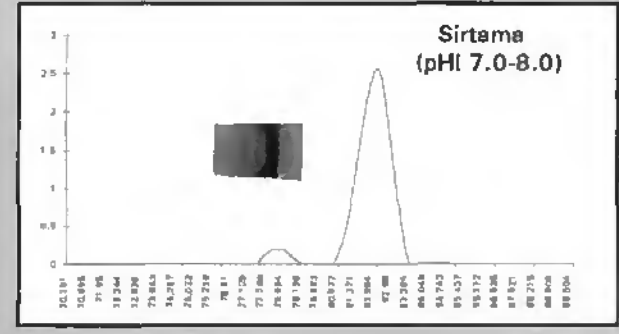
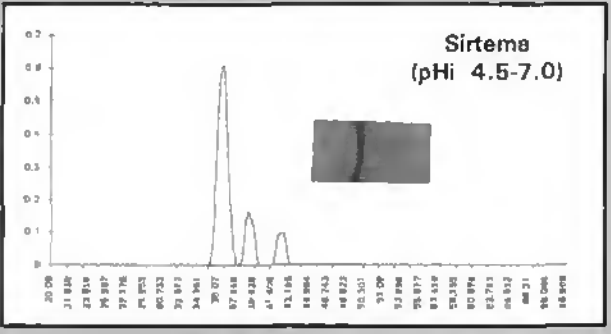
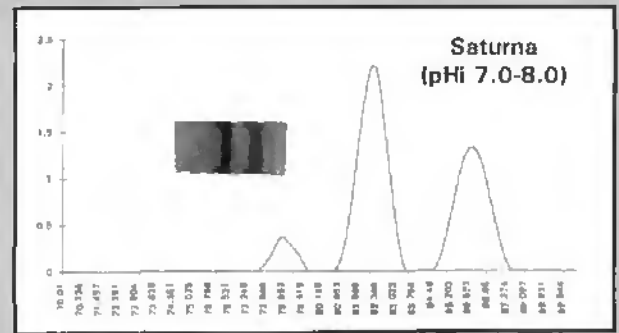
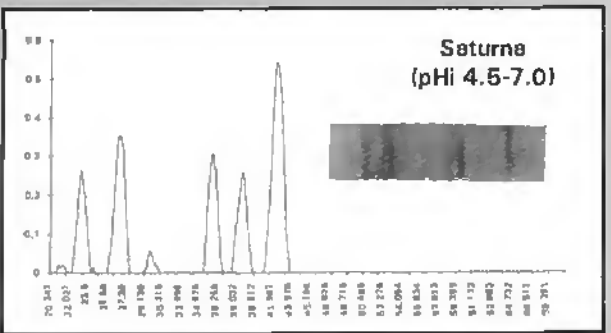
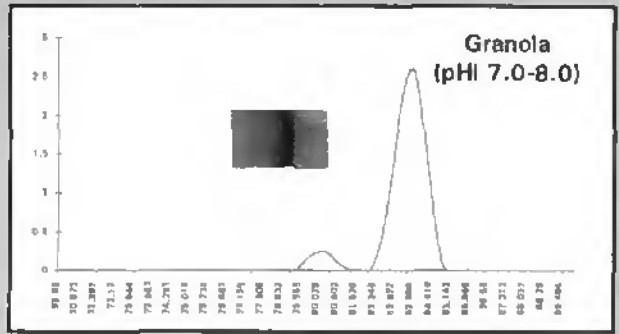
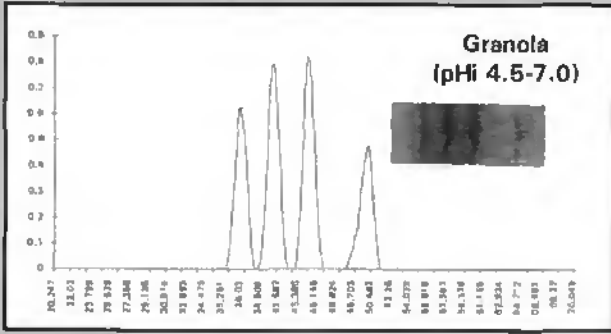
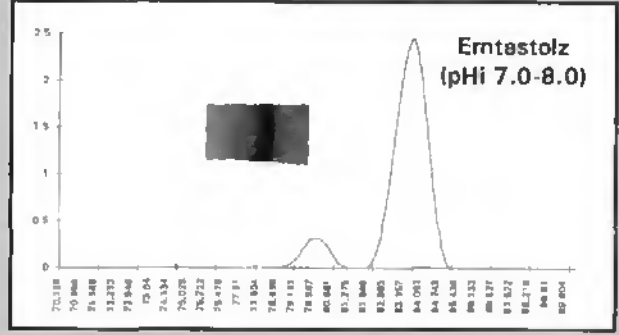
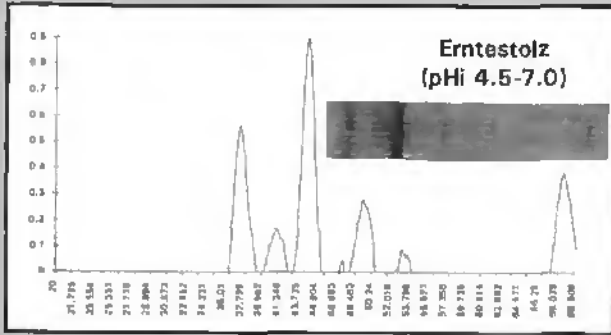
La technique de l'électrophorèse nous permet de distinguer les variétés de pomme de terre cultivées en Suisse, en nous basant sur le contenu en isoenzymes des deux systèmes peroxydases et estérases. Il semble bien, dans le cas présent, que ces deux systèmes isoenzymatiques soient suffisants, notamment avec la technique d'isoélectrofocalisation, pour caractériser un petit nombre de cultivars; toutefois, la re-

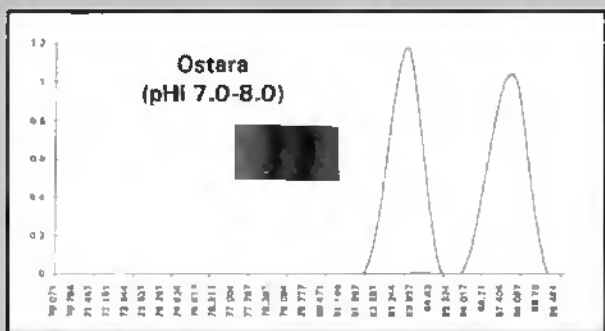
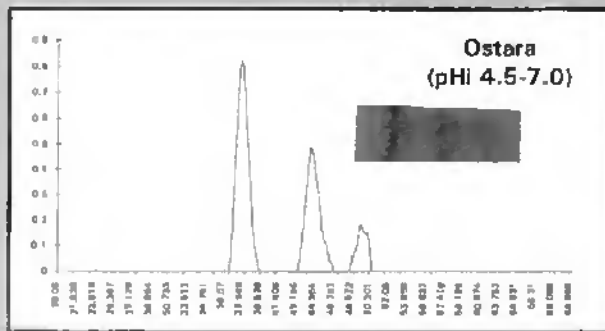
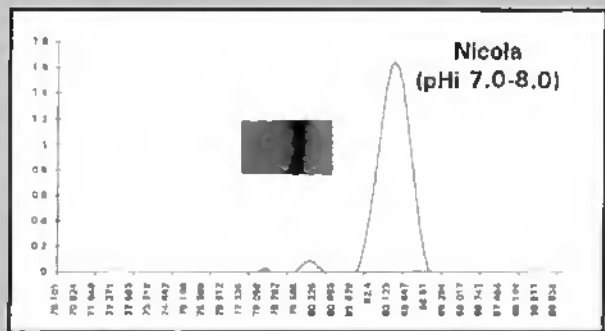
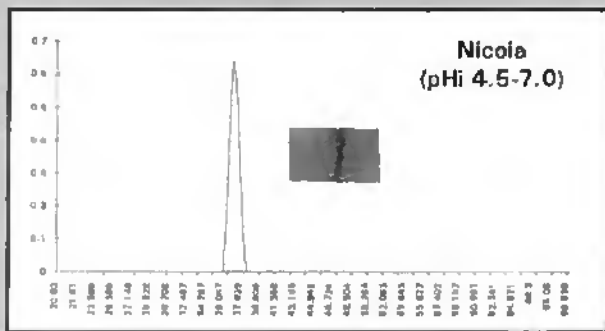
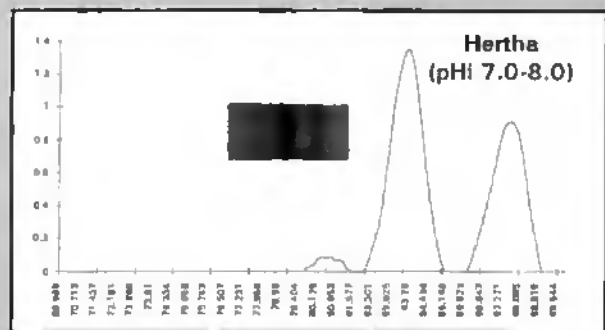
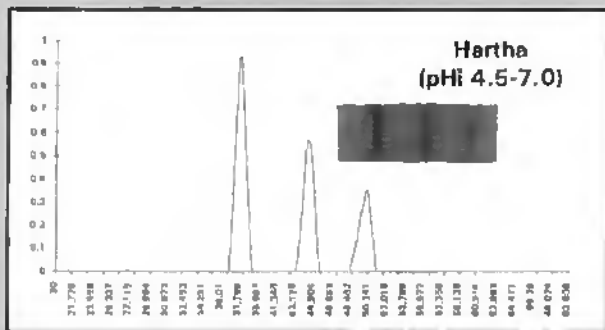
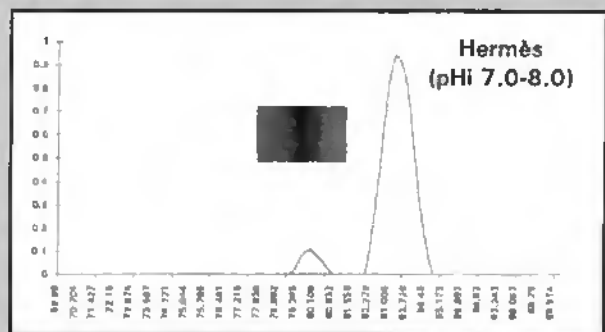
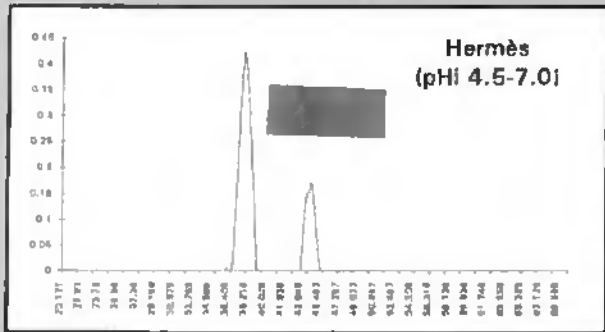
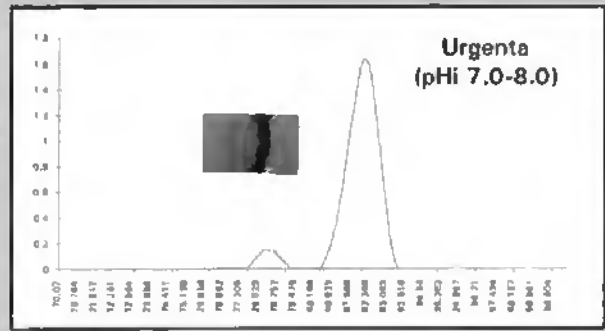
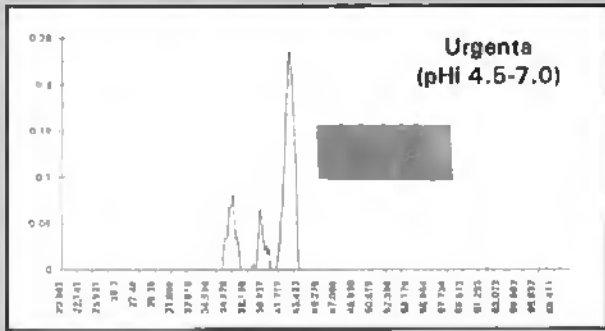
▷▷▷▷

Fig. 2. Profils et enregistrements densitométriques des isoestérases (IEF).









cherche d'autres systèmes enzymatiques représentatifs, en vue d'augmenter les possibilités de distinction entre les différents cultivars, s'avère indispensable lorsqu'on doit identifier un nombre important de variétés de pomme de terre. En outre, l'utilisation du matériel végétal cultivé *in vitro*, en l'occurrence du tissu foliaire, offre également une alternative avantageuse, permettant d'éviter tous les effets perturbateurs liés à la présence éventuelle de pathogènes lors d'électrophorèse sur des tubercules. Certes, l'avantage d'une identification variétale utilisant les isoenzymes comme marqueurs biochimiques est indéniabla, d'autant plus que les enzymes sont des produits générés directement par le génome. Mais les isoenzymes ne représentent ici qu'une source limitée de marqueurs correspondant à l'expression des exons\*. Par conséquent, d'autres types de marqueurs tels que la RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ou les RAPDs (Randomly Amplified Polymorphic DNAs) qui permettent d'accéder effectivement au génome entier, constituent ainsi une source infinie de marqueurs beaucoup plus nombreux que les isoenzymes. Aussi, des travaux d'identification portant sur ces techniques, en complément aux isoenzymes, sont en cours de réalisation et feront l'objet d'un prochain article.

## Bibliographie

- ALMGARD G. and CLAPHAM D., 1975. Isozyme variation distinguishing 18 *Avena* cultivars grown in Sweden. *Swed. J. Agric. Res.* 5, 61-67.
- ASINS M. J., BENITO C. and PEREZ DE LA VEGA M., 1981. Endosperm peroxidase electrophoresis patterns to distinguish tetraploid from hexaploid wheat. *Euphytica* 30, 389-392.
- BAILEY D. C., 1983. Isozymic variation and Plant Breeders' rights. In: *Isozymes in plant genetics and breeding*, part A. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, ISBN 0-444-42226-9, 425-440.

- BASSIRI A. and ADAMS M. W., 1978. Evaluation of common bean cultivars relationship by means of isozymes electrophoretic patterns. *Euphytica* 27, 707-720.
- BRADFORD M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- CHOI D. R., MOK I. G. and KIM H. Y., 1991. Identification of potato cultivars and clones by electrophoresis patterns of tuber proteins and isozymes. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 32 (1), 23-28.
- COLLET G. F., LÉ C. L. and NOWBUTH L., 1991. Isozyme characterization of apple rootstock M 9. Abstract COST 87/Shoot regeneration - Biochemical markers, Geneva, April 1991. In: *Plant in vitro Culture - Report of the 1991 activities*, edit. Fionbharr O'Riordain, 21-24.
- DESBOROUGH S. and PELOQUIN S. J., 1968. Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins of enzymes. *Am. Potato J.* 45, 220-229.
- KUHNS L. J. and FRETZ T. A., 1978. Distinguishing rose cultivars by gel polyacrylamide gel electrophoresis. II. Isoenzyme variation among cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 103 (4), 509-516.
- LÉ C. L., 1991. Aspects pratiques de la micropropagation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Revue suisse Agric.* 23 (6), 357-358.
- LEE J. M. and ELLSTRAND N. C., 1987. Inheritance and linkage of isozymes in the chirimoya. *The Journal of Heredity* 78, 383-387.
- LOESCHKE V. and STEGEMANN H., 1966. Protein der Kartoffelknollen in Abhängigkeit von Sorte und Virose (Polyacrylamid-Elektrophorese). *Phytochemistry* 5, 985-991.
- MANGANARIS A. G. and ALSTON F. H., 1993. Peroxidase isoenzyme genes in the identification of apple cultivars and *Malus* species. *Journal of Horticultural Science* 68 (5), 775-781.
- MARTINEZ-ZAPATER J. M. and OLIVER J. L., 1986. Identification of potato varieties: An isozyme approach. In: *Solanaceae: Biology and Systematics* (edit. by D'Arcy, W. G.), 457-467.
- MOORE G. A. and COLLINS G. B., 1983. New challenges confronting plant breeders. In: *Isozymes in plant genetics and breeding*, part A. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, ISBN 0-444-42226-9, 25-28.
- NIETO A. R., SANCHO A. C., BARROS M. V. and GORGE J. L., 1990. Peroxydase zymograms at constant and gradient pH electrophoresis as an analytical test in the identification of potato varieties. *J. Agric. Food Chem.* 38 (12), 2148-2153.
- PEREZ DE LA VEGA M., 1993. Biochemical characterization of populations. In: *Plant Breeding: principles and prospects*, edited by M. D. Hayward, N. O. Bosemark and I. Romagosa. Chapman & Hall, Publish., London, ISBN 0-412-43390, 184-200.
- PONTIKIS C. A., LOUKAS M. and KOUSOUNIS G., 1980. The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. *J. Hort. Sci.* 55, 333-343.
- PROTOPADAKIS E. E. and YANNITSAROS A., 1994. Identification by isozymes of nine populations of tulipa from Greece. *Journal Hort. Sci.* 69 (1), 11-14.
- REUST W., 1993. Liste officielle suisse des variétés de pomme de terre 1994. *Revue suisse Agric.* 25 (6), I-VI.
- SIMPSON M. J. A. and WITHERS L. A., 1986. Characterization using isozyme electrophoresis: A guide to the literature. International Board for Plant Genetic Resources, FAO-Rome.
- STEGEMANN H. and LOESCHKE C., 1976. Index of european potato varieties. *Mitt. Biol. Bundesanstalt Berlin* 168, 215 p.
- TANKSLEY S. D. and ORTON T. J., 1983. Isozymes in plant genetics and breeding, Part A. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, ISBN 0-444-42226-9. 516 p.
- VALLEJOS C. E., 1983. Enzyme activity staining. In: *Isozymes in plant genetics and breeding*, Part A, Tanksley S. D. and Orton T. J., eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 469-516.

## Zusammenfassung

### Beitrag der Elektrophorese zur Identifizierung schweizer Kartoffelsorten

Durch electrophoretische Analyse von *in vitro* kultivierten schweizer Kartoffeln durch Iso-electrofokalisierung (IEF) der Peroxydase- und Esterasesysteme erzielt man charakteristische electrophoretische Profile, die für die Sortenidentifizierung nützlich sind.

## Summary

### Contribution of electrophoresis to identify potato varieties cultivated in Switzerland

Electrophoretic analysis of *in vitro* varieties of potatoes cultivated in Switzerland, using isoelectric focusing (IEF) separations of Peroxydase and Esterase systems, permits to obtain characteristic electrophoretic banding patterns useful for variety identification.

# Tridel

*Obtenteur**Ascendance**Inscription sur la liste officielle**Representant*

Station fédérale de recherches agronomiques de

Changins,

CH-1260 Nyon

UT2229 / CT 138.77

1994

Fédération suisse des sélectionneurs

case postale 16

CH - 1567 Delley

## 1. Caractères morphologiques

Coloration des oreillettes: faible  
 Pilosité du col de l'épi: moyenne  
 Logueur du bec de glume: petit  
 Pilosité de la face externe de la gume: nulle  
 Couleur de l'épi à maturité: blanc

## 2. Caractères agronomiques

Rendement: élevé  
 Résistance à la verse: bonne  
 Précocité à l'épiaison: mi-précoce  
 Poids de 1000 grains: moyen  
 Hauteur des plantes: moyenne  
 Rendement au triage: bon

## 3. Caractères technologiques

Poids à l'hectolitre: bon  
 Teneur en protéine: moyenne

## 4. Résistances

Oidium: très bonne  
 Rouille jaune: bonne  
 Rouille brune: très bonne  
 Piétin verse: moyenne

**Tridel** est un triticale d'automne de la Station fédérale de Changins. Comparé aux variétés Méridal et Brio, Tridel fournit un rendement élevé et une bonne résistance à la verse. De précocité moyenne, Tridel est court de paille (environ 110 cm). Son poids de 1000 grains ainsi que son poids à l'hectolitre sont assez semblables à ceux des témoins Dagro et Méridal. Tridel possède également un haut niveau de résistance aux maladies cryptogamiques.

