

Culture *in vitro* par immersion temporaire : un nouveau récipient

Teisson C.¹, Alvard D.¹, Berthouly M.², Cote F.¹, Escalant J.V.³, Etienne H.²

1 CIRAD-GERDAT, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

2 CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

3 CIRAD-FLHOR, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

L'emploi du milieu liquide en culture *in vitro* a des avantages économiques certains : réduction du travail manuel, changement de milieu plus aisé, économie en gélifiant. Les recherches induites par ces atouts ont conduit à la conception de différentes techniques et récipients de culture, plus ou moins complexes.

Une des façons les plus efficaces d'utiliser le milieu liquide, tout en contournant ses principaux inconvénients (asphyxie et hyperhydricité des tissus), est d'immerger les explants de façon transitoire plutôt que continuellement. Dans cet objectif et en souhaitant avant tout privilégier la souplesse d'utilisation, le laboratoire de culture *in vitro* de Biotrop (CIRAD¹) a conçu un appareil petit, bon marché et d'un fonctionnement simple.

Principe de fonctionnement

Le récipient utilisé pour les premières expériences est une unité de filtration autoclavable vendue dans le commerce. Elle a été modifiée en reliant les compartiments haut et bas au moyen d'un tube de verre. L'ensemble opère en sens inverse du fonctionnement usuel de l'unité de filtration : les plantes sont placées dans la partie haute et le milieu liquide dans la partie basse (figure 1). Quand le compartiment inférieur est placé sous pression, à l'aide d'une pompe à air de laboratoire, le milieu est refoulé dans le compartiment haut à travers le tube de verre. Une simple prise électrique programmable contrôle la fréquence et la durée du fonctionnement de la pompe, et donc la fréquence et la durée des immersions. Quand la surpression cesse, le liquide redescend par gravité. Le courant

d'air qui balaie le récipient pendant toute la durée de l'immersion permet un renouvellement de l'atmosphère interne du récipient. Tous les flux d'air sont stérilisés par des événements hydrophobes de 0,2 μ .

Chaque appareil est ainsi isolé et peut être déplacé individuellement.

Exemples d'application

Microbouturage du caféier

Le microbouturage du caféier (*Coffea arabica* ou *canephora*) est réalisé en induisant, par des cytokinines, le démarrage de bourgeons axillaires sur des nœuds orthotropes. La multiplication est assurée par subdivision des pousses orthotropes successivement obtenues. En milieu semi-solide, la multiplication est relativement lente : le coefficient de multiplication est de 6 à 7 tous les trois mois. En utilisant l'immersion temporaire, le même taux est obtenu en cinq semaines. Cet optimum a été atteint avec un rythme d'immersion de quatre fois 15 minutes par 24 h ; des fréquences et durées d'immersion plus faibles ne permettent pas d'atteindre une telle efficacité alors que des immersions plus importantes entraînent des anomalies provoquées par un excès d'eau dans les tissus.

Ce rendement permet d'envisager la micropropagation massive de *Coffea arabica* sous un jour totalement nouveau et, en particulier, de valoriser les nouveaux hybrides créés dans les programmes d'amélioration génétique, beaucoup plus rapidement que par la distribution de graines.

Embryogenèse du caféier

L'embryogenèse somatique de *Coffea* sp. est maîtrisée depuis de nombreuses années. La friabilité du cal obtenu à partir de tissus foliaires permet son passage et son entre-

tien en milieu liquide agité. Les embryons somatiques sont produits après transfert sur un milieu enrichi en cytokinines. Quels que soient les rythmes et les durées d'immersion, le système permet une obtention d'embryons beaucoup plus rapide qu'avec le milieu liquide agité. La qualité des embryons obtenus est bien meilleure. En particulier, ils poursuivent leur développement jusqu'à la germination *in vitro* et la taille de leurs cotylédons permet une bonne activité photosynthétique et un transfert direct en serre.

Embryogenèse de l'hévéa

L'embryogenèse somatique d'*Hevea brasiliensis* est induite après callogenèse sur téguments internes de jeunes fruits. Le recours à l'immersion temporaire s'est avéré favorable dans les différentes étapes du processus.