### Rendement (28 essais de 1991 à 1993)

Variétés	Rendement relatif			
	1991	1992	1993	1991 à 1993
Témoin (Brio/Méridal)	100,0 (= 75,5 q/ha)	100,0 (= 72,3 q/ha)	100,0 (= 82,9 q/ha)	100,0 (= 76,7 q/ha)
Brio	102,2	102,1	101,8	102,1
Méridal	97,8	97,9	98,2	97,9
Dagro	103,9	99,6	98,8	101,9
<b>Tridel</b>	<b>109,1</b>	<b>105,5</b>	<b>102,2</b>	<b>106,8</b>

### Caractères agronomiques

Variétés	Résistance à la verse note	Hauteur des plantes cm	Epiaison +/- jours	Rendement au triage %	Poids de 1000 grains g	Poids à l'hectolitre kg	Aspect du grain note	Teneur en protéine NIR, %
Brio	1,5	118,4	0,4	92,7	38,3	69,8	4,2	12,1
Méridal	1,2	109,1	-0,4	87,1	42,4	67,1	4,5	11,7
Dagro	1,8	129,1	1,7	91,6	42,5	68,5	4,6	12,1
<b>Tridel</b>	<b>1,2</b>	<b>110,8</b>	<b>0,9</b>	<b>93,6</b>	<b>42,3</b>	<b>68,7</b>	<b>4,4</b>	<b>11,7</b>

### Résistance aux maladies

Variétés	Résistances 1)			Indice 2)		Etat sanitaire du feuillage
	état après hiver	rouille jaune	rouille brune	septoriose feuille	septoriose épis	
Brio	1,9	2,2	1,2	103,7	105,4	3,9
Méridal	2,0	2,0	1,0	86,1	91,3	3,4
Dagro	2,4	2,0	1,2	102,1	113,9	4,2
<b>Tridel</b>	<b>2,0</b>	<b>1,7</b>	<b>1,0</b>	<b>102,5</b>	<b>100,6</b>	<b>3,2</b>

1) Note : 1 = très bonne; 9 = très mauvaise

2) Indice = plus le chiffre est bas, plus la résistance est grande

## Comparison of the easy-to-root Jork 9 and Cepiland and the difficult-to-root EMLA 9 and Lancep *Malus* M9 rootstocks *in vitro*

G.F. Collet, L. Nowbuth, C.L. Lê

Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, 1260 Nyon, Switzerland.

**Abstract:** We compared the initiation of rooting in various *Malus* rootstocks (easy/difficult-to-root). Rooting depended on the amount of IAA taken up (time by concentration). We tentatively identified the cells from which roots originate.

### 1. Introduction

Rooting of cuttings is an essential stage for the vegetative reproduction of plants. Important differences in the ability to produce adventitious roots exist between cultivars of a single species. Physiological and histological comparison of M9 rootstocks lead to a better understanding of the rooting process (Charlton, 1991; Zhou *et al.*, 1992).

### 2. Material and Methods

#### Plant material

*Malus* M9 rootstocks from different groups (grp) with respect to their isozyme patterns (isoperoxidases and isoesterases) (Table 1) (Menendez *et al.*, 1986), i.e. the *easy-to-root* Jork 9 (Lisse) (grp 3): (J9) and Cepiland (INRA) (grp 2): (CEPI) and the *difficult-to-root*: EMLA9 (East-Mailing)(grp 1): (UK) and Lancep (INRA) (grp 2): (LANC), were cultivated *in vitro*.

Preparation of plant material *in vitro* (vitrocuttings as well as stem slices), pretreatment with auxin and rooting were after Collet (1985, 1988) and Van der Krieken *et al.* (1993). One-mm-thick slices provided the most regular result (better than 0.7 mm) after immersion in aqueous solution of 0.3; 1 or 3 mM IAA for 10 to 40 min. Slices (60) were set on CMS medium (Collet, 1985) for 3 weeks in normal photo-thermoperiod (16 h/39 mMol/m<sup>2</sup>/s; at 23/18°C), with the first 3 days in the dark.

Table 1 - Identified types-M9's rootstocks by isoperoxidases and isoesterases patterns. 7 groups can be proposed. Extraction, electrophoresis (IEF), revelation and activities by usual techniques (Menendez *et al.*, 1966)

Name	Abbreviation	Country of Origin	Source	Groups
KL29 5364	(KL) 5364	Belgium	Gembloux	1
KL29	(KL) 856	B	"	1
8912 856				
KL29 8750	(KL) 8750	B	"	1
KL29	(KL) 802	B	"	1
8905.802				
EMLA 9	UK (153)	England	East-Malling	1
EMLA 8904 (516)	(EMLA9) 516	Switzerland	RAC	1
EMLA9	Burgmer	Germany	RAC	1
Buramer				
EMLA9 8912 (553)	(EMLA9) 553	Switzerland	RAC	1
CI. 2 CTIFL	CI. 2	France	"	1
CI. 3 CTIFL	CI. 3	F	"	1
LANCEP	LANC	France	CTIFL	2(?)
CEPILAND	CEPI	F	CTIFL	2(?)
JORK9-NDL	J 9 NL	Germany	COWT	3
JORK9-Lisse	J 9 Li	D	COWT	3
JORK9 8537	J-9 Rac (8537)	D	RAC	3
JORK9 8904	J-9 Rac (8904)	D	RAC	3
Mac 9	Mac 9	USA	Sud Meristem	4
Budakowski	Buda	Poland	RAC	5
57490				
B2234 (B913)	2234 (B913)	Belgium	Gembloux	6
EMLA9 COST	COST	Belgium	Gembloux	7
Golden delicious	Gold	USA	RAC	7

#### Histological study

Stem slices were fixed in formalin-acetic acid-alcohol (FAA) solution. After washes in deionized water and gradual dehydration in ethanol, samples were infiltrated with 50% activated Histoiresin<sup>TM</sup>/ethanol, then with 100% activated Histoiresin<sup>TM</sup> (for 24 hr) and further embedded in 100% Histoiresin<sup>TM</sup> + hardener (Reichert-Jung Heidelberg).

This research was supported in part by the COST 87 action.  
Received for publication 26 October 1993

Samples were then cut at 1 or 2  $\mu\text{m}$ , stained with periodic acid-Schiff reagent (PAS) and counter-stained with Fast Green CFC in 7% acetic or Delafield's haematoxylin or acid fuchsin and methylene blue. They were mounted in Eukitr and observed under microscope to study the development of the meristem primordia.

### 3. Results and Discussion

The first approach was to compare the rooting of vitro cuttings after 5 or 6 weeks of development *in vitro*. Depending on the auxin treatment (quick dip: from a few minutes up to more than a week), we found great differences among the various M9 rootstocks, even though they are closely related (Table 1).

By scratching the bottom of the cuttings, rooting was improved, especially the number of roots/explant (Collet, unpublished). To simplify the model and eliminate the possible role of buds and leaves, we used a modified 'slice technique' after Van der Krieken *et al.* (1993) to compare different M9 rootstocks. We checked first the role of slice position within the stem (Fig. 1). Only the difficult-to-root EMLA 9 presented a lower percentage of rooting in slices from the distal zone (closest to apex). Comparison of J9 and EMLA 9 showed varying sensitivity to auxin. Figure 2 shows that for both cultivars the optimum rooting condi-

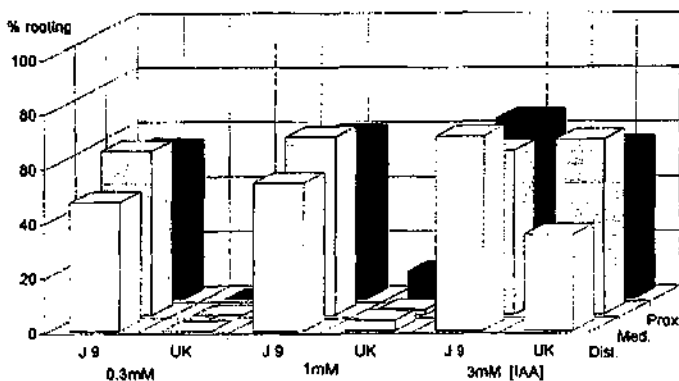


Fig. 1 - Different sensitivities to IAA treatment (0.3; 1 and 3 mM) for Easy-to-root: Jork 9 (J9) and Difficult-to-root: EMLA 9 (UK). No significant difference (5%) between all J9's treatments, except for 3 mM/Dist. Prox. = proximal; Med. = median; Dist. = distal (closest to apex).

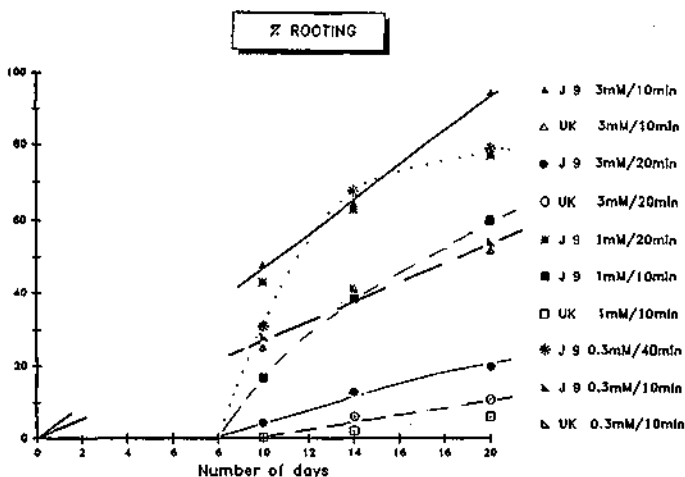


Fig. 2 - Rooting of Easy-to-root Jork 9 (J9) and Difficult-to-root EMLA 9 (UK) at different IAA concentrations: 0.3; 1 or 3 mM; and duration of treatment: 10, 20 or 40 min.

tion is 3 mM IAA for 10 min, and that similar values of a concentration over time results in similar rooting. This fact confirms the importance of a minimum quantity (threshold) of auxin to trigger the initiation of competent cells. Shifted to higher IAA concentrations, EMLA 9 responds similarly, but this cultivar seems more sensitive to high concentrations of auxin than J9, as was shown by the five-fold greater necrosis at 3 mM IAA and by callus formation. We also noted a tendency to increase the number of roots/explant (slice) by increasing IAA concentration, particularly for EMLA 9 (Table 2).

Table 2 - Rooting efficiency (Nb. of roots/slice) 21 days after auxin treatment (10 min)

[IAA]	Cultivars	1 root	2 - 4 root	>= 5 roots
0,3 mM	Jork 9	16%	29%	10%
	EMLA 9	0%	0%	0%
1,0 mM	Jork 9	14%	35%	11%
	EMLA 9	5%	1%	0%
3,0 mM	Jork 9	15%	32%	19%
	EMLA 9	10%	21%	21%

Comparison between French rootstocks Cepiland and Lancep confirms these results (data not shown). The easy-to-root J9 and Cepiland evince an almost general rooting of slices. The difficult-to-root EMLA9 and Lancep developed only a few roots from all the slices (Lancep).

Table 3 shows differences in rooting between cultivars. No clear polarity appeared within these thin slices to direct rooting. Roots sprout from both faces of the slices (Fig. 3, photo 2). The lower percentage of rooting when slices were placed flat instead of in a vertical position (faces perpendicular to the surface of the medium) can not be explained by a possible polarity of the explant because of the presence of roots on both faces in all cultivars. The cause of low rooting in the former situation could be a deficiency of oxygen in cells facing the medium. This assumption is supported by the complete inhibition of rooting when slices are completely immersed in the liquid medium and added to the substrate 24 hr after treatment.

Table 3 - Distribution of roots, after IAA treatment at 1mM/20 min, for M9-types cultivars (Jork 9; EMLA 9; Cepiland; Lancep). d: days. Percentage: means of rooting's percentage, 2 repetitions; number of slices/treatment: 60-120. SE: standard error

Cultivars	Percentage of rooting						Distribution of roots upon face's slice	
	Vertical (Face against surface of medium)			Horizontal (Faces perpendicular to surface)			1 face	2 faces
	/10 d	/14 d	/21 d	/10 d	/14 d	/21 d		
Jork 9	17	43	60	58	77	88	155/180	11/180
SE	1	9	0.4	4	19	16		
EMLA 9	13	26	27	31	47	56	79/180	23/180
SE	0.4	3	5	4	8	6		
Cepiland	18	23	33	39	55	67	77/180	24/150
SE	2	1	2	9	14	9		
Lancep	2	6	8	7	21	30	47/180	3/180
SE	2	6	7	7	5	8		

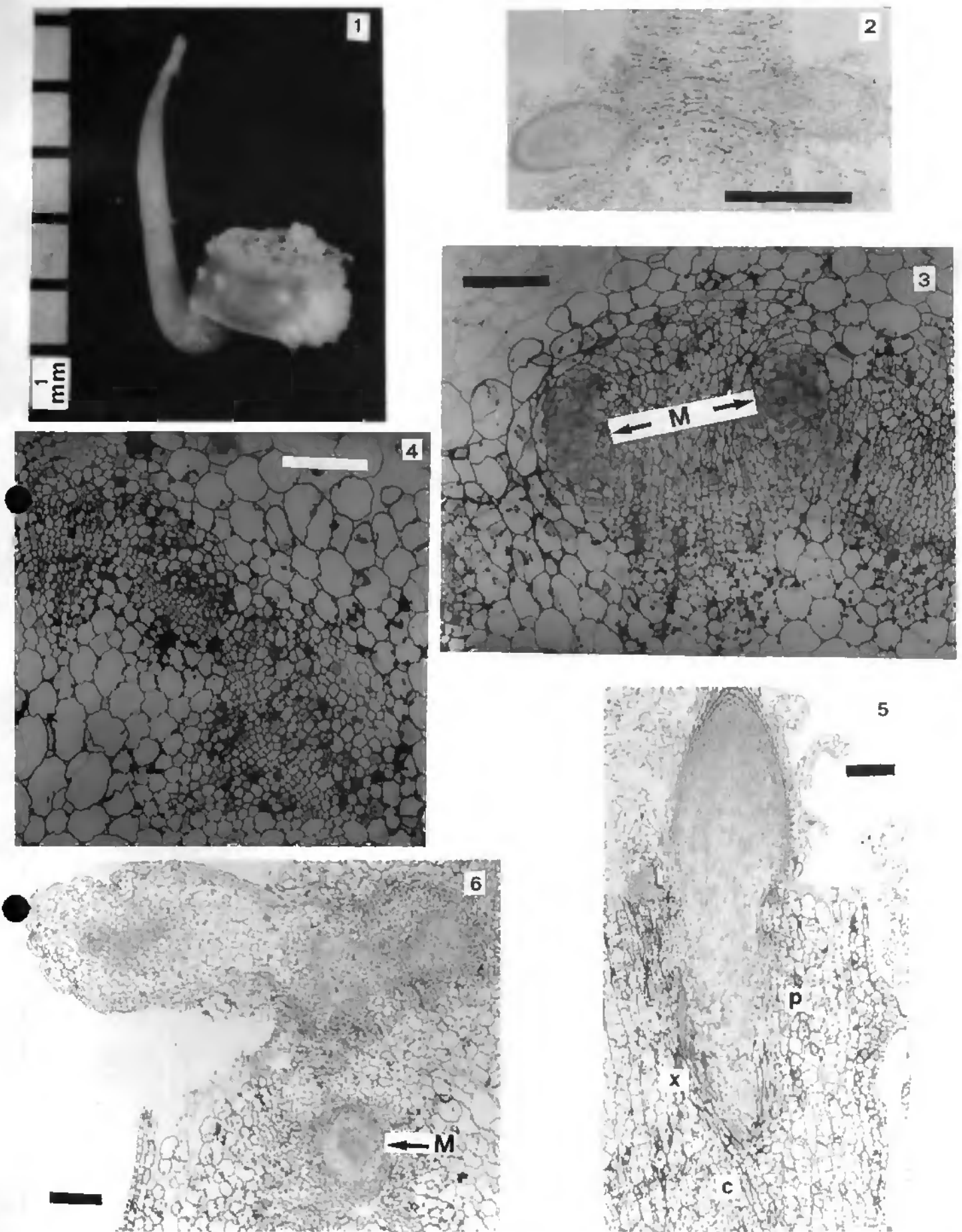


Fig. 3 - Photo 1: Root development showing positive geotropism from the upper face. Photo 2: Explant slice (cv. Lancep) induced with IAA 1 mM-20 min, and set on the medium with the vascular twig parallel to its surface. After 20 days roots emerge from both faces of the slice, Bar = 1 mm. Photo 3: Transverse section (cv. Cepiland) showing initiation of meristemoid (M - >) (Primordium), 7 days after treatment (IAA 1mM, 20 min). The primordium starts from cambial zone between vascular groups. Bar = 0,1 mm. Photo 4; Transverse section (cv. Lancep) showing enlarged cambial region without meristemoid development, 9 days after auxin treatment (IAA 1mM, 20 min), Bar = 0,1 mm. Photo 5; Emergence of root through face's slice (cv. Lancep), originated from vascular tissue. X = xylem; P = phloem; C = cambium. Bar = 0,1 mm. Photo 6: Explant slice (cv. lancep showing, beside already well developed roots after 35 days of culture, initiation of new primordia (M), Bar = 0,1 mm.

Gravimorphism is present during the growth of new roots (Fig. 3, photo 1).

Histological examination confirmed results already reported for M26 and EMLA 9 (Zhou *et al.*, 1992). Figure 3, photo 3, shows a rapid development of primordia in slices of easy-to-root J9 or Cepiland, starting at the level of cambium and usually between vascular groups. If pericycle cells are involved in the production of lateral roots (Charlton, 1991), similar cells (competence-cambium) seem to be at the origin of the initiation of adventitious roots in the stem (Fig. 3, photo 5). In contrast, the difficult-to-root (EMLA 9 (UK) and LANCEP) cultivars show multiplication of cambial cells first (Fig. 3, photo 4), with the later appearance of fewer meristemoids. In both cases, after a longer time, new primordia are again produced (Fig. 3, photo 6). They do not depend directly on the induction treatment (exogenous IAA). However, auxin metabolism must be considered in relation with the development of the explant.

#### 4. Conclusion

To promote rooting at least two conditions are required:

1) Auxin (endogenous or exogenous) acts as a trigger to start the rooting initiation process if its concentration (quantity) in the competent cells is adequate; 2) Only competent cells are able to respond to chemical signals (auxins and other possible plant growth regulators): after or during their multiplication, they can develop into root primordia.

Differences between easy-to-root and difficult-to-root rootstocks concern the capacity to organise rapidly new cells into primordia and not only division of cells after induction by auxin.

#### Acknowledgements

We thank Dr. G-J de Klerk for his help in the preparation of the manuscript.

#### References

- CHARLTON W.A., 1991 - Lateral root initiation, p. 103-128. In: WAISEL, ESHEL and KAFKAFI, *Plant roots, the hidden half*. - Dekker Publ., New York, Basel.
- COLLET G.F., 1985 - *Enracinement amélioré lors de la production in vitro de rosiers*. - *Revue suisse Vitic., Arboric., Hortic.*, 17:259-263.
- COLLET G.F., 1988 - *Improvement to induce rooting of fruit trees in vitro*. - *Acta Horticulturae*, 227:318-323.
- MENENDEZ R.A., LARSEN F.E., FRITTS R. Jr., 1986 - *Identification of apple rootstock cultivars by isozyme analysis*. - *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111 (6) 933-937.
- VAN DER KRIEKEN W.M., BRETELER H., VISSER M.H.M., MAVRIDOU M., 1993 - *The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system*. - *Plant Cell Reports*, 12:203-206.
- ZHOU J., WU H., COLLET G.F., 1992 - *Histological study of initiation and development in vitro of adventitious roots in minicuttings of apple rootstocks of M26 and EMLA9*. - *Physiol. Plant.*, 84:433-440.

## Effet du thiosulfate d'argent sur la croissance de la pomme de terre cultivée *in vitro*

C.L. LÉ<sup>1</sup>, Station fédérale de recherches en production végétale de Changins, CH-1260 Nyon

### Résumé

Dans ce travail, nous examinons l'effet du thiosulfate d'argent sur la croissance des miniplantes de pomme de terre cultivées *in vitro*. On y relève que le thiosulfate d'argent, en qualité d'agent inhibiteur de l'éthylène, permet la croissance des plantes à fort développement, facteur indispensable sur le plan pratique pour la micropropagation.

Il en résulte ainsi des perturbations affectant la croissance des tissus ou des organes en cours de culture, et, dans des cas plus graves, pouvant conduire à des modifications profondes de la morphologie de la plante elle-même (fig. 1). L'utilisation des inhibiteurs d'éthylène tels que le sulfate d'hydroxyquinoléine (PARUPS, 1975), les solutions de permanganate (HUSSEY et STACEY, 1984) ou de nitrate d'argent (BEYER, 1976) a notamment permis de réduire l'effet toxique de celui-ci en culture *in vitro*. Concernant l'inhibition de l'éthylène par les ions d'argent ( $Ag^+$ ), CAMERON et REID (1981) ont montré que l'apport

des ions  $Ag^+$  sous forme de thiosulfate ( $Ag_2S_2O_3$ ) est bénéfique et moins toxique que le nitrate d'argent. De même, PERL *et al.* (1988) ont aussi signalé cette action inhibitrice du thiosulfate d'argent sur la réduction du taux d'éthylène produit durant le développement *in vitro* de la pomme de terre.

Nous rapportons ici les premiers résultats concernant l'effet du thiosulfate d'argent sur la capacité de développement des minihoutures de pomme de terre cultivées *in vitro*, cela dans le but d'améliorer, sur le plan pratique, la qualité de notre matériel de base permettant sa diffusion à large échelle.

### Introduction

Dans la pratique de la culture *in vitro*, les récipients de culture sont souvent fermés par un simple capuchonnage ou par un scellage supplémentaire à l'aide d'une bande plastique (parafilm) qu'on applique par-dessus le couvercle, afin d'éviter le dessèchement du milieu nutritif et les contaminations qui sont provoquées par la présence de microorganismes dans l'environnement immédiat. Cette pratique présente dans bien des cas, selon la nature et le type de fermeture utilisés, des difficultés importantes quant au contrôle précis de l'échange gazeux entre le récipient de culture et le milieu environnant (MADEC *et al.*, 1979); dans le cas d'une fermeture trop étanche, une forte accumulation d'éthylène, substance inhibitrice, peut se produire en compromettant sérieusement la croissance des tissus végétaux (GEORGE et SHERRINGTON, 1984).

<sup>1</sup>Avec la collaboration technique de M. D. Thomas.

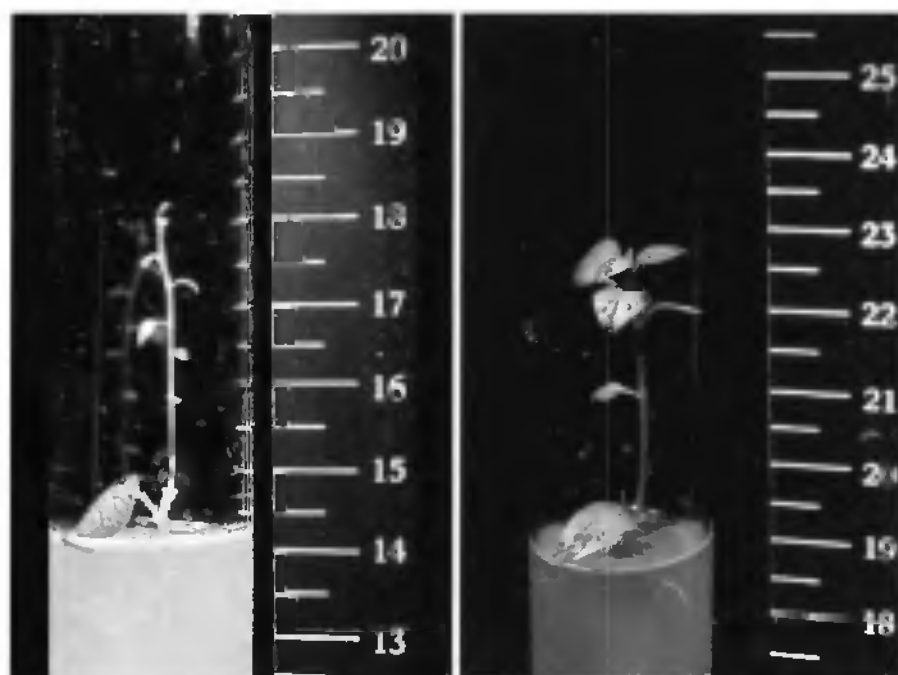


Fig. 1. Miniplantes de pomme de terre (cv. Matilda) développées en milieu confiné (à gauche) et aéré (à droite).

## Techniques expérimentales

### Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans notre essai est constitué de miniplantules de pomme de terre (cv. Charlotte et Matilda) cultivées *in vitro*, selon la technique décrite auparavant (LÉ, 1991).

### Milieux de culture

Les explants (ou miniboutures) prélevés sur la miniplante, sont cultivés dans des tubes en verre de 125 × 25 mm, recevant chacun 12 ml de milieu de base composé de sels minéraux CMS (COLLET, 1985). A ce milieu sont ajoutés 2% de saccharose et diverses concentrations de thiosulfate d'argent, préparées selon les indications de PERL *et al.* (1988). Le pH des milieux nutritifs est ajusté à 5,7-5,8 avec du NaOH (0,1N). Les milieux sont ensuite solidifiés avec 0,7% d'Agar (Difco Bacto-Agar) et autoclavés à 121 °C (1,1 kg/cm<sup>2</sup> de pression) pendant 15 minutes.

### Conditions de culture

Les tubes de culture fermés avec des capuchons en polypropylène (Bellco®) sont placés dans un environnement où ils sont soumis à une photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures. L'éclairage, dont l'intensité lumineuse est de 100 µmol/m<sup>2</sup>/s au niveau des cultures, est fourni par des tubes fluorescents (Sylvania®-GTE, 215 W, Cool White). La température est maintenue à 18 °C ± 1 le jour et à 16 °C ± 1 la nuit. L'humidité relative est de 55 ± 5% dans la chambre de culture.

L'évaluation de l'effet du thiosulfate d'argent sur le développement des plantes de pomme de terre *in vitro* est réalisée sur la base de 20 explants par traitement.

L'expérience a été répétée au moins deux fois.

## Résultats et discussion

Dans nos essais préliminaires, diverses concentrations de thiosulfate d'argent ont été examinées afin de déterminer leur seuil de phytotoxicité sur nos cultures. De ces résultats, il a été observé que 10 µM s'avère être la meilleure concentration permettant d'obtenir une bonne croissance pour l'ensemble des plantes. Aussi avons-nous choisi de poursuivre les essais avec cette même teneur de thiosulfate d'argent.

Tableau 1. Croissance des miniplantules de pomme de terre après 4 semaines de culture *in vitro* avec (A) et sans (S) apport de thiosulfate d'argent.

Variétés	Traitements	Longueur (cm)	Nombre nœuds totaux	Nombre nœuds utilisables	Surface foliaire (cm <sup>2</sup> )	Poids frais (mg)
Charlotte <sup>1</sup>	A	7,86 <sup>a</sup> ± 0,13	5,33 <sup>a</sup> ± 0,15	3,61 <sup>a</sup> ± 0,11	1,60 <sup>a</sup> ± 0,06	184,53 <sup>a</sup> ± 4,01
	S	6,64 <sup>b</sup> ± 0,42	4,62 <sup>b</sup> ± 0,12	2,75 <sup>b</sup> ± 0,14	1,17 <sup>b</sup> ± 0,07	167,9 <sup>b</sup> ± 7,01
Matilda <sup>1</sup>	A	7,08 <sup>a</sup> ± 0,25	5,65 <sup>a</sup> ± 0,11	3,25 <sup>a</sup> ± 0,10	1,75 <sup>a</sup> ± 0,05	173,34 <sup>a</sup> ± 9,51
	S	3,90 <sup>b</sup> ± 0,24	4,75 <sup>b</sup> ± 0,16	1,44 <sup>b</sup> ± 0,15	0,93 <sup>b</sup> ± 0,05	125,00 <sup>b</sup> ± 5,36

<sup>1</sup> Les valeurs (moyenne ± erreur standard) suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon le test de DUNCAN.

L'examen des résultats présentés dans le tableau 1 montre que l'adjonction du thiosulfate d'argent au milieu nutritif a un effet favorable sur la croissance des miniboutures de pomme de terre (cv. Charlotte et Matilda) cultivées *in vitro* (fig. 2). En effet, on note une différence significative au cours de la phase de croissance en considérant les divers paramètres portant sur le développement des miniboutures cultivées en présence de thiosulfate d'argent.

Aussi, le maintien des miniboutures en présence de l'agent inhibiteur d'éthylène permet d'obtenir avec la variété Charlotte des plantes ayant un meilleur développement que celles dont le milieu nutritif est dépourvu de thiosulfate d'argent. Cette différence de croissance se montre encore plus marquante avec

la variété Matilda. On relève en effet une augmentation de 45% de la taille moyenne des miniplantules lorsqu'elles sont cultivées sur milieu enrichi d'inhibiteur d'éthylène, en comparaison avec celles qui ne reçoivent pas de thiosulfate d'argent. Cette observation est en accord avec les résultats de PERL *et al.* (1988) qui ont fait mention de l'effet bénéfique du thiosulfate d'argent sur la croissance *in vitro* de la variété de pomme de terre Bintje.

Des différences importantes ont été également observées quant au nombre de nœuds utilisables par rapport à l'ensemble des nouveaux bourgeons axillaires produits en cours de croissance. En présence de thiosulfate d'argent, la moyenne des nœuds utilisables obtenus avec la variété Charlotte est de 3,61 chez les plantes traitées, alors qu'elle est de 2,75 chez la variante témoin. De même, avec la variété Matilda, on constate une nette supériorité du nombre de bourgeons utilisables produits par les miniplantules auxquelles l'inhibiteur de l'éthylène est mis à disposition, cela en comparaison avec des plantes témoins. Dans nos conditions d'expérimentation, la diminution du nombre de nœuds utilisables observée sur les miniplantules ne recevant pas d'agent inhibiteur pourrait être expliquée par un mauvais développement des entrenœuds dû à l'excès d'éthylène dans l'atmosphère de culture. Des observations similaires ont été également signalées par MADEC *et al.* (1979). Ces auteurs ont constaté que l'absence d'échanges gazeux entre le récipient de culture et l'environnement extérieur pouvait conduire à la formation *in vitro* de plantes de pomme de terre d'aspect anormal et de faible vigueur.

L'estimation de la surface foliaire de la troisième feuille comptée depuis l'apex a aussi montré une augmentation importante de l'appareil végétatif – indis-



Fig. 2. Miniplantules de pomme de terre (cv. Matilda) cultivées avec (à gauche) et sans (à droite) thiosulfate d'argent.

pensable à la photosynthèse – chez les plantes cultivées avec du thiosulfate d'argent. Chez la variété Charlotte, une augmentation de 27% de surface foliaire peut être constatée en comparant la variante traitée avec l'inhibiteur de l'éthylène à celle des témoins. Chez la variété Matilda, l'écart des surfaces foliaires obtenu au cours de cet essai est encore plus grand (47%). Ce même phénomène a été aussi observé par PERL *et al.* (1988), qui ont effectivement fait état de l'augmentation de la taille des limbes foliaires avec la variété Binje cultivée en présence de thiosulfate d'argent.

En accord avec les constatations de CHANG et CHAN (1991), nous avons observé une augmentation de la masse de matière fraîche produite par les plantes en cours de culture. On note pour la variété Charlotte que le poids frais moyen des miniplantes traitées au thiosulfate d'argent est de 184 mg/plante et celui des plantes témoins de 168 mg/plante. Cette différence se révèle beaucoup plus importante avec la variété Matilda. L'écart de poids frais moyen obtenu entre les plantes traitées au thiosulfate d'argent et celles du témoin s'élève à près de 30%. Toutefois, la différence de poids observée dans nos conditions d'expérimentation est incomparable à celle qui est signalée par CHANG et CHAN (1991) pour la variété de pomme de terre ADH69: ces auteurs ont effectivement estimé que le poids moyen des plantes cultivées en présence de thiosulfate d'argent est six fois supérieur à celui des plantes témoins. Ce résultat surprenant pourrait être dû à la sensibilité variétale et aux conditions de culture pratiquées par ces auteurs.

## Conclusions

Les premiers résultats obtenus au cours de cette étude montrent que le thiosulfate d'argent, en intervenant comme inhibiteur de l'éthylène, peut contribuer à améliorer la qualité des miniboutures de pomme de terre cultivées *in vitro*. Sur le plan pratique, l'effet bénéfique du thiosulfate d'argent peut se traduire par l'expression optimale de l'appareil végétatif, vigoureux, constitué de feuilles bien développées et de nombreux bourgeons utilisables, conditions importantes pour la production de plantes à fort développement, indispensable pour réussir les opérations de reproduction massive et/ou de tubérisation à large échelle.

## Bibliographie

- BEYER E. M. Jr., 1976. A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol.* **58**, 268-271.
- CAMERON A. C. and REID M. S., 1981. The use of silver thiosulfate anionic complex as a foliar spray to prevent flower abscission of *Zygocactus*. *Hortic. Sci.* **16**, 761-762.
- COLLET G. F., 1985. Enracinement amélioré lors de la production *in vitro* de rosiers. *Rev. suisse Vitic., Hort., Arboric.* **17** (4) 259-263.
- CHANG H. H. and CHAN M. T., 1991. Improvement of potato (*Solanum tuberosum* L.) transformation efficiency by *Agrobacterium* in the presence of silver thiosulfate. *Bot. Bull. Acad. Sinica* **32**, 63-70.
- HULME J. S., HIGGINS E. S. and SHIELDS R., 1992. An efficient genotype-independent method for regeneration of potato plants from leaf tissue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **31**, 161-167.
- HUSSEY G. and STACEY N. J., 1984. Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany* **53**, 565-578.
- LE C. L., 1991. Aspects pratiques de la micropropagation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Rev. suisse Agric.* **23** (6), 357-358.

GEORGE E. F. and SHERRINGTON P. D., 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., Eversley, Basingstoke, Hants (England). ISBN 0-9509325-0-7, 709 p.

MADIC P., PERRINEC P. et FRANÇOIS J., 1979. Une observation importante pour la conduite des cultures *in vitro* de pomme de terre. *La Pomme de terre française* **390**, 13-17.

PARUPS E. V., 1975. Chemical modification of ethylene response in plants. *Acta Hort.* **41**, 143-158.

PERI A., AVIV D. and GALUN E., 1988. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene. *Plant Cell Reports* **7**, 403-406.

## Summary

**The effect of silver thiosulfate on the growth of potato cultivated *in vitro***

In this study, the effect of silver thiosulfate on the growth of *in vitro* potato miniplants was examined. As inhibitor of ethylene, the silver thiosulfate allows the growth of plants having high status of development. These are necessary for the large scale micropropagation.

## Zusammenfassung

**Der Einfluss von Silberthiosulfat auf den Wachstum von *in vitro* kultivierten Kartoffelpflänzchen**

In diesem Artikel wird der Einfluss von Silberthiosulfat auf den Wachstum von *in vitro* kultivierten Minikartoffelpflänzchen. Silberthiosulfat ermöglicht, als Äthyleninhibitionsmittel, Wachstum von stark entwickelten Pflanzen, die für die Micro-Vermehrung erforderlich sind.

## Le compost et les boues d'épuration en agriculture: aussi en français!

Le classeur édité au mois d'août dernier par la Station fédérale de recherches en chimie agricole et sur l'hygiène de l'environnement (FAC) à Liebefeld, contenant toutes les instructions et recommandations dans le domaine des engrais à base de déchets est maintenant aussi disponible en français. Pour mémoire, le classeur contient des instructions indispensables destinées aux preneurs de boues et de compost (agriculteurs, paysagistes), aux exploitants d'installations de compostage et de stations d'épuration, aux laboratoires d'analyse, aux vulgarisateurs et aux autorités cantonales.

Le classeur ainsi que les documents qui le composent pris séparément peuvent être commandés dès à présent par écrit auprès de l'Office central fédéral des imprimés et du matériel (OCFIM), 3000 Berne. Les Services cantonaux pour la protection des eaux et de l'environnement sont en mesure de donner de plus amples renseignements.

Pour de plus amples informations, s'adresser à:

Toni Candinas (031/323 83 81) et Thomas Kupper (031/323 83 21), Station fédérale de recherches en chimie agricole et sur l'hygiène de l'environnement (FAC), 3097 Liebefeld-Berne.

# ORGE d'AUTOMNE

## Astrid

Obtenteur

Bayer. Pflanzenzuchtgesellschaft, Elisabethenstrasse 3, D-8000

München 40

Weihst. St. 8264 / Weihst. St. 5907

1995

Delley Semences et Plantes

case postale 16

CH - 1567 Delley

Ascendance

Inscription sur la liste officielle

Représentant

### 1. Caractères morphologiques

Epi : 2 rangs  
 glume: égale au grain  
 Grain : grain nu: beige  
 pilosité de la baguette: longue  
 Autres caractères : coloration des nervures du grain: faible

### 2. Caractères agronomiques

Rendement: moyen à bon  
 Résistance à la verse: bon  
 Précocité à l'épiaison: précoce  
 Poids de 1000 grains: bon à très bon  
 Hauteur des plantes: moyenne  
 Rendement au triage: bon

### 3. Caractères technologiques

Poids à l'hectolitre : bon  
 Teneur en protéine: moyenne à bonne  
 Teneur en cellulose: basse à moyenne

### 4. Résistances

Oïdium: moyenne  
 Rhynchosporiose: moyenne à bonne  
 Helminthosporiose: moyenne à bonne  
 Rouille naine: moyenne

Astrid est une variété d'orge d'automne à 2 rangs. Son rendement est moyen mais sa résistance à la verse est bonne. La bonne formation de son grain lui garantit un bon poids à l'hectolitre et un très bon poids de 1000 grains. Sa résistance aux maladies cryptogamiques situe Astrid dans la moyenne des variétés de notre assortiment.

### Rendement (20 essais de 1992 à 1994)

Variétés	Rendement relatif			
	1992	1993	1994	1992 à 1994
Triton	100,0 (= 65,7 q/ha)	100,0 (= 65,8 q/ha)	100,0 (= 58,7 q/ha)	100,0 (= 64,0q/ha)
Express	101,5	106,9	105,8	104,7
Manitou	118,0	109,9	104,7	111,6
Planta	106,2	111,1	103,0	107,5
Fakir	113,5	110,1	101,2	109,3
Baraka <sup>1</sup>	98,2	101,0	93,5	98,2
<b>Astrid<sup>1</sup></b>	<b>106,8</b>	<b>107,5</b>	<b>95,5</b>	<b>104,5</b>

### Caractères agronomiques

Variétés	Résistance à la verse note	Hauteur des plantes cm	Epiaison +/- jours	Rendement au triage %	Poids de 1000 grains g	Poids à l'hectolitre kg	Aspect du grain note	Teneur en protéine NIR, %	Cellulose brute g/kg MS <sup>2</sup>
Triton	3,5	111,7	0,0	89,4	43,3	63,7	4,4	10,2	53
Express	2,3	99,6	-0,2	89,2	43,8	63,4	4,4	10,3	51
Manitou	3,6	98,0	-2,0	87,7	46,5	65,0	4,3	10,4	53
Planta	2,8	104,3	-1,3	91,4	40,7	64,6	4,7	10,5	42
Fakir	3,1	99,8	-2,7	90,6	40,3	66,3	4,6	10,2	48
Baraka <sup>1</sup>	1,7	93,1	-3,0	96,0	49,4	67,9	3,2	11,2	46
<b>Astrid<sup>1</sup></b>	<b>1,8</b>	<b>98,8</b>	<b>-0,9</b>	<b>96,2</b>	<b>52,3</b>	<b>66,6</b>	<b>2,9</b>	<b>11,0</b>	<b>38</b>

### Résistance aux maladies

Variétés	Résistances				Etat après l'hiver	Etat sanitaire du feuillage
	oïdium plein champ	rouille brune	helminthosporiose	rhynchosporiose		
Triton	5,9	3,0	4,3	3,3	2,3	6,8
Express	2,9	2,0	3,1	3,0	2,7	4,2
Manitou	2,4	3,0	3,0	2,9	2,4	4,7
Planta	2,1	3,0	3,1	2,9	3,0	4,2
Fakir	2,5	5,0	3,8	3,5	2,2	5,8
Baraka <sup>1</sup>	2,5	3,0	3,1	4,2	3,0	5,0
<b>Astrid<sup>1</sup></b>	<b>3,3</b>	<b>2,0</b>	<b>2,9</b>	<b>3,1</b>	<b>2,4</b>	<b>4,2</b>

Note : 1 = très bonne; 9 = très mauvaise

<sup>1</sup> = variétés à 2 rangs

<sup>2</sup> = résultats de 1993

## Régénération *in vitro* de la pomme de terre cultivée (*Solanum tuberosum* L.)

C. L. LÊ, L. NOWBUTH, S. HEDIGER et G. F. COLLET

Station fédérale de recherches en production végétale de Changins, CH-1260 Nyon

### Résumé

Des plantes de pomme de terre cultivée (cvs. Bintje et Charlotte) sont régénérées *in vitro* à partir de disques de tubercules. La formation de bourgeons adventifs sur ces disques est fortement influencée par l'origine, la taille, ainsi que par le génotype des explants. L'examen histologique montre que les foyers méristématiques sont initiés au niveau du parenchyme vasculaire, notamment le tissu associé au phloème, qui s'organise pour donner naissance aux bourgeons adventifs. Les risques d'obtenir des variations sur les plantes régénérées semblent être liés à l'utilisation d'explants de la région corticale qui donnent naissance à un cal précédant la formation de bourgeons adventifs. Ces variations, décelables sur le plan biochimique (isoenzymes) lors de modifications grossières, affectent la morphologie de la plante, la structure du feuillage et le comportement du tubercule au champ.

Le travail présenté ici a été réalisé dans le cadre des actions Cosr 87 et Cosr 822 visant à promouvoir l'utilisation des nouvelles biotechnologies dans la pratique agricole.

### ● Facteurs influençant la régénération de la pomme de terre

Les tubercules de pomme de terre (cv. Bintje et Charlotte), utilisés dans nos essais sont récoltés au champ et leur dormance est levée après un séjour en chambre froide (environ +4 °C).

Ces tubercules sont désinfectés, après un rinçage à l'eau courante, par un triple trempage, d'abord dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant vingt minutes. Puis, après un bref rinçage à l'eau stérile, ils sont transférés dans une solution de Kohrsolin® (Glutaraldéhyde, N, N'-bis-(hydroxyméthyle) Urée (Bode & Co., Hamburg) à 3%, pendant dix minutes, suivie d'un dernier trempage durant dix minutes dans une solution de Benlate® à 1%. Ensuite, ils sont lavés abondamment à l'eau stérile et sont découpés transversalement en fines tranches de 2 à 3 mm d'épaisseur, montrant distinctement les trois différentes parties du tubercule: zone périphérique *cortex*, zone vascularisée (*cambium*) et zone centrale (*moelle*) selon la description de REEVE *et al.* (1969).

A l'aide d'un emporte-pièce stérile, on prélève sur ces tranches des explants d'une taille de 3, 6 ou 16 mm environ situés sur l'une des trois parties constitutives.