Au cours de l'expression de l'embryogenèse somatique à partir de cal friable, des immersions d'une minute, deux fois par jour, ont permis une production d'embryons 15 fois plus nombreux qu'en milieu semi-solide et d'une qualité bien supérieure.

La maturation nécessaire au cours de la conversion en plantules est réalisée par des durées d'immersion particulièrement faibles : une minute par semaine. Ce rythme conduit en fait, comme *in vivo*, à une dessiccation très progressive des embryons qui permet d'optimiser les phases tardives de leur développement. Il en résulte une amélioration importante des taux de germination et de conversion.

La phase de germination proprement dite est facilitée, elle aussi, en immersion temporaire. Il est cependant nécessaire de revenir alors à des rythmes d'immersion plus élevés : quatre fois 15 minutes par jour. Comme pour le caféier, les plantules ont un aspect qui se rapproche de celui des plan-

(1) Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

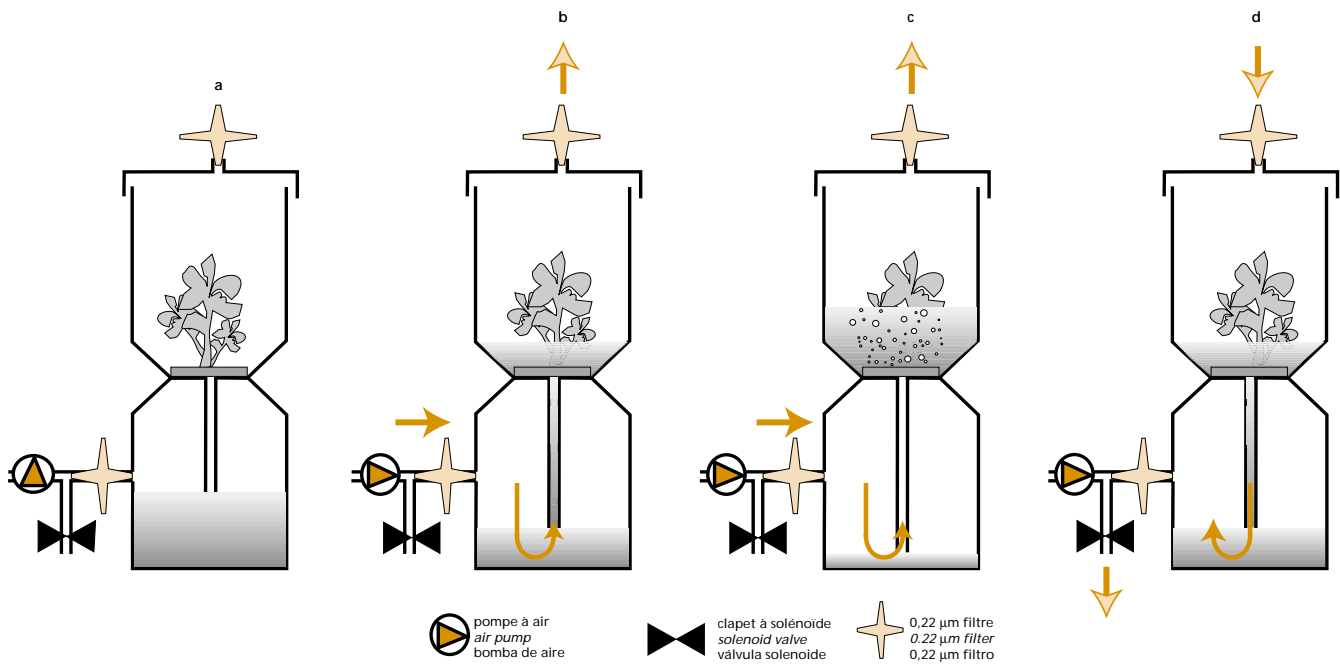


Figure 1. Principe du système de culture par immersion temporaire :

a : le milieu de culture se trouve dans le compartiment bas ; **b et c** : la mise sous pression de ce compartiment refoule la solution dans le compartiment haut, submergeant ainsi les plantules qui s'y trouvent ; **d** : lorsque la pression cesse, le milieu redescend dans le compartiment bas.