Les explants ainsi préparés sont placés dans des boîtes de Pétri contenant 15 ml de milieu de régénération, à raison de 5 à 6 explants par boîte. Les boîtes sont ensuite scellées avec du Parafilm®, afin d'éviter un éventuel dessèchement du milieu nutritif en cours de culture.

Le milieu de régénération est composé de sels minéraux de base de Murashige et

### Introduction

En biotechnologie végétale, il existe plusieurs techniques de régénération, parmi lesquelles certaines peuvent induire des modifications plus ou moins importantes de la morphologie des plantes régénérées. Ce phénomène est déjà connu depuis longtemps sous le nom de **variations somaclonales** (LARKIN et SCOWCROFT, 1981). Celles-ci pourraient être la conséquence du processus de régénération (PHILIPS *et al.*, 1990) et l'effet du conditionnement de la culture de tissus en milieu artificiel (KARP et BRIGHT, 1985; KARP, 1991). D'un côté, ces variations sont perçues comme une source de variabilité intéressante pour les producteurs désirant améliorer la qualité des plantes (EVANS et SHARP, 1986; SHORT, 1990), notamment pour les espèces dont la multiplication s'effectue par voie végétative (KHALID *et al.*, 1989); mais ces variations représentent également une difficulté ma-

jeure lorsqu'on doit régénérer des plantes dites **conformes**, en vue des travaux de transformation en génie génétique (BROWN, 1991).

Dans le domaine de la régénération de la pomme de terre, de nombreux travaux ont été réalisés avec la culture de cals (WANG et HUANG, 1975; AHLUWALIA, 1982), de protoplastes (SHEPARD et TOTTEN, 1977; BOKELMANN et ROEST, 1983; HABERLACH *et al.*, 1985), d'explants foliaires (ROEST et BOKELMANN, 1976; 1980), ou encore avec les tissus de tubercule (LAM, 1977; JARRET *et al.*, 1980).

L'incidence du mode de régénération sur les performances agricoles a été également examinée par RIETVELD *et al.* (1991) et DALE et MC PARTLAN (1992). L'objet de cette étude est de déterminer l'existence des risques de modifications lors de la régénération *de novo* de plantes de pomme de terre *in vitro* et l'influence de celles-ci sur le plan agronomique.

Skoog (M&S). A ce milieu sont ajoutés 1,0 mg/l de thiamine, 0,5 mg/l de pyridoxine, 0,5 mg/l d'acide nicotinique, 100 mg/l de myo-inositol, 30 g/l de saccharose, 0,15 mg/l d'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA), 3,5 mg/l de zéatine (Z) et 0,7% d'agar (Difco, Bacto-Agar). Le pH est ajusté à 5,7 avec du NaOH à 0,1 N avant l'autoclavage à 121 °C (1,1 kg/cm<sup>2</sup> de pression) pendant quinze minutes.

Les cultures sont maintenues dans une chambre de croissance à la température de 23±1 °C de jour et de 18±1 °C de nuit, et sont éclairées selon une photopériode de seize heures par cycle de vingt-quatre heures. L'éclairage, dont l'intensité est d'environ 150  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s au niveau des cultures, est fourni par des tubes fluorescents (Sylvania, Cool White, 215 W). L'humidité relative est de 55-60% dans l'environnement de culture.

### Influence de l'origine de l'explant

Le tableau 1 montre que de nombreux bourgeons adventifs ont été obtenus sur des explants prélevés dans les deux zones périphérique et vascularisée après quatre semaines de culture. On note un fort développement de jeunes pousses feuillées, ayant tendance à la ramification rapide d'axes latéraux, en particulier avec les explants d'origine cambiale.

En revanche, le tissu de la moelle s'est révélé peu propice à la régénération (8%). Nous confirmons ainsi les observations faites par JARRET *et al.* (1980), qui enregistrent 6 à 13% de régénération avec le tissu de la moelle de la variété de pomme de terre Superior.

La faible différence entre les explants provenant de la partie périphérique (80%) et du tissu vascularisé (90%) peut être due à la présence de tissu cambial dans les explants corticaux de 6 mm de diamètre. Pour clarifier les choses, nous les réduisons à 3 mm (tabl. 2). Dans ces conditions, on constate que, s'il n'y a pas de différence significative quant à la capacité de régénération entre les zones corticale et vascularisée, en revanche, la réduction de moitié du taux de régénération de ces deux types de tissu met en évidence le rôle de la taille des explants. Aussi,

**Tableau 1. Apparition de bourgeons adventifs selon la localisation de l'explant sur le tubercule de pomme de terre (cv. Bintje), en culture *in vitro*.**

Explants	Nombre d'explants en culture	Régénération (%) <sup>a</sup>	Nombre de bourgeons utilisables/explant	Durée nécessaire à l'apparition des bourgeons
Cortex	114	80	4,01 ± 0,46	4-5 semaines
Cambium	176	90	4,65 ± 0,46	4 semaines
Moelle	60	8	0,80 ± 0,44	5-6 semaines

<sup>a</sup>Pourcentage d'explants produisant au moins un bourgeon adventif.

**Tableau 2. Influence de la localisation (V: zone vascularisée; C: zone corticale) des disques de 3 mm sur la capacité de régénération.**

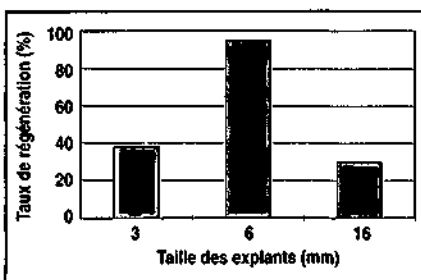
Régénération %			
Bintje		Charlotte	
3V	3C	3V	3C
36%	35%	20%	22%

avons-nous choisi de comparer trois grandeurs d'explants: 3, 6 et 16 mm de diamètre, en choisissant le tissu vasculaire qui donne, d'après nos résultats précédents, la meilleure réponse morphogénétique.

### Influence de la taille des explants

La figure 1 montre le rôle joué par la taille initiale des explants dans la formation des bourgeons à partir de disques de tubercule de pomme de terre.

Les explants de grande taille (16 mm), malgré leur apparence organogène stimulatrice, pourvus de nombreuses protuberances développées à la face supérieure, n'ont permis d'obtenir qu'un faible pourcentage de régénération (30%). De même, ceux dont la taille n'excède pas 3 mm se révèlent également peu capables de former de nouveaux primordia (38%). L'absence de formation de bourgeons adventifs sur les explants de grande taille s'accompagne le plus souvent d'un fort développement de tissu callogène (massifs de tissus non organisés). En revanche, les explants



**Fig. 1. Influence de la taille des explants sur la capacité de régénération du tissu de tubercule de pomme de terre (cv. Bintje).**

de 6 mm de diamètre ont montré un potentiel beaucoup plus important (95%) pour une même durée de culture.

Ce taux élevé de régénération observé avec les explants de 6 mm de diamètre provenant de la variété Bintje confirme les résultats obtenus par JARRET *et al.* (1980) avec le cultivar Superior.

### Influence du génotype

Dans nos conditions d'expérimentation, des différences importantes de pouvoir de régénération ont été observées entre des cultivars différents. Ainsi, le pourcentage de disques donnant naissance à au moins un bourgeon adventif passe de 90% pour la variété Bintje, avec en moyenne 4,65 nouvelles pousses utilisables, à 50% pour la variété Charlotte, produisant en moyenne 1,60 pousses (décompte effectué à partir de 177 explants expérimentés). En outre, le temps nécessaire à la formation de nouvelles pousses est de quatre semaines chez Bintje et de 5 à 6 semaines chez Charlotte.

Par ailleurs, la stabilité génétique du matériel végétal utilisé semble également influencer de manière importante sur le potentiel de régénération des cultivars expérimentés.

Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent effectivement que, sur cinq tubercules pris séparément comme source d'explant, le cultivar Bintje a permis de régénérer beaucoup plus régulièrement des bourgeons adventifs, avec un taux de régénération supérieur à 95%, que la variété Charlotte, dont le pourcentage de bourgeons adventifs néoformés est nettement inférieur. Signalons enfin qu'il existe une grande variabilité dans la capacité de régénération entre les différents tubercules (7,5% à 34%), pour l'ensemble des explants cultivés.

La diminution de la capacité de régénération observée chez la variété Charlotte pourrait être due au génotype cultivé (BRAGDO-AAS, 1977) ou à l'évolution différente de la teneur en phytohormones endogènes (JARRET *et al.*, 1980).

**Tableau 3. Nombre d'explants régénérés à partir de 120 disques de 6 mm de la zone vascularisée (cv. Bintje et Charlotte).**

Cultivars	Nombre de tubercules				
	1	2	3	4	5
Bintje	120	110	119	118	120
Charlotte	9	23	14	19	41

## ● Examen histologique

Afin de pouvoir localiser rapidement, au niveau cellulaire, les premières manifestations susceptibles d'apporter une explication à la différence de comportement entre les deux cultivars Bintje et Charlotte selon le mode de régénération, des examens histologiques ont été réalisés sur des explants de disques de tubercule.

Des explants de tubercules de pomme de terre prélevés sur les tissus périphériques (cortex) et vasculaires (cambium), aux différents moments de la régénération (0, 2, 5, 7, 9, 15, 21 et 35 jours de culture) sont fixés dans une solution de formaldéhyde-acide acétique-alcool (FAA). Après plusieurs lavages dans l'eau déionisée et une déshydratation graduelle, les échantillons sont soumis à une légère infiltration dans un mélange composé de 50% d'Historessin® et de 50% d'éthanol, et sont alors coulés dans 100% d'Historessin®, selon les indications de la firme Reichert-Jung (Heidelberg). Ils sont ensuite découpés au microtome à une épaisseur de 1µm, colorés d'abord par la réaction de l'acide périodique avec le réactif de Schiff (PAS), et contre-colorés au bleu de méthylène ou de toluidine. Les coupes ainsi préparées sont enfin montées dans l'Eukitt® et sont observées au microscope.

En général, la régénération de bourgeons adventifs sur des disques de tubercule de pomme de terre s'initie dans les tissus environnant des zones vasculaires. On note qu'effectivement, après quarante-huit heures de culture, les tissus périvasculaires entrent en division active (fig. 2).

De même, la structure du périoderme se met progressivement en place, notamment dans la partie périphérique de l'explant (fig. 3).

Dès ce moment, de nouvelles cellules en phase de multiplication s'étendent rapidement autour des zones périvasculaires et sont ainsi organisées en foyers méristématiques pour donner naissance à des nodules (méristémoïdes) après une vingtaine de jours de culture. Plus tard (35 jours), ils évolueront en *primordia* caulinaires émergeant de l'explant (fig. 4).

Des observations similaires ont été également rapportées par JARRET *et al.* (1980) sur des explants de tubercule de la variété de pomme de terre Superior. La capacité de former des méristémoïdes s'est exprimée seulement au bout de trente-cinq jours, même si les bourgeons adventifs ne sont visibles qu'après qua-

rante-deux jours de culture. Le retard dans le développement de *primordia* caulinaires semble être dû à la variété et aux conditions d'induction pratiquées par ces auteurs.

Dans nos conditions d'expérimentation, la formation de bourgeons adventifs se situe principalement dans la zone périphérique de l'explant, et de manière asynchrone. Dès lors, des pousses feuillées à divers stades de développement apparaissent sur un même explant.

La formation de *primordia* caulinaires est fortement retardée chez la variété Charlotte au cours du processus de différenciation, à la suite d'une prolifération de tissu callogène (nodules) précédant la mise en place des cellules organogènes responsables des foyers méristématiques (fig. 5).

On relève également que les *primordia* caulinaires ne peuvent être initiés *de novo* que sur des tissus vasculaires, en particulier le phloème; cela demeure valable aussi bien pour la variété Bintje que pour la Charlotte. Toutefois, la mise en place des *primordia* caulinaires a fait appel à une forte concentration de cellules en activité mitotique dans les assises cellulaires corticales et/ou

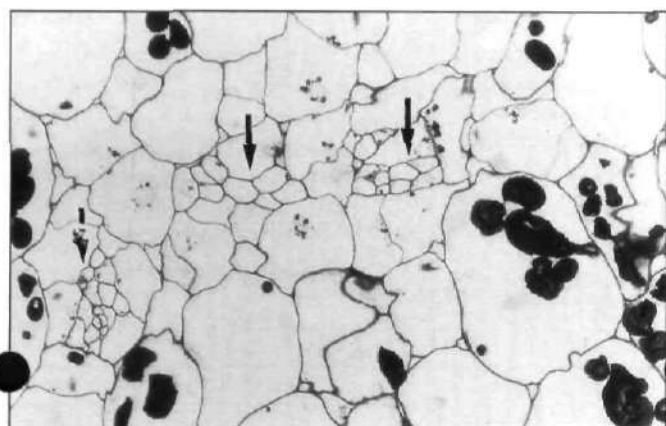


Fig. 2. Coupe transversale d'un explant de tubercule (cv. Bintje) au premier jour de culture (→ = îlots de vascularisation).

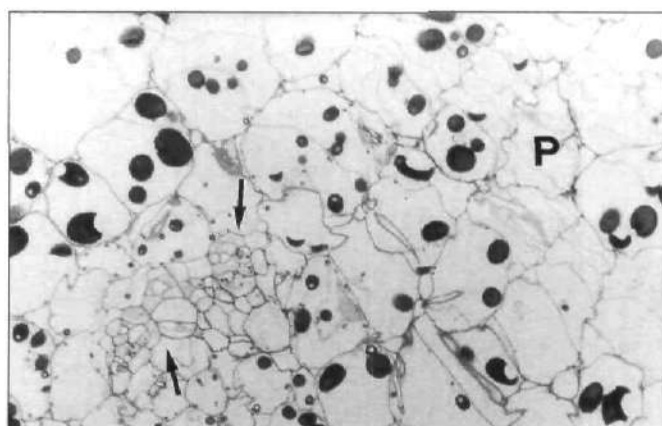


Fig. 3. Coupe transversale d'un explant de tubercule (cv. Bintje) après cinq jours de culture (→ = ébauche de vascularisation). P: périoderme en formation en bordure de l'explant.

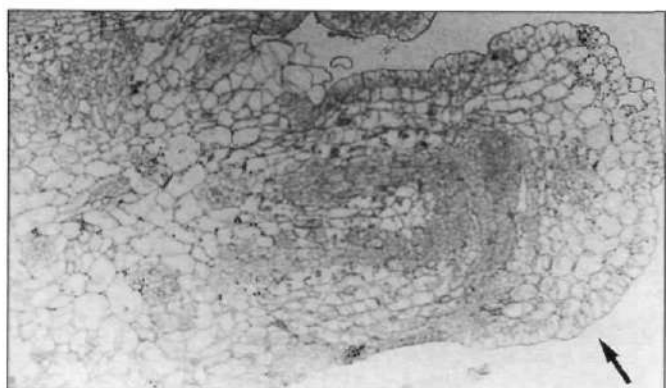


Fig. 4. Coupe transversale d'un explant de tubercule (cv. Bintje) montrant l'émergence d'un *primordium* caulinaire (→).

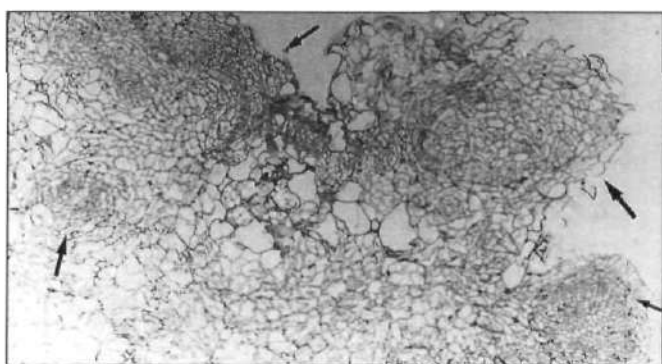


Fig. 5. Coupe transversale d'un explant de tubercule (cv. Charlotte) montrant le développement de nodules de cals (→) durant la régénération.



Fig. 6. Apparition des pousses adventives sur des explants de tubercule (cv. Bintje), après deux mois et demi de culture.

périmédullaires. Il en résulte la formation de méristémoïdes typiques évoluant en pousses adventives ultérieurement (fig. 6).

### • Conformité des plantes régénérées

Le contrôle de la conformité du matériel, régénéré *in vitro* selon le procédé mentionné plus haut, a été réalisé au moyen d'analyses électrophorétiques des systèmes isoenzymatiques (peroxydases) des plantes régénérées *in vitro*, d'une part et, d'autre part, en surveillant leur évolution depuis la sortie des tubes de culture jusqu'à la plantation en plein champ, cela en comparaison avec des plantes multipliées traditionnellement.

### Analyses électrophorétiques

L'utilisation des systèmes isoperoxydases comme marqueurs biochimiques pour identifier les variétés de plantes a été également réalisée pour le pommier (COLLET *et al.* 1991; MANGANARIS et ALSTON, 1993). Pour la pomme de terre, NIETO *et al.* (1990) et LÉ (1994) ont aussi fait mention de l'identification des variétés cultivées en se basant sur le polymorphisme des peroxydases révélées après une séparation isoélectrique.

L'identification des plantes régénérées d'aspect normal et/ou présentant des modifications s'effectue selon la technique décrite (LÉ, 1994).

L'établissement des profils électrophorétiques est réalisé sur la base des isoenzymes (peroxydases) révélées après leur séparation sur gel de polyacryla-

mide. L'annotation des bandes isoenzymes s'effectue à partir du pôle acide (pHi 3,0), pris comme point de départ sur le gel de séparation. Dans le cas présent, la révélation de ces isoenzymes n'a pas permis de mettre en évidence des différences entre les plantes régénérées d'aspect normal et les plantes-témoins. En revanche, pour les plantes montrant une morphologie particulière, par exemple un feuillage panaché, gaufré; des plantes petites ou dépourvues de chlorophylle, des différences notables existent dans la présence ou l'absence de certaines isoenzymes (tabl. 4).

Tableau 4. Profils électrophorétiques des isoperoxydases de quelques morphotypes (cvs. Bintje et Charlotte).

Bande N°	Bintje			Charlotte			
	témoin	panaché	archaïque	témoin	panaché	gaufré	pellé
1	+	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	-	+
3	-	-	-	+	+	-	+
4	+	-	+	-	-	+	-
5	+	+	+	-	-	+	-
6	+	+	+	+	-	+	+
7	-	+	-	+	+	-	-
8	-	+	-	+	+	+	-
9	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	-	-	-	-	+
11	+	+	-	+	+	-	-
12	+	+	+	+	+	-	+
13	-	+	-	-	+	-	-
14	+	+	+	-	+	-	-
15	+	+	-	+	-	+	+
16				+	+	-	-
17				+	+	+	+

+ = présence, - = absence.

### Transfert en serre et production de tubercules

Le transfert en serre des plantes de pomme de terre régénérées *in vitro* a été réalisé après une période d'acclimatation de 2 ou 3 jours, dans des conditions de brouillard sec (*Fog system*), en pots de 12 cm de diamètre contenant du substrat de culture ASB®, afin de leur permettre de poursuivre leur cycle de végétation.

D'une manière générale, l'apparition de modifications morphologiques des plantes régénérées semble être plus fréquente avec les explants provenant de la zone corticale qu'avec ceux de la zone vascularisée (fig. 7).

Ce fait pourrait être expliqué, dans nos conditions d'expérimentation, par une régénération issue de cals du tissu cortical, révélée par l'examen histologique. Ces cals sont connus pour être des sources d'aberrations (GEORGE, 1993) contrairement au tissu vascularisé produisant directement des *primordia*.

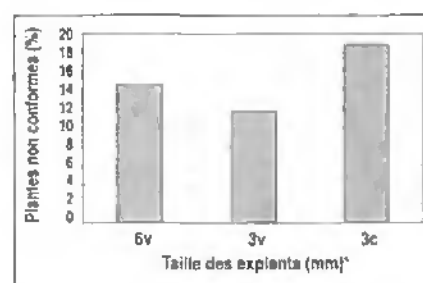


Fig. 7. Pourcentage de plantes non conformes apparues au cours de la régénération *in vitro* (cv. Bintje). \* V = zone vascularisée; C = zone corticale.



Fig. 8a. Plantes régénérées *in vitro* montrant différents morphotypes (cv. Bintje).



Fig. 8b. Plantes régénérées *in vitro* (cv. Charlotte) montrant des variations du feuillage.

Parmi ces modifications, certaines sont transitoires, comme la juvénilité des plantes régénérées caractérisée par une structure du limbe rappelant celle des plantes issues de semis; tandis que l'aspect gaufré du feuillage, le raccourcissement des entre-nœuds, ou encore la panachure de l'appareil végétatif semblent permanents et seraient des variations somaclonales (fig. 8a et b).

Ces faits confirment les observations de WHEELER *et al.* (1985), qui ont également constaté des modifications du feuillage et surtout du port des plantes régénérées de la variété Myatts Ashleaf, au cours de la première génération en terre.

Pour ce qui est de la croissance, à l'exception des plantes présentant déjà des traits non conformes, nous n'avons pas remarqué, au cours de la culture en serre, de différence notable entre les plantes régénérées d'aspect normal, provenant d'explants de la zone corticale ou de la zone vascularisée; toutefois, l'examen visuel de tubercules obtenus après une première génération en serre, a montré qu'il existe une proportion non négligeable de tubercules d'apparence non conforme (tabl. 5), et cela pour les deux types d'explants.

La déformation du tubercule et l'enfoncement des bourgeons axillaires sont les principaux caractères apparents des tubercules non conformes. Dans nos conditions d'expérimentation, la relation est difficile à établir entre l'état physiologique des plantes régénérées et ce phénomène de production de tubercu-

les d'apparence non conforme à la première génération en serre. Des conditions de culture réalisées dans un milieu inadéquat pourraient être à l'origine de ces modifications. Aussi serait-il judicieux de poursuivre le contrôle du comportement des plantes de pomme de terre issues de matériel régénéré *in vitro* dans les conditions de plein champ (COLLET *et al.*, 1993).

#### Culture en plein champ de matériel régénéré *in vitro*

Des tubercules (cv. Bintje et Charlotte) d'un calibre 20-35 mm, issus de plantes régénérées *in vitro*, de plantes micropropagées par bourgeons axillaires *in vitro* et de plantes-témoins multipliées traditionnellement, sont transférés en plein champ après avoir subi une levée de dormance à +4 °C et une prégermination traditionnelle. La conduite des cultures s'effectue en respectant les mêmes contraintes qu'impose la pratique agricole (fertilisation, traitements antifongiques et parasitaires, etc.), durant toute la période de végétation. De même, la qualité sanitaire du matériel expérimenté est contrôlée, à chaque nouvelle plantation, par dépistage des virus S (PVS), X (PVX) et Y (PVY) à l'aide du test ELISA (GUGERLI, 1979).

#### Morphologie des plantes régénérées *in vitro*

Des observations effectuées au cours de la période de végétation ont révélé qu'il existe, chez les plantes régénérées



Fig. 9. Plante de pomme de terre (cv. Bintje) montrant un feuillage déformé.

*de novo* par bourgeons adventifs, des types de plantes d'apparence normale ressemblant à celui des plantes-témoins et d'autres types qui présentent des modifications importantes portant sur: la qualité du feuillage (fig. 9); la forme du limbe, en particulier chez la variété Bintje; le coloris de l'appareil végétatif des plantes-témoins et l'aspect panaché du limbe montrant des parties dépourvues de chlorophylle déjà apparentes lors de la préparation des tubercules en serre (tabl. 6).

#### Morphologie des plantes micropropagées

Les plantes provenant de tubercules reproduits *in vitro* par bourgeons axillaires n'ont pas présenté de différences avec les plantes-témoins, excepté le caractère épais du feuillage que l'on retrouve sur la quasi-totalité des plantes en place. Les individus micropropagés *in vitro* ont montré une parfaite régularité quant à la croissance de l'appareil végétatif, assurant ainsi la reproductibilité du clone par ce mode de multiplication, ce qui n'est pas le cas avec les plantes régénérées *in vitro* par néoformation de bourgeons adventifs.

Tableau 5. Production en serre de tubercules de pomme de terre à partir de plantes régénérées *in vitro*.

Origine de l'explant	Nombre de plantes cultivées	Tubérisation (%)	Nombre de plantes produisant des tubercules	
			conformes	non conformes
Cortex	121	100	55	66
Vascularisé	125	100	63	62

## Morphologie des tubercules récoltés

Au cours de la culture en champ, nous avons obtenu fréquemment des tubercules non conformes (fig. 10), en particulier avec les plantes régénérées par bourgeons adventifs, comparativement aux tubercules produits conventionnellement. L'examen du critère «index-tubercule» (rapport longueur/diamètre du tubercule), après trois passages consécutifs au champ (fig. 11), a effectivement montré que les tubercules provenant de matériel régénéré possèdent un index-tubercule plus grand que celui qui est obtenu avec des plantes-témoins. Cependant, cette différence faiblement significative s'estompe au cours des cultures successives, comme on l'a remarqué avec les essais de plantes transgéniques résistantes au PVY (COLLET *et al.* 1993).

L'index-tubercule des plantes micropropagées demeure identique à celui des plantes-témoins. A ce propos, des relevés biométriques ont montré qu'il existe une tendance générale au déplacement de la moyenne des index-tubercules is-



Fig. 10. A droite, tubercule de pomme de terre non conforme (cv. Charlotte).

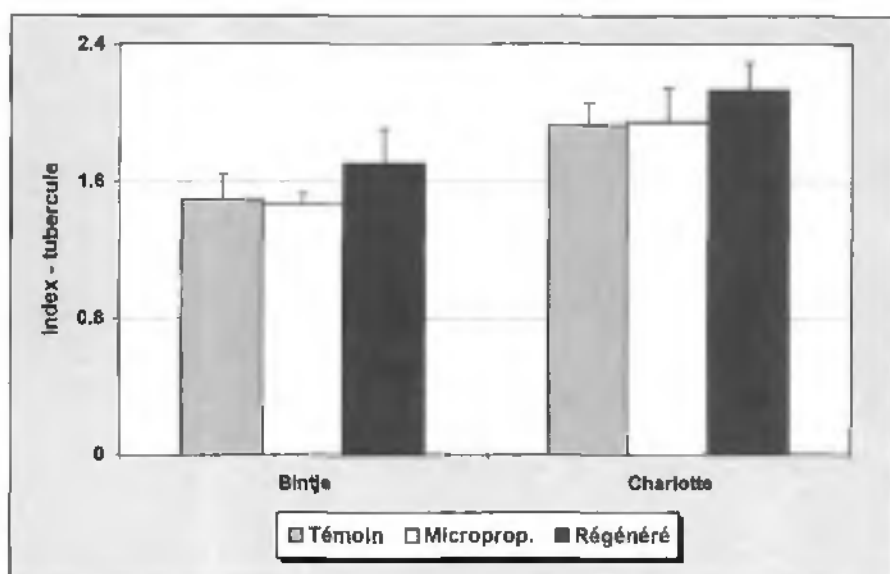


Fig. 11. Index-tubercule des variétés Bintje et Charlotte.

sus de plantes régénérées (valeurs plus élevées) par rapport à celles du témoin (fig. 12).

Ce même phénomène existe également chez la variété Charlotte (fig. 13), avec cependant une différence moins importante que celle qui a été observée chez la variété Bintje.

Les observations que nous avons effectuées à propos des différents index-tubercules obtenus pour les plantes régénérées et les plantes-témoins corroborent les résultats des travaux antérieurs. C'est

ainsi que RIETVELD *et al.* (1991) ont signalé, chez la variété Superior, que 15 sur 22 des caractères observés ont montré une grande variation par rapport aux plantes-témoins. Ces résultats sont également confirmés par DALE et MCPARTLAN (1992) avec le cultivar Désirée.

## Production de tubercules

L'influence de la source de matériel végétal sur la production de tubercules au champ est présentée dans le tableau 6.

Tableau 6. Production de tubercules (cv. Bintje et Charlotte).

Cultivars		Témoin	Micropropagé	Régénéré
Bintje	A	22,35 ± 1,09	22,00 ± 1,00	20,00 ± 0,96
	B	66,40 ± 0,22	61,00 ± 0,07	56,46 ± 0,27
Charlotte	A	15,00 ± 0,81	19,10 ± 0,92	20,00 ± 0,72
	B	74,00 ± 0,04	62,00 ± 0,13	55,10 ± 0,14

A: nombre de tubercules/plant; B: poids frais (g)/tubercule.

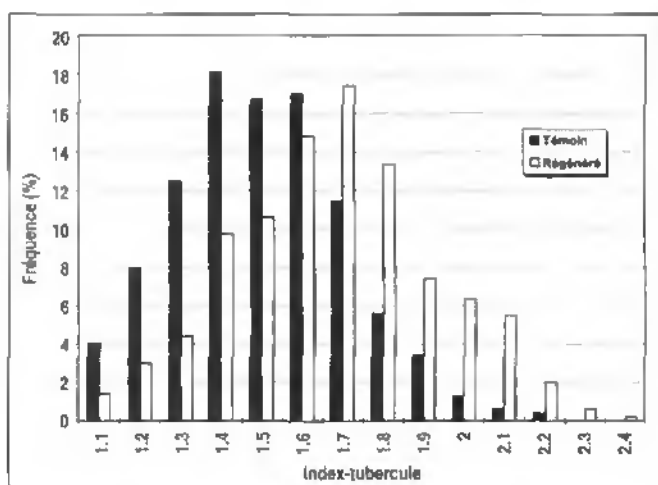


Fig. 12. Répartition des index-tubercules de la variété Bintje.

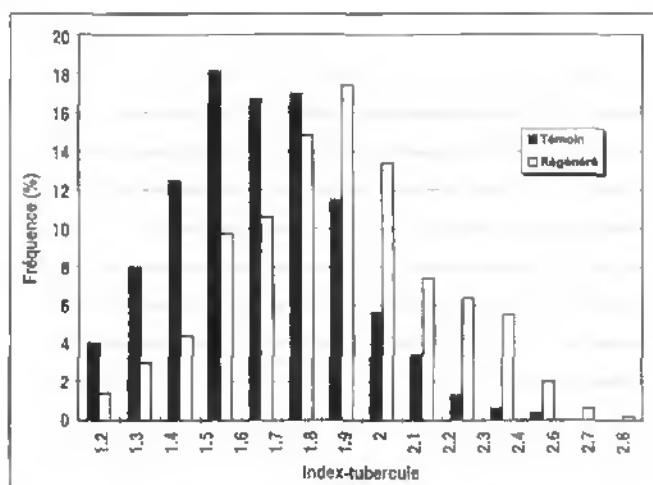


Fig. 13. Répartition des index-tubercules de la variété Charlotte.

**Tableau 7. Taux de variations observées au cours de la régénération *in vitro* et en conditions de culture de plein champ.**

	Bintje	Charlotte
Nombre d'explants initiaux	146	153
Nombre de plantes régénérées utilisables	211	227
Nombre de plantes non conformes au sevrage	15 (7,1%)	33 (14,5%)
Nombre de plantes cultivées au champ	120	120
Nombre de plantes non conformes apparues au champ	18 (15%)	12 (10%)

Chez la variété **Bintje**, on constate une forte production de tubercules, notamment avec les plantes-témoins (22,35 tubercules/pl.) et les plantes micropropagées (22 tubercules/pl.), alors que les plantes régénérées en produisent moins (20 tubercules/pl.). Lorsqu'on considère le rendement sous forme de masse moyenne des tubercules par plant récolté, seules les plantes micropropagées possèdent une masse (61 g) comparable à celle qu'on obtient avec les témoins (66 g). Les plantes régénérées ont en revanche une production relativement faible (56 g). Cette différence pourrait être expliquée dans notre cas par une forte proportion de petits tubercules (environ 54%) de calibre inférieur à 35 mm.

Chez la variété **Charlotte**, le nombre de tubercules par plant est plus élevé avec le matériel micropropagé et régénéré (tabl. 7.), par rapport au témoin. Toutefois, si l'on tient compte du rendement sous forme de la masse moyenne des tubercules récoltés par plant, les mêmes constatations que pour la variété **Bintje** demeurent valables, avec, néanmoins, un fléchissement du poids moyen des tubercules de la variante micropropagée (62 g) par rapport à celui des plantes-témoins (74 g). Des résultats similaires ont été également obtenus par DALE et MCPARTLAN (1992). Ces auteurs ont rapporté que les plantes régénérées *in vitro* ont produit un nombre moyen et une masse moyenne des tubercules inférieurs à ceux des plantes-témoins. Par ailleurs, BRIGHT *et al.* (1986) ont signalé pour certains traits particuliers, comme par exemple la sensibilité à la gale commune, un comportement des plantes régénérées très différent de celui des témoins.

## Conclusion

Le but de cette étude était d'apporter des informations concernant la régénération *in vitro* de la pomme de terre cultivée en vue de travaux de transformation génétique. L'analyse des fac-

teurs de la réussite de la régénération nous permet de mettre en évidence les points suivants:

- le développement *de novo* de bourgeons adventifs est fortement influencé par l'origine, la taille et le caractère génotypique de l'explant initial;
- l'initiation des foyers méristématiques a lieu très tôt dans les régions vascularisées, notamment dans le phloème, permettant de former des *primordia* caulinaires qui évoluent ultérieurement en bourgeons adventifs;
- le risque d'obtenir des plantes non conformes est plus important lorsqu'on utilise des explants issus de la région corticale, nécessitant un stade de développement de cal, contrairement aux explants prélevés dans la région vasculaire;
- des différences notables sur le plan biochimique (isoenzymes) sont décelables sur les plantes présentant également des modifications apparentes grossières;
- les variations entraînées par la régénération *de novo* se traduisent, dans le présent travail, par des modifications affectant la morphologie de la plante, la structure du feuillage, ainsi que le poids et la forme du tubercule.

**Compte tenu des résultats obtenus dans cette étude, il nous semble nécessaire d'attirer l'attention sur le risque de variation du génotype que comporte la régénération, en particulier lors de travaux par génie génétique, afin d'éviter de confondre les modifications imputables à l'une ou à l'autre de ces méthodes.**

## Remerciements

Nous remercions vivement MM. D. THOMAS, F. TSCHUY, J. P. DE JOFFREY, C. FIVAZ, J. M. TORCHE et J. P. DUTOIT pour leur aide technique très appréciée et l'Action COST-822 pour son appui financier.

## Bibliographie

- AHLOOWALIA B. S., 1982. Plant regeneration from callus culture in potato. *Euphytica* 31, 755-759.
- BOKELMANN G. S. and ROEST S., 1983. Plant regeneration from protoplasts of potato (*S. tuberosum* cv. Bintje) *Z. Pflanzenphysiol.* 109, 259-265.
- BRAGDO-AAS M., 1977. Regeneration of plants from callus potato tubers. *Acta Hortic.* 78, 133-137.
- BRIGHT S. W. J., OOMS G., FOULGER D., KARP A. and EVANS N., 1986. Mutation and tissue culture. In: Plant tissue culture and its agricultural applications. Lyndsey A. Withers, P. G. Alderson - Ed. Butterworths (1986), 431-449.
- BROWN P. T. H., 1991. The spectrum of molecular changes associated with somaclonal variation. *Newsletter IAPTC* 66, 14-25.
- COLLET G. F., LÉ C. L. and NOWBETH L., 1991. Isozyme characterization of apple rootstock M 9. Abstract Cost 87/Shoot regeneration - Biochemical markers, Geneva, April 1991. In: Plant *in vitro* Culture - Report of the 1991 activities, edit. Fionnbharr O'Riordain, 21-24.
- COLLET G. F., MALNOE P., FARINELLI L. et REUST W., 1993. Pommes de terre transgéniques au champ. Contrôle de la résistance contre les virus PVY de la pomme de terre *Bintje* transformée génétiquement *Revue suisse Agric.* 25, 373-381.
- DALE P. J. and MCPARTLAN H. C., 1992. Field performance of transgenic potato compared with controls regenerated from tuber discs and shoot cuttings. *Theor. Appl. Genet.* 84, 585-591.
- EVANS D. A. and SHARP W. R., 1982. Application of tissue culture technology in the agricultural industry. In: Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry. Eds. Tomes D. T., Ellis B. E., Harney P. M., Kasha K. J., Peterson R. L., University of Guelph, Ontario, Canada, 209-231.
- EVANS D. A. and SHARP W. R., 1986. Applications of somaclonal variation. *Biotechnology* 4, 528-532.
- GEORGE E. F., 1993. Variation in cultures and regenerated plants. In: Plant propagation by tissue culture - Part 1. Exegetics Ltd., Edington, Wilts (England), 67-94.
- GUGERLI P., 1979. Le test immuno-enzymatique (ELISA) et son application pour le diagnostic rapide des viroses de la pomme de terre. *Revue suisse Agric.* 11 (6), 253-260.
- HABERLACH G. T., COHEN B. A., REICHERT N. A., BAER M. A., TOWILL L. E. and HELGESON J. P., 1985. Isolation, culture and regeneration of protoplasts from potato and several related solanum species. *Plant Sci.* 39, 67-74.
- HEDIGER S., 1994. Analyses structurales et physiologiques de la régénération de bourgeons adventifs à partir d'explants de tubercule de pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.) Travail de diplôme. Institut de Biologie et de Physiologie végétales de l'Université de Lausanne, 48 p.
- JARRET R. L., HASEGAWA P. M. and ERICKSON H. T., 1980. Factors affecting shoot initiation from tuber discs of potato *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 49, 177-184.
- KARP A., 1991. On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford survey of plant Molecular and cell biology* 7, 1-58.
- KARP A., JONES M. G. K., FOULGER D., FISH N. and BRIGHT S. W. J., 1989. Variability in potato tissue culture. *Am. Potato J.* 66, 669-684.
- KARP A. and BRIGHT S. W. J., 1985. On the causes and origins of somaclonal variation. *Oxford survey of plant molecular and cell biology* 2, 199-235.
- KHALID N., DAVEY M. R. and POWER J. B., 1989. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of potential commercial value. *Scientia Horticulturae* 38, 278-294.

- LAM S. L., 1977. Plantlet formation from potato tuber discs *in vitro*. *Am. Potato J.* 54, 465-468.
- LARKIN P. J. and SCOWCROFT W. R., 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60, 197-214.
- LÉ C. L., 1994. Apport de l'électrophorèse dans l'identification des variétés de pomme de terre cultivées en Suisse. *Revue suisse Agric.* 26 (6), 373-379.
- MANGANARIS A. G. and ALSTON F. H., 1993. Peroxydase isoenzyme genes in the identification of apple cultivars and *Malus* species. *Journal of Horticultural Science* 68 (5), 775-781.
- NIETO A. R., SANCHO A. C., BARROS M. V. and GORGE J. L., 1990. Peroxydase zymograms at constant and gradient pH electrophoresis as an analytical test in the identification of potato varieties. *J. Agric. Food Chem.* 38 (12), 2148-2153.
- PHILIPS R. L., KAEPLER S. M. and PESCHKE V. M., 1990. Do we understand somaclonal variation? In: Progress in plant cellular and molecular biology. Proceedings of the VIIth international congress on plant tissue and cell culture, Amsterdam, eds. Nijkamp H. J. J., Van der Plas L. H. W., Van Aartrijk J., Kluwer academic publishers, 131-141.
- RIETVELD R. C., HASEGAWA P. M. and BRESSAN R. A., 1991. Somaclonal variation in tuber disc-derived populations of potato. I. Evidence of genetic stability across tuber generations and diverse locations. *Theor. Appl. Genet.* 82, 430-440.
- REEVE R. M., HAUTALA E. and WEAVER M. L., 1969. Anatomy and compositional variation within potatoes. II. Phenolics, enzymes and other minor components. *Am. Potato J.* 46, 374-386.
- ROEST S. and BOKELMANN G. S., 1976. Vegetative propagation of *Solanum tuberosum* L. *in vitro*. *Potato Res.* 19, 173-178.
- ROEST S. and BOKELMANN G. S., 1980. *In vitro* adventitious bud techniques for vegetative propagation and mutation breeding of potato (*S. tuberosum* L.). 1. Vegetative propagation *in vitro* through adventitious shoot formation. *Potato Res.* 23, 167-181.
- SHEPARD J. F. and TOTTEN R. E., 1977. Mesophyll cell protoplasts of potato. *Plant Physiol.* 60, 313-316.
- SHORT K. C., 1990. Application of *in vitro* techniques for the production and the improvement of horticultural plants. In: The impact of biotechnology in agriculture. Eds. Sangwan R. S. and Sangwan-Norreel B. S., Kluwer academic publishers, 15-27.
- WANG P. J. and HUANG L. C., 1975. Callus culture from potato tissues and the exclusion of potato virus X from plants regenerated from shoot tips. *Can. J. Bot.* 53, 2565-2567.
- WHEELER V. A., EVANS N. E., FOULGER D., WEBB K. J., KARP A., FRANKLIN J. and BRIGHT S. W. J., 1985. Shoot formation from Explant Cultures of fourteen Potato Cultivars and studies of the Cytology and Morphology of regenerated plants. *Annals of Botany* 55, 309-320.

## Summary

### *In vitro* regeneration of the commonly grown potato (*S. tuberosum* L.)

Commonly grown potato plants (cvs. Bintje and Charlotte) were regenerated *in vitro* using tuber discs explants. Adventitious buds formation was markedly influenced by the origin, the size and the genotype of the explants as well. Histological analysis shows that the formation of meristematic nests were initiated in the vascular parenchyma, especially in the tissue surrounding the phloem, which is developed into the formation of adventitious shoots. The risks of variation obtained on these regenerated plants seem to be related to the use of cortical explants developing callus preceding the formation of adventitious buds. These variations revealable through biochemical aspect (isoenzymes) for gross modifications, affect the morphology of the plant, the structure of the leaf and the behaviour of the tuber under field conditions.