L'utilisation d'un clapet à solénoïde dans le circuit d'air accélère le retour du milieu vers le compartiment bas.

Principle of the temporary immersion liquid culture system: a: the culture medium is in the lower compartment; b and c: putting this compartment under pressure forces the solution into the upper compartment and immerses the plantlets there; d: when the pressure is released the medium flows back into the lower compartment.

The use of a solenoid valve in the air circuit accelerates the return of the medium to the lower compartment.

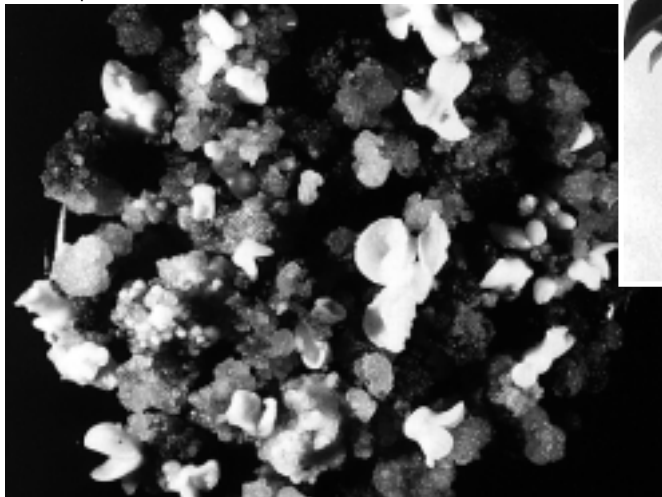
Principio del sistema de cultivo por inmersión temporaria: **a**: el medio de cultivo se encuentra en el compartimiento más bajo ; **b y c**: al poner este compartimiento bajo presión se expulsa la solución en el compartimiento superior, en el que sumergen así las plántulas ; **d**: cuando se termina la presión, el medio vuelve a bajar en el compartimiento bajo.

La utilización de válvula solenoide en el circuito del aire acelera el regreso del medio en el compartimiento inferior.

Photo 1. Microbouture d'hévéa.

Hevea microcutting.

Micro reproducción de estaca de hevea.



Biotrop



Biotrop

Photo 2. Microbouture de caféier.

Coffee microcutting.

Micro reproducción de estaca de cafeto.

tules issues de graines par le développement des cotylédons, la qualité du système racinaire, et l'absence de vitrification.

Micropropagation du bananier

Le bananier est la plante vivrière qui est la plus intensément multipliée, dans le monde, par des techniques *in vitro*. Le procédé classique fait appel à la prolifération de méristèmes. La comparaison de la prolifération en milieu semi-solide avec différents types de milieu liquide (immersion permanente avec ou sans bullage, immersion partielle, support de cellulose ou immersion temporaire) a montré que l'immersion temporaire donnait les meilleurs résultats, tant en termes de taux de prolifération que de gain de matière sèche.

Paramètres physiques

L'originalité du système, et donc son efficacité, réside surtout dans l'environnement physique des plantes.

L'humidité relative, dans le compartiment contenant les plantes, est toujours proche de la saturation et ceci quels que soient le rythme et la durée d'immersion. Cet état est dû en particulier à la rétention de milieu par capillarité à la surface des plantes et du récipient. La persistance d'un film capillaire de milieu, à la surface des

tissus, rend possible la nutrition en dehors des périodes d'immersion, mais perturbe moins les échanges gazeux qu'une immersion totale. Elle explique l'absence de dommages sur les plantes, même avec des immersions très rares et brèves.

Le faible volume du récipient et le caractère hydrophobe des événements contribuent aussi à cette humidité relative constamment élevée.

Les échanges gazeux entre l'intérieur et l'extérieur du récipient, dont l'importance est bien connue en culture de tissus, ont essentiellement lieu pendant la phase d'immersion. Dans nos conditions expérimentales les plus fréquentes, les flux d'air appliqués assurent un renouvellement complet de l'atmosphère de culture après cinq minutes d'immersion.