## Zusammenfassung

### *In-vitro*-Regeneration von kultivierten Kartoffelpflanzen (*S. tuberosum* L.)

Kultivierte Kartoffelsorten (cvs. Bintje und Charlotte) wurden mit Hilfe von Kartoffelknollenscheiben *in vitro* regeneriert. Die Adventivprossbildung auf den Scheiben wurde von der Herkunft, von der Grösse sowie vom Genotyp des Explantates stark beeinflusst. Die histologische Untersuchung zeigt, dass sich die Meristemnester auf den Parenchymgefässen bilden, u. a. um den Bast herum, welcher sich organisiert, um Adventivprossen zu entwickeln. Die Risiken der an den regenerierten Pflanzen vorgefundenen Variationen scheinen an die Verwendung der Explantate der Cortexregion via eine Kallusentwicklung, welche der Adventivprossbildung vorangeht, gebunden zu sein. Diese Variationen, welche biochemisch mit Hilfe der Isoenzyme für grosse Modifikationen nachweisbar sind, beeinflussen die Morphologie der Pflanze, die Struktur der Blätter sowie das Verhalten der Knolle im Feld.

Des articles fondamentaux, des fiches techniques et de variétés, tirés de nos publications, sont actuellement à votre disposition auprès du Service Information-Documentation de la Station fédérale de recherches agronomiques de Changins, CH-1260 Nyon, tél. 022/363 41 51 ou 363 41 54. Une réduction de prix est consentie pour les commandes groupées d'un même titre: 10% des 100 ex. Attention, certaines de ces publications sont en nombre limité. Pour les commandes inférieures à Fr. 10.-, en joignant le paiement en timbres-poste à votre demande, vous économiserez les frais d'expédition.

## NOUVEAU:

- | N <sup>os</sup> |   | Fr.  |
|-----------------|---|------|
| •               | <b>Le Guide Arbo de Changins 1997-1999</b> (avec supplément viticole 92 pages)  | 13.— |
| •               | <b>Principaux cépages cultivés en Suisse</b> – Portfolio de 29 fiches indépendantes. Format A4 en couleurs  | 16.— |
| •               | <b>Le Guide Viti de Changins 1996-1998</b> (88 pages)   | 9.—  |
| •               | <b>Données de base pour la tumure des grandes cultures et des herbages</b> (64 pages)   | 9.—  |
| 182             | <b>Supplément «Le guide Viti de Changins 1997»</b> O. Viret, Ch. Linder et J.-Ph. Mayor   | 3.50 |
| 181             | <b>Empreintes des machines lors du travail du aol</b> (8 pages) – M. Müller, W. Schenker et W. G. Stürny  | 2.50 |
| 180             | <b>Description des variétés de maïs du catalogue national 1997</b> (6 pages) – J.-F. Collaud et M. Menzi  | 1.60 |
| 179             | <b>Etude des relations entre les caractéristiques des herbages et celles du lait, de la crème et du fromage de type L'Eti-vaz ou Gruyère</b> (12 pages) – B. Jeangros, J. Troxler, D. Conod, J. Schehovic, J. O. Bosset, U. Bütokater, R. Gauch, R. Manáca, J.-P. Pauchard et R. Sieber | 3.50 |
| 178             | <b>Mélanges atandard pour la production fourragère Révision 1997-2000</b> (12 pages) – E. Mosimann, J. Lehmann, E. Rosenberg et P. Bassetti   | 3.50 |
| 177             | <b>Liste 1997-1998 des variétés recommandées de plantes fourragères</b> (8 pages) – E. Mosimann, C. Chalet, J. Lehmann, H. U. Briner et P. Bassetti   | 1.60 |
| 178             | <b>La faune des arthropodes épigés du domaine de Changins</b> (8 pages) – J. O. Derron et G. Goy  | 2.50 |
- \* Aussi disponible en allemand. Deutsche Fassung nach Wunsch.

Il est important que votre nom et votre adresse soient écrits en caractères bien lisibles sur votre commande!

## Culture *in vitro* du genépi blanc (*Artemisia umbelliformis* Lam.)

C. L. LÉ, Station fédérale de recherches en production végétale de Changins, CH-1260 Nyon

### Résumé

Une technique de micropropagation à partir d'explants de nœuds a été développée pour des clones de genépi blanc (*Artemisia umbelliformis* Lam.) sélectionnés. La prolifération de pousses *in vitro* a été réalisée en cultivant des segments de nœuds sur un milieu de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné de 0,88  $\mu\text{M}$  de BA et de 2,0  $\mu\text{M}$  d'AIA. La formation de racines adventives a été obtenue en transférant les jeunes pousses sur un milieu dépourvu d'hormones. Les plantes racinées se sont établies avec succès en terre après une période de sevrage. Aucune variation morphologique n'a été relevée sur les plantes propagées *in vitro* cultivées en pleine terre.

### Introduction

Le genépi blanc (*Artemisia umbelliformis* Lam.), espèce pérenne aromatique de la famille des Astéracées croît, dans les Alpes, à l'état naturel sur les moraines et les éboulis (TUTIN *et al.*, 1976; NDOIT et AESCHIMANN, 1986). Compte tenu de ses propriétés aromatiques, il présente un grand intérêt aussi bien pour les fabricants de liqueurs que pour les producteurs de tisanes. Aujourd'hui, en raison d'une demande croissante en matériel végétal pour la liquoristerie ainsi que de l'interdiction de cueillette des espèces protégées dans plusieurs pays d'Europe, le développement d'une technique de domestication s'impose (REY et SLACANIN, 1997). De nombreux travaux ont donc été réalisés dans le but de développer des cultures pour les régions de montagne et afin de contribuer ainsi à la sauvegarde des plantes menacées de disparition dans leur habitat originel (STEFANELLI et BUSANELLI, 1980; FRANÇOIS, 1985; REY, 1996).

A la Station de Changins, la recherche des possibilités de domestiquer le genépi blanc associée à un travail de sé-

lection a permis d'obtenir des lignées intéressantes quant à leur comportement agronomique et à leur composition en constituants chimiques (REY et SLACANIN, 1997). Parmi ces lignées, certaines ont été retenues pour leurs caractéristiques exceptionnelles qui justifient leur utilisation dans les travaux d'amélioration. C'est précisément pour obtenir une multiplication rapide et conforme des têtes de clones de genépi qu'on a recouru à la culture *in vitro*, afin de mettre en place rapidement le matériel de base nécessaire aux programmes de sélection.

Dans le domaine de la multiplication végétative du genépi, GAUTHERET *et al.* (1984) ont réalisé la micropropagation de cette espèce à partir de méristèmes provenant de semences.

Nous rapportons ici les résultats portant sur la reproduction accélérée du genépi blanc par développement de pousses axillaires issues de clones sélectionnés dont on connaît parfaitement le profil agronomique et aromatique.

Ce travail a été entrepris dans le cadre d'une collaboration entre le service de Biologie végétale (groupe Culture *in vitro*) de Changins et le service des Cul-

tures spéciales en montagne (Plantes médicinales et aromatiques) du Centre des Fougères à Conthey.

### Matériel et méthodes

#### Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans ce travail est constitué de six clones de genépi blanc (①, ②, ④, ⑫, ⑮ et ⑱). Ces clones, sélectionnés pour leurs performances agronomiques et leur teneur en constituants chimiques (REY et SLACANIN, 1997), sont prélevés sur les deux sites d'expérimentation (Liddes et Saleinaz) et cultivés en couche dans des pots en plastique.

#### Désinfection

Des explants de 2 à 3 cm de longueur sont prélevés sur les plantes-mères et prétraités avec une solution de Benlate® à 1% pendant 20 minutes; ensuite, ils sont trempés dans de l'hypochlorite de sodium à 1% pendant 15 minutes. Puis, après un bref rinçage à l'eau distillée stérile, ils sont transférés dans une solution de Kohrsolin® (glutaraldéhyde, N,N'-bis-(hydroxyméthyle) urée (Bode & Co., Hamburg) à 3% durant 15 minutes. Après trois rinçages à l'eau distillée stérile, ils sont maintenus dans une solution de rifampycine (100 mg/l) pour une durée de 20 minutes en attendant leur installation *in vitro*.

#### Milieus de culture

Les milieux de culture de base contiennent les sels minéraux selon MURASHIGE et SKOOG (1962) additionnés de 1 mg/l de thiamine, de 0,5 mg/l de pyridoxine, de 0,5 mg/l d'acide nicotinique, de 100 mg/l de myo-inositol et de 3% de saccharose.

A ce milieu de base sont ajoutés 4,44  $\mu\text{M}$  de benzyladénine (BA) et 0,5  $\mu\text{M}$  d'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB), alors que, pour la prolifération et l'enracinement des pousses axillaires, différents types de régulateurs de croissance [benzyladénine (BA), acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA), acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB)] sont utilisés individuellement ou en combinaison.

## Conditions de culture

Sauf mention spéciale, le matériel végétal est cultivé dans des tubes en verre (25 x 150 mm) renfermant chacun 12 ml de milieu approprié aux différents stades de développement. Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,7 avec 0,1 N de NaOH et les milieux sont ensuite solidifiés avec 0,7% d'agar (Difco Bacto Agar) avant l'autoclavage (121 °C, 1,1 kg de pression), pendant 15 minutes. Les cultures sont maintenues dans un environnement climatique où elles sont éclairées selon une photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures. L'intensité lumineuse au niveau des cultures est de 55 µmole/m<sup>2</sup>/s fournie par des tubes fluorescents (Mazda AVIVA TFRS 65/AVI). La température est de 22 ± 1 °C de jour et de 18 ± 1 °C de nuit. L'humidité relative a été maintenue à 55-60% dans la chambre de culture.

## Sevrage et acclimatation

Les microplantes de genépi racinées sont sorties des tubes de culture, débarrassées du milieu nutritif agarisé et repiquées dans un substrat de culture composé d'un mélange de compost, de sable, de terre franche et de perlite (1:1:1:1), cela après une période de 48 h de préacclimatation, durée pendant laquelle les cultures sont ramenées progressivement d'une atmosphère saturée d'humidité à un environnement conventionnel de culture en conditions de serre. Ensuite, elles sont transférées en couches et plantées ultérieurement dans des sites d'expérimentation en zones de montagne.

## Résultats et discussion

### Etablissement *in vitro*

L'initiation des premières cultures selon le procédé décrit ci-dessus ne présente pas de difficultés particulières. Toutefois, on relève un retard important à la reprise de croissance avec certaines sélections, en particulier les clones 4 et 12. Ce fait pourrait être dû, dans le cas présent, à la différence qualitative des explants prélevés sur les plantes-mères, lors de l'installation *in vitro*. Ces deux clones ont probablement mal supporté la transplantation de leur habitat naturel à des conditions de culture inappropriées précédant la mise en culture; une modification profonde de leur physiologie s'en est suivie, au détriment de la croissance momentanée des organes en place. A cet égard, READ et ECONOMOU (1987) ont aussi montré combien est importante l'influence des conditions de préparation des sources de matériel sur la réussite des cultures *in vitro*.

### Prolifération *in vitro*

#### • Effet de la benzyladénine

Le tableau 1 indique l'effet sur la formation de nouvelles pousses feuillées de genépi de différentes concentrations de benzyladénine (BA). Un nombre moyen de plus de 10 nouvelles pousses

Tableau 1. Effet de la benzyladénine (BA) sur le développement des pousses feuillées chez le genépi blanc (*A. umbelliformis* Lam., clone 18) en culture *in vitro*.

BA <sup>1</sup> [µM]	Formation de pousses	Formation de cal <sup>2</sup>	Vitrification <sup>2</sup>
0	1	-	-
0,88	> 10	+	-
1,76	> 10	++	+
3,52	pousses inutilisables	+++	++
4,44	pousses inutilisables	+++	+++
7,00	pousses inutilisables	+++	+++

<sup>1</sup>L'évaluation des diverses concentrations en BA est réalisée sur la base des 16 répétitions/traitement. Les expériences ont été répétées au moins deux fois.

<sup>2</sup>Le nombre de signes + indique le développement relatif du cal et de la vitrification à chaque expérience (- = aucun; + = faible; ++ = moyen; +++ = fort).

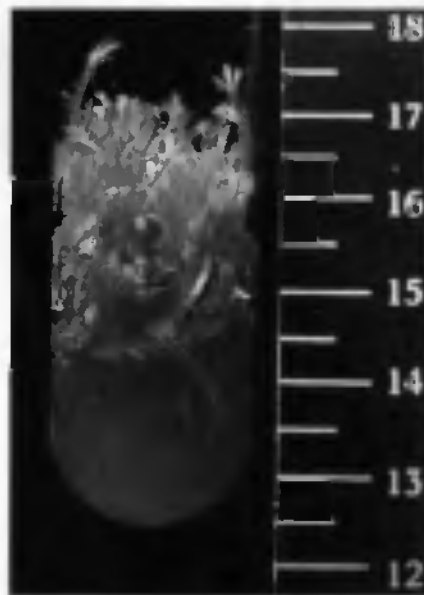


Fig. 1. Développement de nouvelles pousses feuillées sur milieu contenant 0,88 µM de benzyladénine (BA) chez *Artemisia umbelliformis* Lam. (clone 18).

feuillées par séjour *in vitro* a été obtenu avec les milieux renfermant 0,88 et 1,76 µM de benzyladénine (fig. 1). Les

concentrations plus élevées en BA ont favorisé la formation de pousses feuillées montrant une tendance à la vitrification avec l'ensemble des clones expérimentés. En l'absence totale de BA, on assiste à la formation de plantes à tiges possédant un système racinaire fin et fonctionnel. Une faible teneur en BA (0,88 µM) induit effectivement un développement de jeunes pousses qui se sont révélées toutes utilisables et faciles à manipuler, soit pour les travaux de multiplication, soit pour la préparation de plantes destinées ultérieurement au sevrage. GAUTHERET *et al.* (1984) ont également observé ce phénomène de densification des bourgeons sous l'influence d'une forte concentration en BA. Ces auteurs constatent qu'effectivement les pousses nouvellement formées sont nombreuses, mais qu'elles demeurent, en revanche, très petites.

#### • Effet de l'auxine

L'examen des résultats présentés dans la figure 2 montre que le type d'auxine entrant dans la composition du milieu nutritif de base influence la capacité à former des nouvelles pousses feuillées.

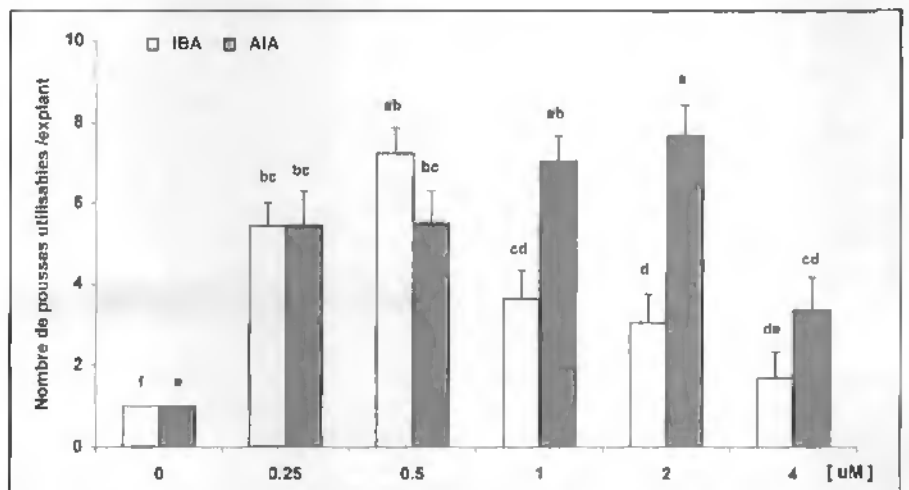


Fig. 2. Influence des auxines (AIA et AIB) sur le développement de nouvelles pousses chez *Artemisia umbelliformis* Lam. (clone 4).

L'adjonction de l'acide  $\beta$ -indolylacétique (AIA) au milieu de culture a fortement favorisé la prolifération des pousses axillaires sur les explants *in vitro*. Le meilleur développement, dans nos conditions d'expérimentation, a été obtenu avec les concentrations en AIA de 1,0 et 2,0  $\mu$ M: sur ces milieux de culture, on dénombre en moyenne 7 à 8 pousses utilisables par explant et par cycle de reproduction *in vitro*; alors que l'acide  $\beta$ -indolylbutyrique (AIB) paraît moins efficace pour la formation des pousses aux mêmes concentrations. En revanche, de faibles teneurs en AIB (0,25 et 0,5  $\mu$ M) s'avèrent bénéfiques pour la prolifération des nouvelles pousses feuillées.

Ces résultats nous ont poussés à fixer, pour la phase de prolifération, l'équilibre phytohormonal à 0,88  $\mu$ M de benzyladénine et à 2,0  $\mu$ M d'acide  $\beta$ -indolylacétique, pour la suite de nos essais.

#### Effet du génotype

L'influence du génotype sur le développement des pousses feuillées a été également examinée dans nos travaux, cela en comparant la réaction de diverses sélections à la composition phytohormonale retenue plus haut. Ainsi avons-nous observé, après plusieurs cycles de multiplication, une différence importante quant à la capacité de former des nouvelles pousses au sein des clones expérimentés (fig. 3). On compte 7 à 8 pousses feuillées produites par cycle et par explant pour les clones 1 et 4; alors que, sur le même milieu de culture, les clones 2, 12 et 18 produisaient une moyenne de 4 à 5 pousses. Le taux le plus bas (2 pousses) a été enregistré avec le clone 16. Cette variation inter-clonale a été aussi observée lors de la production *in vitro* avec des clones sélectionnés d'*Arnica* (LÉ, 1994) et de châtaignier (LÉ, 1997).

#### Enracinement *in vitro*

Comme le montre la figure 4, l'enracinement des pousses feuillées de genépi s'effectue sans difficulté particulière lorsqu'on les transfère sur un milieu nutritif de base dépourvu de régulateurs de croissance. Dans nos conditions d'expérimentation, les premières ébauches de racine apparaissent après une semaine de culture déjà. Toutefois, il faut compter deux semaines encore pour que toutes les miniboutures aient développé complètement leur système racinaire. L'avantage de ce mode d'enracinement sans adjonction de régulateur de croissance réside dans le fait que l'apparition des racines adventives se manifeste sans cals à la base des boutures, ce qui facilite considérablement

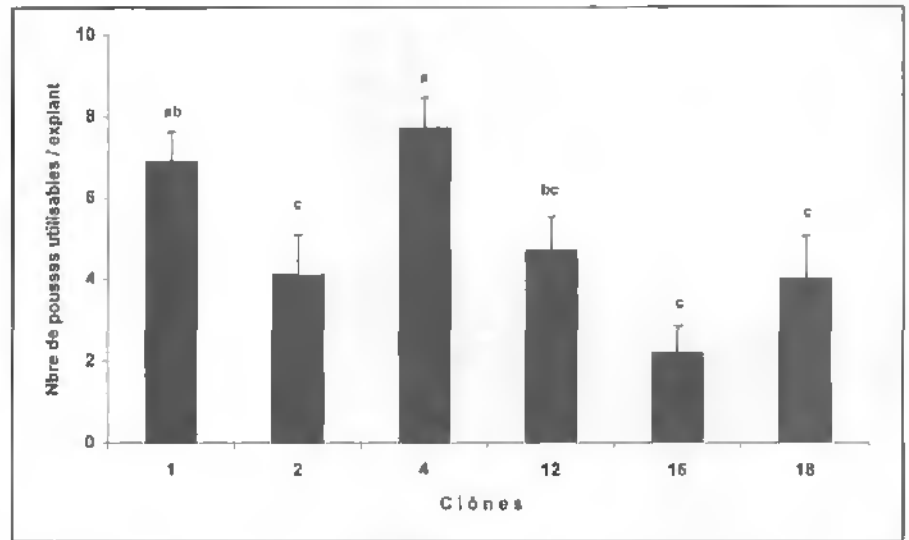


Fig. 3. Influence du génotype sur le développement de nouvelles pousses chez *Artemisia umbelliformis* Lam.

ment leur transfert au milieu naturel, lors des travaux de sevrage.

#### Sevrage et acclimatation

Le transfert des miniplantes racinées *in vitro* sur substrat de culture conventionnelle par passage progressif, selon notre procédé décrit plus haut, nous a permis d'obtenir plus de 95% de plantes capables de poursuivre leur cycle de croissance et de développement.

Il est également important de mentionner que les plantes produites *in vitro*, une fois acclimatées et cultivées en milieu naturel, n'ont montré aucune aberration morphologique en comparaison avec les parents sélectionnés.



Fig. 4. Formation de racines adventives sur milieu dépourvu de régulateur de croissance chez *Artemisia umbelliformis* Lam. (clone 4).

#### Conclusion

- En conclusion, cette étude démontre la possibilité de reproduire *in vitro*, par développement de bourgeons axillaires, des clones de genépi sélectionnés pour leurs performances agronomiques et phytochimiques.
- Le nombre de pousses produites par le biais de cette technique est élevé, cela grâce à l'action synergique de la benzyladénine et de l'acide  $\beta$ -indolylacétique.
- Des plantes obtenues ainsi *in vitro* permettent de constituer rapidement une nouvelle source de matériel nécessaire aux travaux de domestication et d'amélioration.
- Cette possibilité technique offre également une perspective pour la sauvegarde de cette espèce végétale menacée de disparition dans son habitat naturel.

#### Remerciements

Nos remerciements s'adressent à M. Ch. Rey, du service des Cultures spéciales à Conthey, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et pour la mise à disposition des clones de genépi nécessaires à nos essais, ainsi qu'à MM. D. Thomas et F. Tschuy pour leur excellente collaboration technique.