Conclusion

Les expériences brièvement décrites ici ne sont qu'une illustration de celles qui ont été réalisées. D'autres résultats satisfaisants peuvent être mentionnés, en particulier sur le palmier à huile (*Elaeis guineensis*), avec l'obtention, à partir de suspensions embryogènes, de plantules individualisées, ou sur le mandarinier (*Citrus deliciosa*), avec l'obtention d'embryons somatiques d'une morphologie proche de celle des embryons zygotiques.

De façon générale, le comportement des plantes paraît beaucoup plus proche du comportement «normal» (*ex vitro*) que du comportement perturbé, souvent rencontré en culture *in vitro*. L'absence de phénomènes d'hyperhydricité et de vitrification est particulièrement remarquable. Cet état s'explique par une mise à disposition des éléments nutritifs meilleure qu'en milieu semi-solide, le maintien dans une ambiance continuellement saturée en humidité et une perturbation minimale des échanges gazeux.

Le système décrit évite le recours à des bioréacteurs d'une technologie souvent complexe. Il est peu onéreux et d'un emploi à la fois simple et souple.

Son intérêt peut être simplement illustré par l'évolution de son utilisation au sein du laboratoire de culture *in vitro* de Biotrop. Pour les différents chercheurs qui ont eu l'occasion de le tester, il tend à remplacer de plus en plus tous les procédés conventionnels et plus de 500 de ces unités ont été mises en service.

L'appareil utilisé jusqu'à maintenant est un appareil détourné de sa fonction originale, et il peut être, parfois, d'un usage délicat en culture *in vitro* des végétaux. Nous avons donc conçu un nouveau récipient fonctionnant sur le même principe mais spécifiquement adapté à ce type de manipulations. Il sera commercialisé au cours du deuxième semestre 1995. ■

In vitro culture by temporary immersion: a new device

Teisson C.¹, Alvard D.¹, Berthouly M.², Cote F.¹, Escalant J.V.³, Etienne H.²

¹ CIRAD-GERDAT, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

² CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

³ CIRAD-FLHOR, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France

Using a liquid medium for *in vitro* culture has definite economic advantages: reduced handling, the medium is easier to change, savings on gelling agents. The research prompted by these advantages has led to the development of different techniques and more or less complicated culture devices.

One of the most effective ways of using liquid media whilst avoiding the main drawback (lack of oxygen, excess water) is to immerse the explants briefly rather than continually. To this end, the Biotrop *in vitro* culture laboratory (CIRAD¹) developed a small, economical device that is easy and above all flexible to use.

Operating principle

The device used for the initial experiments is a readily available autoclavable filtration unit, modified by linking the upper and lower compartments by a glass tube. The unit is operated in the opposite way to filtration units in general: the plant material is placed in the upper part and the liquid medium in the bottom (figure 1). When the lower compartment is pressurized, using a small laboratory air pump, the medium is pushed up the glass tube into the upper compartment. A simple timer switch is used to control the frequency and duration of pump operation, hence of immersion. When the pressure is released, the liquid naturally flows back down again. The air blown around the container throughout the immersion period renews the internal atmosphere. All the air flows are sterilized by 0.2µ hydrophobic vents.

Each system is therefore independent and can be moved individually.

Examples of use

Coffee microcuttings

Coffee (*Coffea arabica* or *canephora*) microcutting involves using cytokinins to

trigger axillary bud development on orthotropic nodes, followed by multiplication by subdividing the orthotropic shoots obtained subsequently. In a gel medium, multiplication is relatively slow: the multiplication coefficient is 6 to 7 every three months. With temporary immersion, this same rate is achieved in five weeks, with four 15-minute immersion periods every 24 hours. Lower immersion frequencies and shorter periods are less effective, and increased immersion leads to abnormalities due to excess water in the tissues.

This output opens up new prospects for the large-scale micropropagation of *Coffea arabica*, particularly for valorizing the new hybrids created by genetic improvement programmes, much more rapidly than by distributing seeds.

Embryogenesis of coffee

Somatic embryogenesis of *Coffea* sp. has been possible for some years now. The calli obtained from leaf tissues are friable and can therefore be kept in a stirred liquid medium. Somatic embryos are produced after transfer to a cytokinin-enriched medium. Irrespective of the frequency and duration of immersion, the new system produces embryos much more rapidly than in a stirred liquid medium. Moreover, the embryos are of much better quality, and continue to develop until they germinate *in vitro* and their cotyledons are sufficiently large to enable substantial photosynthetic activity and direct transfer to the greenhouse.

Embryogenesis of hevea

Somatic embryogenesis of *Hevea brasiliensis* is achieved after callogenesis on the integument lining the testa of young fruits. Temporary immersion has proved propitious at various stages of the procedure.

During somatic embryogenesis expression from friable calli, immersion for one minute twice a day produced fifteen times as many embryos as in a gel medium, and the embryos were of much better quality.

Maturation, which is essential for conversion into plantlets, is possible with particularly short immersion times: one minute per week. In the same way as *in vivo*, this short period ensures that the embryos dehydrate very gradually, hence optimizing subsequent development. Germination and conversion rates are significantly improved.

The germination stage proper is also easier with temporary immersion, but calls for more frequent and longer immersion periods: four times 15 minutes per day. As with coffee, the plantlets produced look similar to those obtained from seed, in terms of cotyledon development, root system quality and the absence of vitrification.

Micropropagation of banana

Banana is the food crop most commonly multiplied *in vitro* worldwide. The conventional procedure relies on meristem proliferation. A comparison of proliferation in a gel medium with different types of liquid medium (permanent immersion with or without bubbling, partial immersion, cellulose substrate or temporary immersion) showed that temporary immersion gave the best results in terms of both the proliferation rate and the increase in dry matter weight.

Physical parameters

The novelty of this system, hence its efficacy, primarily concerns the plants' physical environment.

The relative humidity in the compartment containing the plants is always close to saturation, irrespective of immersion frequency and duration, primarily since some of the medium is retained by capillarity on the surface of the plants and the container. The fact that there is constantly a film of medium on the tissue surface enables nutrition when the plants are not immersed, but is less of a hindrance to gas exchanges than total immersion. This explains why the plants

(1) Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

remain undamaged even when immersed very rarely or briefly.

The small size of the container and the fact that hydrophobic vents are used also contribute to this constantly high relative humidity.

Gas exchanges between the inside and outside of the container, which are known to be extremely important for tissue culture, essentially take place during immersion. Under the experimental conditions we used most often, the air passed through the system ensured complete renewal of the culture atmosphere after five minutes' immersion.

Conclusion

The experiments described briefly here give only a rough picture of all those carried out.

Other promising results have been obtained, particularly on oil palm (*Elaeis guineensis*), for which individualized plantlets have been obtained from embryogenic suspensions, or on mandarin (*Citrus deliciosa*), which gives somatic embryos with a morphology extremely similar to that of zygotic embryos.

Generally speaking, plant development seems to be much more like the «normal» (*ex vitro*) pattern than the abnormal development often seen with *in vitro* culture. The absence of excess water and vitrification is particularly noteworthy. This situation can be attributed to the increased nutrient availability compared to gel media, the fact that the plants are kept in a humidity-saturated atmosphere and the limited hindrance of gas exchanges.

The system described avoids the need to use bioreactors, which are often complex. It is cheap and both easy and flexible to use.

The merits of the device are proved by its introduction at the Biotrop *in vitro* culture laboratory. The researchers who have tested it are increasingly using it to replace conventional procedures, and more than 500 devices have been supplied.

The device used until now was an existing container diverted from its original use, which can sometimes be tricky to use for plant *in vitro* culture. We have therefore developed a new device that works along the same lines but is specifically adapted to this type of operation, and are planning to market it during the second half of 1995. ■

Cultivo *in vitro* por inmersión temporaria: un nuevo recipiente

Teisson C.¹, Alvard D.¹, Berthouly M.², Cote F.¹, Escalant J.V.³, Etienne H.²

1 CIRAD-GERDAT, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, Francia

2 CIRAD-CP, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, Francia

3 CIRAD-FLHOR, BP 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, Francia

El emplear un medio líquido en cultivo *in vitro* ofrece ventajas económicas ciertas: reducción del trabajo manual, cambio de medio más fácil, ahorro de gelatinizante. Las investigaciones inducidas por estas ventajas llevaron a concebir distintas técnicas y recipientes de cultivo, más o menos complejos.