#### Bibliographie

- FRANÇOIS E., 1985. Le genépi: culture d'avenir? 1<sup>er</sup> Rencontres techniques et économiques Plantes aromatiques et médicinales, Nyons, 9-11 décembre 1985, 132-136.
- GALTHIERET R., LEDDET C., PAUPARDIN C., 1984. L'amélioration de genépis (*Artemisia umbelliformis* et *A. genipi*) par culture méristème. *C. R. Acad. Agri. de France* 70 (10), 1237-1246.

- LANDOLT E., AESCHIMANN D., 1986. Notre flore alpine. Club alpin suisse, 3<sup>e</sup> édit., 333 p., 120 planches en couleurs.
- LEF C. L., 1994. Multiplication *in vitro* d'*Arnica montana* L. *Revue suisse Vitic. Arboric. Hortic.* 26 (6), 391-395.
- LEF C. L., 1997. *In vitro* Clonal multiplication of Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) in Switzerland. In: Workshop on Tree Physiology and Genetic Resources of Chestnut. COST G4 Multidisciplinary Chestnut Research. Working Group I, Torre Pellice (Torino) - Italy, 18-21 June, 1997, European Commission (in press).
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473-497.
- READ P., ECONOMOU A., 1987. Stock plant influence on tissue culture success. *Acta Hort.* 212, 111.
- REY C., 1996. Domestikation der echten Edelraute (*Artemisia umbelliformis* Lam.). Edelraute Projekt RAC-RICOLA, 25 p.
- REY C., SLACANIN I., 1997. Domestikation du génepi blanc (*Artemisia umbelliformis* L.). *Revue suisse de Vitic. Arboric., Hortic.* 29 (3), 1-VIII.
- STEFANELLI S., BUSANELLI G., 1980. Esperienze di coltivazione di piante officinali alpine su diversi substrati naturali. *Economia Trentina* 4, 22-74.
- TUTIN T. G., HEYWOOD V. H., BURGESS N. A., VALENTIN D. H., WALTERS S. M., WEBB D. A., 1976. *Flora Europaea*, vol. 4, The University Press, Cambridge, 505 p.

### Summary

#### *In vitro* Culture of *Artemisia umbelliformis* Lam.

A procedure for micropropagation from stem nodes explants was developed for selected clones of *Artemisia umbelliformis* Lam. Shoot proliferation *in vitro* was achieved using nodes segments cultured on MURASHIGE and SKOOG (1962) medium supplemented with 0.88  $\mu$ M BA and 2.0  $\mu$ M IAA. Adventitious root formation was obtained by transferring young growing shoots on hormone-free medium. Rooted plantlets were successfully established in soil after a period of weaning. No obvious morphological changes were noticed on vitroplants under field conditions.

### Zusammenfassung

#### *In vitro* Vermehrung des *Artemisia umbelliformis* Lam.

In diesem Artikel wurde eine Gewebekulturtechnik für selektierten Klonen des *Artemisia umbelliformis* Lam. beschrieben. Achselknospen von *A. umbelliformis* Lam. wurden auf einem MURASHIGE und SKOOG-Medium (1962) mit 0,88  $\mu$ M Benzyladenin (BA) und 2,0  $\mu$ M  $\beta$ -Indolylessigsäure (IES) kultiviert, um die Bildung von neuen Knospen zu bewirken. Adventivwurzelbildung wurde dadurch hervorgerufen, dass sie auf ein Hormonefreies Medium überführt wurden. Bewurzelte Pflanzen konnten mit Erfolg in gärtnerische Substrate akklimatisiert werden. Keine morphologischen Veränderungen der Vitropflanzen wurden nach dem Anbau im Feld festgestellt.

## Séminaire sur l'actualité œnologique à Sion, le 27 août 1998, de la maison Schneider Dämmtechnik AG, en collaboration avec l'Ecole d'ingénieurs du Valais

**Lieu:** Aula F.-X. Bagnoud de l'Ecole d'ingénieurs, à Sion

- Thèmes:**
- Mise en place d'un système de management environnemental pour des PME du secteur œnologique
  - Enzymes: le rôle des Beta-glucanases dans la clarification, la filtration et la maturation des vins; l'extraction en douceur avec Vinozym.
  - La gamme des levures SIHA
  - SIHA-Optipur: les goûts d'amertume dans le vin
  - Un nouveau système pour gérer les principaux paramètres de la fermentation
  - Viniflora Oenos - le contrôle complet de la fermentation malolactique

Dîner en commun à la cafétéria de l'Ecole d'ingénieurs. Frais de participation, menu et boissons (café, vin) inclus: Fr. 50.-.

Inscriptions jusqu'au 10 août 1998 auprès de la maison **Schneider Dämmtechnik AG**, Postfach 512, 8401 Winterthur, tél. 052/233 18 21, fax 052/232 80 78.

# IN VITRO CLONAL MULTIPLICATION OF *ARNICA MONTANA* L.

C.L. Lê

Station fédérale de recherches en production végétale de Changins,  
CH-1260 Nyon  
Switzerland

**Keywords:** *Arnica montana* L., medicinal plant, tissue culture, propagation

## Abstract

*Arnica montana* L., an herbaceous plant in the Asteraceae (Compositae) of potential use in phytotherapy, was successfully propagated *in vitro*. Multiple shoot formation was induced from excised shoot tip explants on a modified Murashige and Skoog (M and S, 1962) medium supplemented with 4.44 $\mu$ M benzyladenine (BA) and 0.53 $\mu$ M  $\alpha$ -naphthylacetic acid (NAA). Adventitious roots were initiated by cultivating young growing shoots on a half strength of M and S medium containing 1.23 $\mu$ M  $\beta$ -indolylbutyric acid (IBA) and 2% sucrose. Rooted plantlets were then transferred to soil where they continue to grow with a survival rate of more than 95%.

## 1. Introduction

*Arnica montana* L., a perennial herbaceous plant belonging to the family Asteraceae (Compositae), is mainly distributed in the Northern Hemisphere. In Europe, it is a species native to the mountain regions comprised between 1'000 and 2'500 m (Delabays and Mange, 1991). In Switzerland, it can grow in various habitats including sparsely populated forests, pastures and grass-lands closely related to the Alps (Aeschmann and Burdet, 1989).

The use of *Arnica montana* L. in phytotherapy leads to numerous preparations as tinctures or soaps for external applications. Several pharmacological effects can be ascribed to the *Arnica montana* L. extract; it has *antirheumatic*, *antiphlogistic*, *antimicrobial* (Willuhn, 1981) and *antiseptic* properties as well (Willuhn, 1969).

Previous studies with *Arnica montana* L. extracts showed the presence of the two major constituents in the flower parts of this plant: the *flavonoids* and the *sesquiterpene lactones* (Willuhn, *et al.*, 1983), while *essential oil* is accumulated mostly in the roots and rhizomes (Willuhn, 1969).

As the plants are becoming rare in their natural habitats and the growing protection is increasingly severe for this species in most European countries, the domestication of *Arnica montana* L. is considered to be of great interest (Weyel, 1989; Delabays and Mange, 1991). Attempts to propagate this species through tissue culture have also been reported (Winand, *et al.*, 1986; Daniel and Bomme, 1991; Conchou, *et al.*, 1992; Malarz, *et al.*, 1993).

We report here a reliable method for the rapid clonal multiplication of *Arnica montana* L. elite selections (Lê, 1994), in view of providing valuable source material to be incorporated into breeding programs.

## 2. Material and methods

Stock mother-plants of different selections of *A. montana* L. [Marburg (A 57, M1, M2 and M3); Fribourg (F4 and F5)] were grown in 15 cm diameter plastic pots, in a mixture composed of peat and Perlite (2:1). These were watered with 0.1% fertilizer 10: 10: 7.5 (N: P: K) Wuxal® Maag, once weekly with temperate tap water. Fungicide treatments

with 0.1% Benlate® were also achieved on these plants during their growth under green house conditions.

Explants consisted of 1-2 cm leafy shoot taken from mother plants were pretreated with 1% Benlate® for 15 - 20 minutes. Afterwards, they were immersed in 70% ethanol, soaked for 15 minutes in 1% sodium hypochlorite containing a few drops of Teepol as a wetting agent and rinsed briefly with sterile distilled water. Then they were maintained in 3% Kohrsolin® [Glutaraldehyde, N,N'-bis-(hydroxymethyl) Urea (Bode and Co, Hamburg)] for another 15 minutes followed by three washes in sterile distilled water containing an antioxidant mixture 50% (v/v) of 1% ascorbic acid and 1.5% citric acid.

Initial explants were cultivated in test tubes (25X150 mm) containing 15 ml Murashige and Skoog basal medium supplemented with 1.0 mg/l thiamine, 0.5 mg/l pyridoxine, 0.5 mg/l nicotinic acid, 100 mg/l myo-inositol and 3% saccharose. In order to proliferate new shoots, different combinations of growth regulators were tested with respect to the basis of morphogenetic responses of the explants. For rooting, young leafy shoots were transferred on the half strength M&S basal medium supplemented with 2% saccharose and  $\beta$ -indolylbutyric acid (IBA) ranging from 0 to 2.46  $\mu$ M.

The pH of the media was adjusted to 5.7-5.8 with NaOH (0.1N) subsequent to the addition of growth regulators, but prior to the addition of 0.7% agar (Difco, Bacto-Agar) and autoclaving at 121 °C for 15 min.

Cultures were incubated at 23  $\pm$ 1°C / 18  $\pm$ 1°C (day/night) under cool white fluorescent lamps at 55  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>/s with a 16h light and 8h dark cycle.

All experiments were repeated at least three times. Data were means of 16 to 20 replicates per treatment.

For planting out, rooted plantlets were firstly maintained under saturated humidity (Fog system) during a week and then potted in a conventional substrate containing ASB® compost and Perlite (2:1), before transferring under green house conditions and later in the fields.

### 3. Results and Discussion

#### 3.1. *In vitro* establishment

According to our procedure of sterilization the establishment of leafy shoot of *A. montana* L. could be achieved with more than ca. 80% of initial explants freed from contaminants compared to the results obtained by Conchou, *et al.*, (1992), where the authors observed 75% of the initial explants still contaminated even after a treatment with 4 or 5 % sodium hypochlorite. The high percentage of explants freed from contaminants achieved in the present study is probably due to an efficient elimination of microorganisms through two steps of surface sterilization as mentioned above (cf. material and methods). Nevertheless infection occurred in our conditions of culture is mostly due to bacteria contaminants as it was also noted by Conchou, *et al.*, (1992).

#### 3.2. Shoot proliferation

As shown in figure 1, initial explants of *A. montana* L. failed to form or occasionally exhibited low shoot regeneration when the growth regulators were absent in the medium. The induction of shoot formation was stimulated when both cytokinin and auxin were added together in the culture medium. However, when BA was used as source of cytokinin, cultures showed higher average values of shoot development than with other cytokinin compounds. In this study the production of well-developed shoots was stimulated by using benzyladenine (BA), in the presence of  $\alpha$ -naphthylacetic acid (NAA). This finding contradicts earlier report (Conchou, *et al.*, 1992) that using the same balance of growth regulators yielded low proliferation rate of new shoots in subsequent subcultures. It is likely due to the fact that, in our experiments, the activated charcoal-containing medium, which could be responsible for the reduction of the number of new

shoots, is omitted. In this regard, it was suggested that the addition of activated charcoal to the medium can prevent the problem of explant browning and necrosis, but at the same time it does adsorb growth regulators resulting in the reduction of shoot formation (Ebert and Taylor, 1990).

Comparing the effect of the four cytokinins supplemented to the medium significant differences were found between the means of shoot produced from cultures grown on BA-containing medium ( $16 \pm 0.9$  shoots) and those supplemented with either Zeatin ( $5.4 \pm 0.4$  shoots), 2iP ( $3.9 \pm 0.3$  shoots) or Kinetin ( $4.10 \pm 0.6$  shoots). Among the different cytokinins tested, BA was considered in this experiment to be superior to the remaining cytokinins. In this respect, to determine the optimal concentration of BA in shoot formation a range of various amounts of BA was tested (figure 2). The highest shoot multiplication rate was obtained at the concentration of  $4.44 \mu\text{M}$ , while BA at  $11.11 \mu\text{M}$  appeared to be less effective causing the decrease of the shoot proliferation rate. The responses of cytokinins described here are similar to those observed by Malarz, *et al.*, (1993), except for Kinetin with which these authors have observed an increase in the number of new shoots. This may be explained by the fact that their culture medium contains a large amount of Kinetin ( $11.62 \mu\text{M}$ ). Nevertheless, in this study the beneficial effect of BA on the shoot formation resulted in significantly caulogenic responses: development of axillary bud clusters consisted of large leafy shoot masses which are easily separated for rooting and the number of usable shoots produced in each explant was estimated to be 16 - 18 per sample in subsequent culture (figure 3).

The influence of auxin namely NAA on the shoot formation of *A. montana* L. was also carried out with the addition of various amounts of this growth regulator in the culture medium. Shoot formation of *A. montana* L. initiated from leafy shoot explants was effectively observed with the addition of  $0.53 \mu\text{M}$  NAA to the medium (figure 4). However, at NAA  $1.36 \mu\text{M}$  shoot formation tend to decrease significantly. While adding NAA as sole source of growth regulator to the medium has led to moderate adventitious root formation accompanied by a slight callus development at the basal end of the explants, and failed to induce satisfactory shoot formation. Daniel and Bomme (1991) have also obtained shoot formation from meristem on modified MS medium containing  $5.7 \mu\text{M}$  IAA, but mentioned that the multiplication rate was still low (1:4.2) in subsequent subculture. The reduction in number of new formed shoots laid could result from IAA degradation which was probably more rapid than NAA during culture, and especially in the presence of MS salts as reported by Dunlap, *et al.*, 1986.

Based on the results of our investigations of shoot proliferation over four culture periods, there was a significant difference in the number of shoots formed among the six genotypes (figure 5). The highest number of shoots was obtained under our conditions from M2 ( $19 \pm 2.1$ /explant) while the lowest number was from F5 ( $7.75 \pm 1.1$ /explant) and F4 ( $9 \pm 2.3$ /explant). Clone A57 produced an average of  $18 \pm 1.2$  /explant; M1 and M3 initiated number of shoots ranging from  $13 \pm 2.5$  to  $14 \pm 1.9$  shoots/explant. This finding is different from earlier results obtained by Daniel and Bomme (1991). They reported that no influence of genotype on the *in vitro* response was found over 50 selected plants and populations taken from different places. However, the differential response among our selected clones suggests here the possible intra-clonal variations due to a genotypic effect and indicates therefore that attention should be paid to the choice of elite selections when large scale production is to be considered.

### 3.3. Rooting

Preliminary investigations in root initiation done with various growth regulators including  $\beta$ -indolylbutyric acid (IBA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D),  $\alpha$ -naphthylacetic acid (NAA) and  $\beta$ -indolylacetic acid (IAA) showed that IBA was most suitable for inducing root formation of *A. montana* L. *in vitro*. Therefore, in the present study IBA was tested for its ability to produce adventitious roots.

Figure 6 depicts the rooting responses obtained from different clones of *A. montana* L. exposed to various concentrations of IBA. Generally, the addition of IBA to the basal medium was effective for the initiation of adventitious roots, particularly in the two F4 and F5 clones which were considered, in our conditions, as difficult-to-root. Moreover, the beneficial effect of IBA was more important as much as its concentration was increased in the medium. The highest frequency, 95% of shoot producing roots, was obtained on the medium with 1.23  $\mu\text{M}$  and 2.46  $\mu\text{M}$  IBA on F4 and F5. Most of the shoots exhibited readily the root initiation within ten days after transfer to rooting media. However, the frequency of root formation was less obvious for the other clones M1, M2 and M3 with respect to their rooting ability. As in shoot production, the number of adventitious roots formed per shoot during root initiation was also influenced by the genotype (figure 7). In our experiments, at 2.46  $\mu\text{M}$  IBA F4 clone had produced an average of 9 roots, M1 and M2 yielded 12 roots and 15 roots in M3. While the inductive IBA treatment with the same amount was less effective on a difficult-to-root clone F5 (2 roots/shoot) compared to the control (3 roots/shoot). In addition, the quality of rooting was also affected by the amount of IBA incorporated into the medium. At 0.50 and 1.23  $\mu\text{M}$  shoots had developed a root system showing long and furnished roots. Occasionally lateral roots had occurred, while increasing IBA concentration to 2.46  $\mu\text{M}$  had led to a formation of thick root system.

### 3.4. Acclimatization and Planting out

Miniplantlets developing adventitious roots were maintained under fog system for hardening during 72 h. Then they were transferred to pots on a mixture ASB<sup>®</sup> substrate and Perlite (2:1) and successfully grown under greenhouse conditions before planting out in the fields (figure 8). More than 95 % of plants transferred to soil continued to grow normally and no obvious variations have been observed.

## 4. Conclusion

The results reported here indicate that the ability to undergo organogenesis exhibited by shoot tip explants of *A. montana* L. derived from adult mother-plants should be useful for the propagation of valuable plant material. In addition, a high rate of multiplication of new leafy shoots from cultured *A. montana* L. shoot explants can be obtained throughout the subcultures and the ease with which the rooted shoots can be transferred to soil provide an efficient method for the rapid multiplication of pharmaceutically interesting elite selections to be incorporated into breeding programs of medicinal plants in the mountain regions of Switzerland.

## Acknowledgements

We would like to thank Dr. N. Delabays for providing the plant material and for his valuable discussion during this study, and Mr. D. Thomas for his helpful technical assistance.

## References

- Aeschimann, D and H.M. Burdet, 1989. Flore de la Suisse (le nouveau Binz). Editions du Griffon, Neuchâtel, Suisse. ISBN 2-88006-503-7.
- Conchou, O., K. Nichterlein and A. Vömel, 1992. Shoot tip culture of *Arnica montana* for Micropropagation. *Planta Med.* 58, 73 - 76.
- Daniel, von G. and U. Bomme, 1991. Einsatz der *in vitro* Kulturtechniken in der Züchtung von Arnika (*Arnica montana* L.). Bayerisches Landwirtschaftliches Jahrbuch, 68, 249 - 253.

- Delabays, N. and N. Mange, 1991. La culture d'*Arnica montana* L.: aspects agronomiques et phytosanitaires. Rev. suisse Vitic., Arboric., Hortic. 23 (5), 313 - 318.
- Dunlap, J.R., S. Kresovich, and R.E. McGee, 1986. The effect of salt concentration on Auxin stability in culture media. Plant Physiol. 81, 934 - 936.
- Ebert A. and H.F. Taylor, 1990. Assessment of the changes of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid concentrating in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 20, 165 - 172.
- Lê, C.L., 1994. Multiplication *in vitro* d'*Arnica montana* L. Revue suisse Vitic. Arboric., Hortic. 26 (6): 391 - 395.
- Malarz J., A. Stojakowska, B. Dohnal and W. Kisie, 1993. Helenalin acetate in *in vitro* propagated plants of *Arnica montana*. Planta Med. 59 (1): 51 - 53.
- Weyel, A., 1989. Verbesserung der Domestikationseigenschaften von Wildpflanzenpopulationen und selektierten Genotypen von *Arnica montana* L. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen, Germany.
- Willuhn, G., 1969. Untersuchungen über die Inhaltsstoffe von Arnica-Arten. Planta Medica 17, 127 - 137.
- Willuhn, G., 1981. Neue Ergebnisse der Arnika-Forschung. Pharmazie in unserer Zeit 10 (1), 1 - 7.
- Willuhn, G., P.M. Röttger and H. Matthiesen, 1983. Helenalin- und 11,13-Dihydrohelenalinester aus Blüten von *Arnica montana*. Planta Medica 49, 226 - 231.
- Winand C., J.L. Ramaut and T. Gaspar, 1986. Multiplication végétative par culture *in vitro* d'*Arnica montana* L. Pharma Belg. 41 (3), 147 - 150.

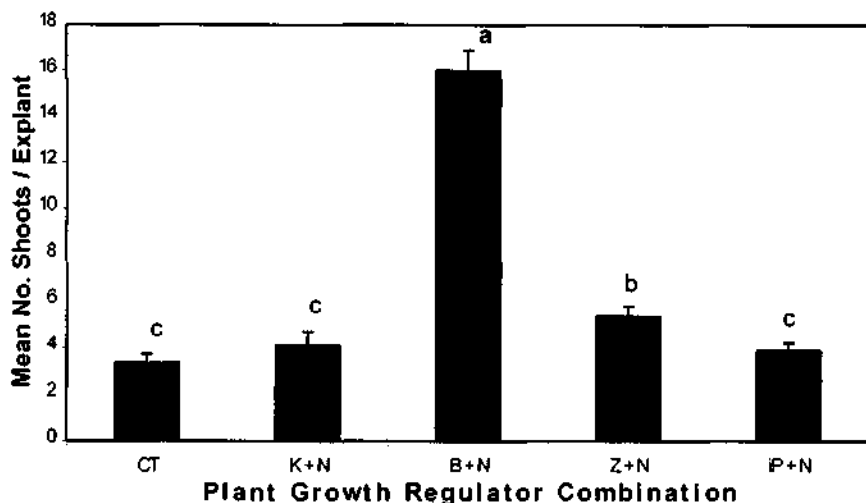


Figure 1: Influence of plant growth regulators on shoot development from shoot explants of *A. montana* L. after 6 weeks in culture. Key: CT=Control; K=Kinetin[4.65 $\mu$ M]; B=BA[4.44 $\mu$ M]; Z=Zeatin[2.85 $\mu$ M]; iP=2iP[4.92 $\mu$ M]; N=NAA[0.53 $\mu$ M]. Means with different letters are significantly different at 5% level. Vertical bars represent  $\pm$  SE.