Una de las formas más eficaces de utilizar el medio líquido, evitando al mismo tiempo sus mayores inconvenientes (asfixia e hiperhidricidad de los tejidos), consiste en inmergir los explantes de manera transitoria más bien que continua. Con este objetivo y con miras a privilegiar antes que nada la flexibilidad de utilización, el laboratorio de cultivo *in vitro* de Biotrop (CIRAD¹) ha concebido un aparato pequeño, barato y de un funcionamiento sencillo.

Principio de funcionamiento

El recipiente utilizado para los primeros experimentos es una unidad de filtración

autoclavable vendida en el comercio. Fue modificada juntando los compartimientos alto y bajo por medio de un tubo de vidrio. El conjunto opera en sentido inverso del funcionamiento usual de la unidad de filtración: las plantas se colocan en la parte alta y el medio líquido en la parte baja (figura 1). Cuando se coloca el compartimiento inferior bajo presión, mediante una bomba de aire de laboratorio, el medio es expulsado en el compartimiento alto a través del tubo de vidrio. Un simple enchufe programable controla la frecuencia y la duración del funcionamiento de la bomba, y por consiguiente la frecuencia y la duración de las inmersiones. Cuando se termina la presión excesiva, el líquido vuela a descender por gravedad. La corriente de aire que barre el recipiente durante todo el tiempo de la inmersión permite que se renueve la atmósfera interna del recipiente. Todos los flujos de aire son esterilizados por pequeñas aberturas para ventilación hidrófobas de 0,2 µ.

Cada aparato se halla de este modo aislado y puede ser desplazado individualmente.

Ejemplos de aplicación

Micro reproducción de estacas del cafeto

La micro reproducción de estaca del cafeto (*Coffea arabica* o *canephora*) se realiza induciendo, por citoquininas, el arranque de las yemas axilares sobre nudos ortotropos. La multiplicación está asegurada por subdivisión de los rebrotes ortotropos sucesivamente logrados. En medio semi-sólido, la multiplicación es relativamente lenta: el coeficiente de multiplicación es de 6 a 7 cada tres meses. Al utilizar la inmersión temporaria, la misma tasa se logra al cabo de cinco semanas. Este óptimo ha sido logrado con un ritmo de inmersión de cuatro veces 15 minutos por 24 h; frecuencias y tiempos de inmersión más bajos no permiten alcanzar semejante eficacia mientras que inmersiones mayores acarrear anomalías provocadas por un exceso de agua en los tejidos.

Este rendimiento permite examinar la micropropagación masiva de *Coffea arabica* bajo un enfoque totalmente nuevo y, especialmente, valorizar los nuevos híbridos creados en los programas de mejoramiento

(1) Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement.

genético, mucho más rápidamente que mediante el reparto de semillas.

Embriogénesis del café

Desde hace varios años, se domina la embriogénesis somática de *Coffea* sp.. La friabilidad del callo logrado a partir de tejidos foliares permite su paso y su mantenimiento en medio líquido agitado. Se producen los embriones somáticos después de trasladarlos en un medio enriquecido de citoquininas. Cualesquiera que sean los ritmos y los tiempos de inmersión, el sistema permite una obtención de embriones mucho más rápida que con el medio líquido agitado. La calidad de los embriones logrados resulta mucho mejor. Especialmente, estos prosiguen su desarrollo hasta la germinación *in vitro* y el tamaño de sus cotiledones permite una buena actividad fotosintética y un traslado directo en invernadero.

Embriogénesis del hevea

La embriogénesis somática de *Hevea brasiliensis* es inducida después de callogénesis sobre tegumentos internos de jóvenes frutos. La utilización de la inmersión temporal se reveló favorable en las distintas etapas del proceso.

Durante la manifestación de la embriogénesis somática a partir de callo friable, inmersiones de un minuto, dos veces por día, permitieron una producción de embriones 15 veces más numerosos que en medio semi-sólido y de una calidad muy superior.

La maduración necesaria en el transcurso de la conversión en plántulas se realiza mediante tiempos de inmersión especialmente bajos: una minuta por semana. Este ritmo conduce en realidad, como *in vivo*, a una desecación muy progresiva de los embriones que permite optimizar las fases tardías de su desarrollo. Resulta de ello un notable mejoramiento de las tasas de germinación y de conversión.

La fase de germinación propiamente dicha resulta facilitada, ella también, en inmersión temporal. Sin embargo es preciso volver entonces a ritmos de inmersión más altos: cuatro veces 15 minutos por día.

Como para el café, las plántulas tienen un aspecto que se parece al de las plántulas oriundas de semillas, en el desarrollo de los cotiledones, la calidad del sistema radical, y la ausencia de vitrificación.

Micropropagación del banano

El banano es la planta alimenticia que más se multiplica, en el mundo, por técnicas *in vitro*. El procedimiento clásico recurre a la proliferación de meristemas. La comparación de la proliferación en medio semi-sólido con diferentes tipos de medio líquido (inmersión permanente con o sin burbujeo, inmersión parcial, soporte de celulosis o inmersión temporal) mostró que la inmersión temporal daba los mejores resultados, tanto en términos de tasa de proliferación como de ganancia de materia seca.

Parámetros físicos

La originalidad del sistema, y por lo tanto su eficacia, radica sobre todo en el entorno físico de las plantas.

La humedad relativa, en el compartimiento que contiene las plantas, está siempre cercana de la saturación y esto cualesquiera que sean el ritmo y el tiempo de inmersión. Este estado se debe especialmente a la retención de medio por capilaridad en la superficie de las plantas y del recipiente. La permanencia de una película capilar de medio, en la superficie de los tejidos, posibilita la nutrición fuera de los períodos de inmersión, pero perturba menos los intercambios gaseosos que una inmersión total. Explica la ausencia de daños en las plantas, incluso con inmersiones breves y muy poco frecuentes.

El poco volumen del recipiente y el carácter hidrófobo de las pequeñas aberturas para ventilación, contribuye también a esta humedad relativa, constantemente alta.

Los intercambios gaseosos entre el interior y el exterior del recipiente, cuya importancia bien se conoce en cultivo de tejidos, tienen lugar esencialmente durante la fase de inmersión. Dentro de nuestras condiciones experimentales más frecuentes, los flujos de aire aplicados aseguran un cambio

completo de la atmósfera de cultivo después de cinco minutos de inmersión.

Conclusión

Los experimentos brevemente descritos aquí no son más que una ilustración de los que se realizaron. Pueden mencionarse otros resultados satisfactorios, especialmente para la palma aceitera (*Elaeis guineensis*), con la obtención, a partir de suspensiones embriogénicas, de plántulas individualizadas, o para el mandarino (*Citrus deliciosa*), con la obtención de embriones somáticos de una morfología parecida a la de los embriones zigóticos.

Por lo general, el comportamiento de las plantas parece asemejarse mucho más al comportamiento «normal» (*ex vitro*) que al comportamiento perturbado, que se encuentra a menudo en cultivo *in vitro*. La ausencia de fenómenos de hiperhidricidad y de vitrificación resulta particularmente relevante. Este estado se explica por una mejor puesta a disposición de los elementos nutritivos que en medio semi-sólido, el mantenimiento en un ambiente continuamente saturado de humedad y una perturbación mínima de los intercambios gaseosos.

El sistema descrito evita que se recurra a bioreactores de una tecnología a menudo compleja. Resulta poco oneroso y de un empleo a la vez sencillo y flexible.

Su interés puede ser sencillamente ilustrado por la evolución de su utilización en el laboratorio de cultivo *in vitro* de Biotrop. Para los diferentes investigadores que tuvieron la oportunidad de probarlo, tiende a sustituir cada vez más todos los procedimientos convencionales y se pusieron en servicio más de 500 de estas unidades.

El aparato utilizado hasta ahora es un aparato alejado de su función original, y a veces, puede resultar complejo utilizarlo, en cultivo *in vitro* de las plantas. Por lo tanto hemos concebido un nuevo recipiente que funciona sobre el mismo principio pero específicamente adaptado a este tipo de manipulaciones. Se comercializará en el transcurso del segundo semestre de 1995. ■