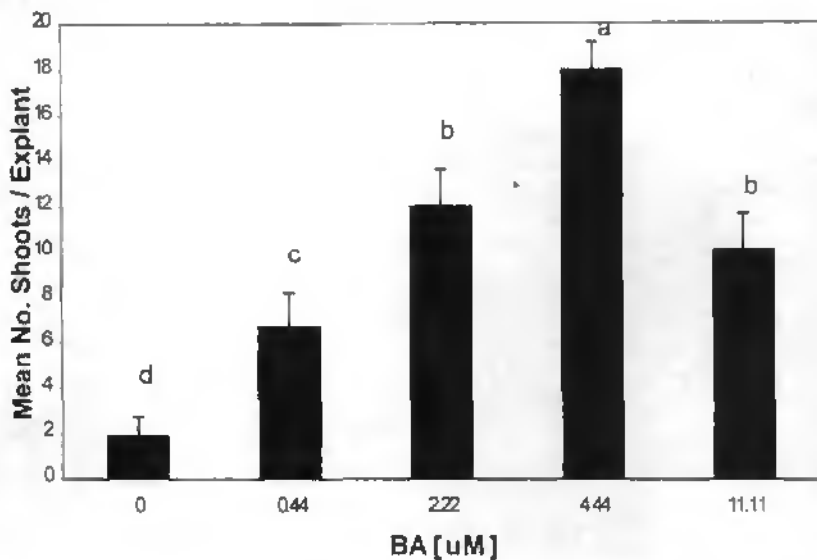


Figure 2: Effect of BA concentration on shoot development from shoot explants of *A. montana* L. after 6 weeks in culture. Means with different letters are significantly different at 5% level. Vertical bars represent  $\pm$  SE.



Figure 3: Proliferation of shoots from shoot explant of *A. montana* L. on MS medium supplemented with 4.44  $\mu$ M BA and 0.53  $\mu$ M NAA. Leafy shoots (left) isolated from shoot cluster (right) after 6 weeks in culture. Bar = 1 cm.

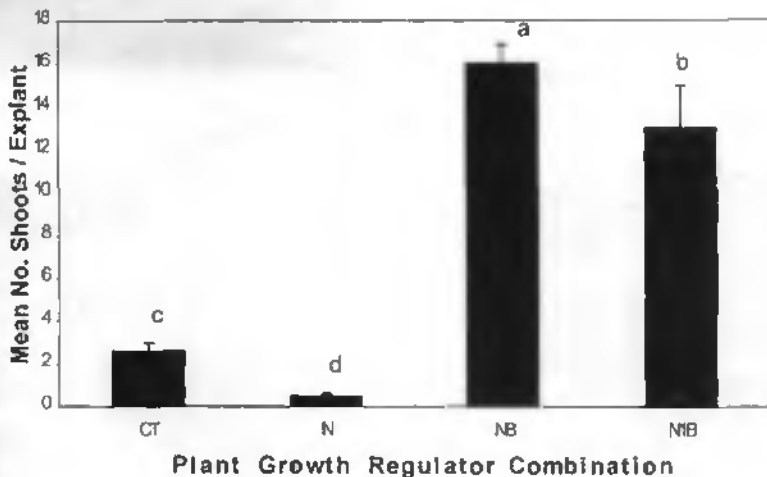


Figure 4: Effect of NAA on shoot development from shoot explants of *A. montana* L. after 6 weeks in culture. Key: CT=Control; N=NAA[0.53  $\mu$ M]; NB=NAA[0.53  $\mu$ M] + BA[4.44 $\mu$ M]; N1B= NAA[1.34  $\mu$ M] + BA[4.44 $\mu$ M]. Means with different letters are significantly different at 5% level. Vertical bars represent  $\pm$  SE.

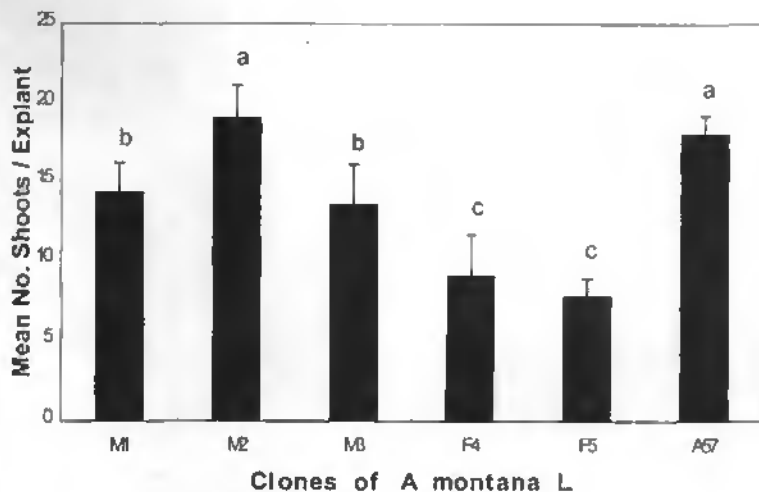


Figure 5: Influence of Genotype on shoot development from shoot explants of *A. montana* L. after 6 weeks in culture. Means with different letters are significantly different at 5% level. Vertical bars represent  $\pm$  SE.

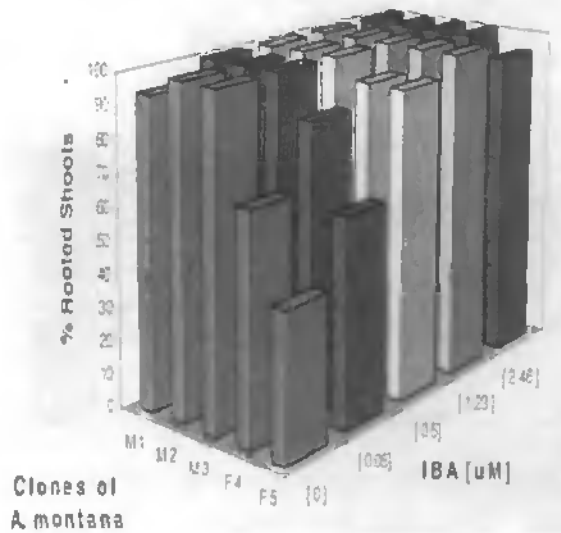


Figure 6: Effect of IBA on the percentage of rooting in leafy shoots of *A. montana* L. after 3 weeks in culture.

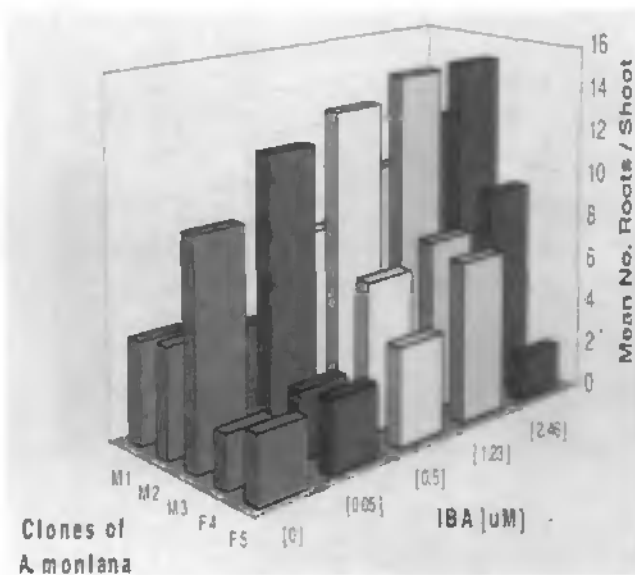


Figure 7: Effect of IBA on the adventitious root development in leafy shoots of *A. montana* L. after 3 weeks in culture.



Figure 8: Vitroplants of *A. montana* L. established in soil after 12 weeks in culture.



European Commission



COST  
European cooperation  
on scientific and  
technical research

## COST 822

# Physiology and control of plant propagation *in vitro*

Proceedings of the workshop  
held at Humboldt University, Berlin 1996



## « In vitro mass tuberization as a means to produce virus-free seed-potatoes in Switzerland »

C.L. Lê<sup>1</sup> and D. Page<sup>2</sup>

1/ Station fédérale de recherches en production végétale de Changins, CH-1260 Nyon, Switzerland.

2/ Delley Seeds and Plants Ltd., CH-1567 Delley, Switzerland.

### Summary

A tissue culture technique in which nodal cuttings of *Solanum tuberosum* L. were induced to develop *in vitro* microtubers, in order to produce high health status of the potato seed genotypes cultivated in Switzerland.

*Key words* : *Solanum tuberosum*, microtubers, nodal cuttings, *in vitro* tuberization.

### Introduction

Micropropagation through *in vitro* tissue culture has become common practice in Switzerland during the last decade (Reust and Lê, 1985). However, this technique is severely criticized due to a number of disadvantages : the under-occupancy of facilities and of the personal with work often concentrated to a few periods of the year.

An alternative system in which *in vitro* minicuttings are used to produce microtubers has been developed in view to avoid slack periods in the occupancy of facilities and to allow a more flexible production planning implemented in the scheme of the prebase and base potato seed production.

The aim of this work was to evaluate the conditions of culture related to the support, container, growth retardant, nitrogen supply and renewal of medium in order to promote quality of the microtubers for planting under field conditions.

### Material and Methods

Nine potato cultivars of the swiss assortment of potato varieties were used to perform the experiments. For the production of *in vitro* plants two tissue culture containers (Plastem<sup>®</sup> and Sigma<sup>®</sup> plastic boxes) with liquid and agar support containing a CMS-medium (Collet, 1985) were tested. Effect of Nitrogen content was carried out by referring to Murashige & Skoog (1962) medium. For the production of microtubers, *in vitro* single node cuttings were induced to tuberize by using a modification of the technique of Charles (1993). Cultures were first incubated on 6% saccharose-medium under long day conditions (16h/day) for 35 days at  $18 \pm 2$  °C, and then on 8% saccharose-medium (Lê, 1990, 1993) with no cytokinin, under short day conditions (8h/day) for 15 days at 18 °C day/14 night  $\pm 2$  °C. Afterwards, they were placed in total darkness at  $19 \pm 1$  °C until tubers were harvested. In order to improve the quality of tubers produced *in vitro*, 0.3 mg/l Paclobutrazol (PCL) and 60 mM Nitrogen ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) were added alone or in combination to the culture medium for 0, 7 and 14 days during short day conditions. Light intensity was  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Evaluation of the plant growth and the production of microtubers regarding length of the plant, useable nodes (axillary buds), fresh and dry weight and diameter of the tubers was done for each of the different culture

medium. The length of the dormant period of *in vitro* microtubers was also determined with regard to the potential of germination after storage at 4 °C.

## Results and Discussion

### In vitro Growth of miniplants

Table 1 shows the parameters defining the growth of miniplants cultured in two types of container and support of culture. Growth is greatly influenced by the Sigma container compared to the Plastem one. The fresh weight and the height of miniplants rate were increased in the present assay by two fold on the solid medium in the Sigma container, while the higher growth rate of overall was obtained with the liquid medium

Table 1 - Effect of container and support of culture on *in vitro* growth of potato miniplants (cv. Charlotte).

<u>Container</u>	<u>Medium</u>			
	<u>Solid</u>		<u>Liquid</u>	
	<u>HT</u> <sup>z</sup>	<u>FW</u>	<u>HT</u>	<u>FW</u>
<u>Plastem</u> <sup>®</sup>	4.98 ± 0.1 a <sup>1</sup>	83.73 ± 5.17 a	7.67 ± 0.50 a	177.52 ± 11.75 a
<u>Sigma</u> <sup>®</sup>	8.11 ± 0.23 b	193.04 ± 11.17 b	10.65 ± 0.15 b	250.00 ± 10.20 b

z/ HT : height (cm); FW : fresh weight (mg).

1/ Average ± standard error. Mean separation in columns by Duncan's Multiple Range Test, 5% level.

Increasing the nitrogen content in the medium did not promote the growth of miniplants regarding the number of useable nodal explants and the height of miniplants obtained after 1 month of culture (tabl. 2). High contents of nitrogen reduced, on the contrary, the fresh weight of miniplants; particularly, they caused significantly a decrease of their dry weight as well.

Table 2 - Effect of nitrogen content on *in vitro* growth of potato miniplants (cv. Urgenta).

	<u>Nitrogen [ meq ]</u>						
	<u>5</u>	<u>10</u>	<u>15</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>45</u>	<u>60</u>
<u>UNE</u> <sup>z</sup>	4.05 ± 0.13 d <sup>1</sup>	4.30 ± 0.18 cd	5.35 ± 0.12 a	4.75 ± 0.12 bc	4.60 ± 0.13 c	4.61 ± 0.18 c	5.15 ± 0.15 ab
<u>HT</u>	8.29 ± 0.28 a	7.10 ± 0.22 b	7.09 ± 0.21 b	7.38 ± 0.22 b	6.48 ± 0.16c	6.35 ± 0.15 c	6.38 ± 0.16 c
<u>FW</u>	144.7 ± 5.75 a	127.7 ± 5.47 bc	134.14 ± 3.72 ab	126.77 ± 4.77 bc	126.70 ± 3.70 bc	115.09 ± 4.82 c	100.44 ± 4.27 d
<u>DW</u>	6.98 ± 0.31 d	8.03 ± 0.28 bc	10.17 ± 0.34 a	7.70 ± 0.22 bcd	8.63 ± 0.25 b	7.58 ± 0.55 cd	7.80 ± 0.27 bcd

z/ UNE : useable nodal explants; HT : height (cm) ; FW : fresh weight (mg) ; DW : dry weight (mg).

1/ Average ± standard error. Mean separation in rows by Duncan's Multiple Range Test, 5% level.

In our experiment, the higher growth rate was obtained on the medium supplemented with less nitrogen content (15 meq). The results confirmed the importance of low nitrogen level for the growth of miniplants *in vitro* as reported by Charles and Rossignol (1992).

### In vitro Tuberization

As shown in figure 1, the capacity of potato miniplants to produce tubers was variable among cultivars. Some cultivars reached complete tuberization (100%) while others gave low response to the tuber induction process. Such clonal variability has also been observed with other potato varieties (Ranalli, 1994).

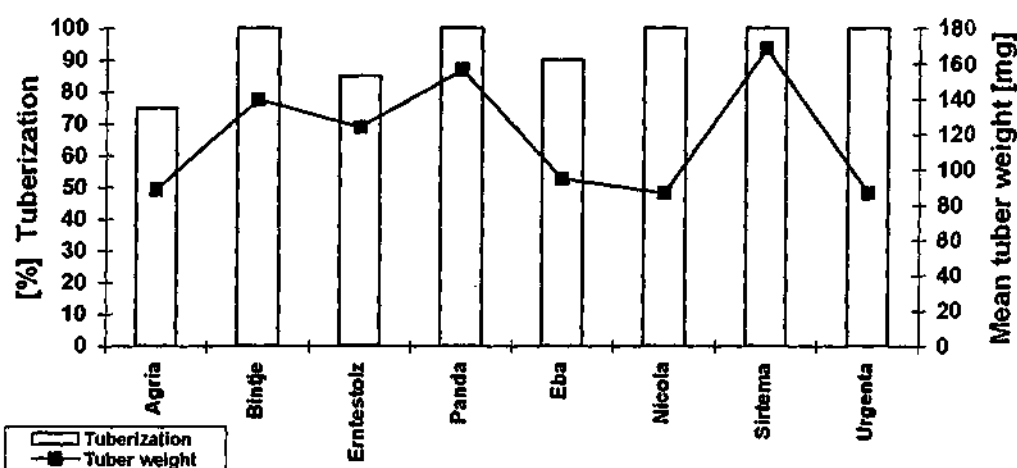


Figure 1 - Influence of genotype on the capacity of tuberization in 8 cultivars of *S. tuberosum* L cultured *in vitro*.

The mean weight of microtubers obtained in this experiment was 118.16 mg/tuber and ranged from 86.91mg (Urgenta) to 168.55 mg (Sirtema). The size of microtubers were small, for instance, for a direct planting under field conditions. Therefore, in order to investigate whether larger microtubers could be produced, Paclobutrazol (PCL), a growth retardant promoting tuber yield (Balamani and Poovaiah, 1985), and Nitrogen were tested (see Material & Methods).

The addition of Paclobutrazol to the medium enhanced the quality of microtubers compared to the control. At harvest, the average weight per tuber was increased up to 30% on the cultures supplied with Paclobutrazol in two cultivars Sirtema and Urgenta (tbl. 3).

Table 3 - Effect of Paclobutrazol (0.3 mg/l) adding prior to short-day induction on the development of microtubers of cvs. Sirtema and Urgenta.

Cultivar	Weight [mg]		Diameter [mm]	
	Control	PCL	Control	PCL
Sirtema	153.66 ± 16.45 a	399.20 ± 30.00 b	4.62 ± 0.06 a	8.23 ± 0.28 b
Urgenta	120.40 ± 12.73 a	372.50 ± 11.17 b	4.65 ± 0.21 a	7.80 ± 0.10 b

z/ Average ± standard error. Mean separation in rows by Duncan's Multiple Range Test, 5% level.

Larger tubers were obtained as well with an increase of 78% in size on Sirtema and 67.7% on Urgenta.

During the short-day period (8 h/day), there was also significant increase in the fresh weight and diameter of microtubers if Nitrogen was supplied for day 0 or at least for day 7 (fig. 2). After this period, the weight of microtubers decreased for most of cultivars experimented, except Bintje .

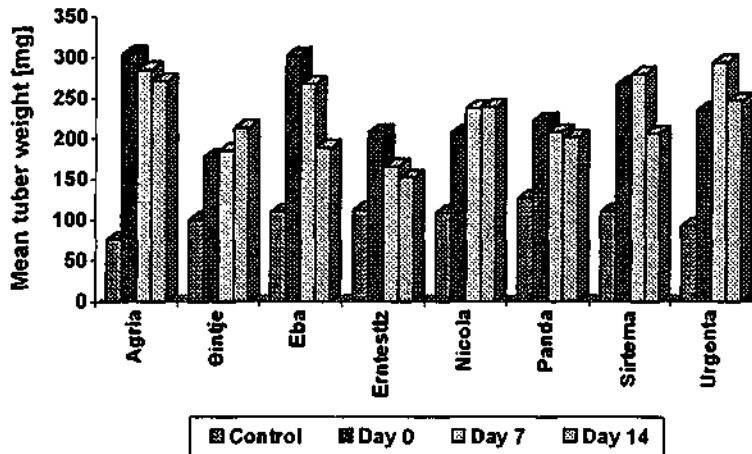


Figure 2 - Effect of Nitrogen supply (60 mM) and periods of application on the development of microtubers in 8 cultivars of *Solanum tuberosum* L. cultured *in vitro*.

Furthermore, improvement to the quality of microtubers produced *in vitro* was clearly obtained when both Paclobutrazol and Nitrogen were applied to the induction medium as mentioned above. The results obtained under our conditions of experiment showed that Paclobutrazol-Nitrogen-treated cuttings produced larger tubers with a significantly higher mean fresh weight as compared to the control and to the N or PCL-treated cuttings (figure 3).

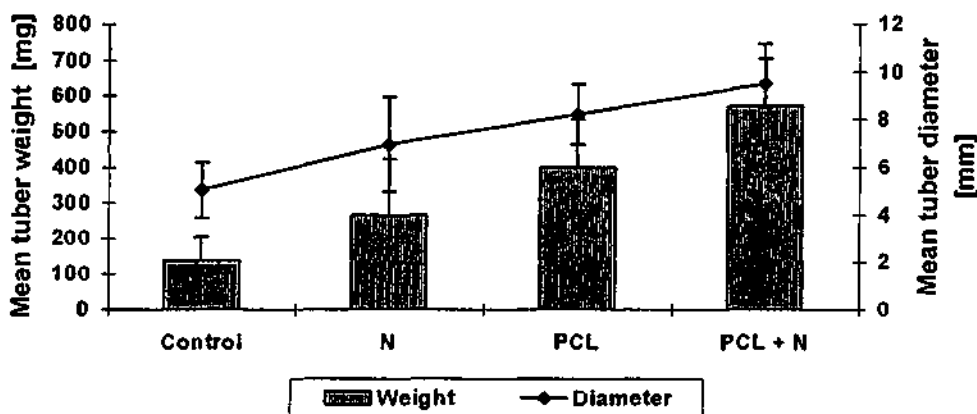


Figure 3 - Effect of Paclobutrazol and Nitrogen (alone or in combination) on the development of microtubers on cv. Sirtema.

The positive effect of PCL on *in vitro* tuberization are in agreement with previous results mentioned by Harvey et al. (1991), whereas the beneficial interaction of PCL and Nitrogen on the quality of microtubers obtained in this study has never been reported until now.

In addition, high proportion of larger tubers can be produced when the culture medium was renewed during the darkness period (fig. 4).

