Micropropagation du lilas par encapsulation de bourgeons

Encapsulation of buds as tool for micropropagation of lilac

F. DAGUIN, E. REFOUVELET, L. FOREST, R. LETOUZE

Laboratoire de Recherches en Physiologie Végétale des Pays de la Loire (LRPV)
16, boulevard Lavoisier, 49045 Angers cedex 01
Tél : 33 22 41 48 21 10 • Fax : 33 2 41 73 93 09 • Email : florencedaguin@aol.com

Résumé : Des bourgeons axillaires de trois variétés de lilas cultivées *in vitro* ont été encapsulés dans des billes d'alginate. Les meilleures conditions de reprise de croissance des explants ont été obtenues en plaçant les encapsulations en microplaques 24-puits sur un milieu gélosé contenant le milieu de MS avec macroéléments dilués de moitié. Le pourcentage de reprise est alors de 83 à 100% selon les variétés. Lorsqu'un stockage des encapsulations à 5°C est réalisé, le taux de reprise des explants après 50 jours reste supérieur à 75%. Une procédure de préacclimatation a été développée en conditions non stériles avec traitement antimicrobien, fertilisation foliaire et renouvellement croissant de l'air dans l'enceinte. Ces traitements permettent l'endurcissement des plants qui peuvent être transférés en serre sans phase d'hygrométrie saturante. Dans ces conditions, le taux d'enracinement des plants après 21 jours en serre atteint 81%.

Mots clés : *Syringa vulgaris*, ornemental, ligneux, bio-encapsulation, semence artificielle, conservation, acclimatation

Abstract : *Axillary buds from three micropropagated varieties of lilac were encapsulated in alginate beads. Best explant regrowth conditions were obtained by culturing the encapsulations in 24-well microplates on MS agar-gelled medium containing macronutrients diluted by half. The regrowth rate could reach 100% depending on cultivars and macronutrient concentration. When encapsulations were stored at 5°C, explant regrowth rate after 50 days remained above 75%. A pre-acclimatisation procedure was developed under non-sterile conditions, with antimicrobial treatment, leaf fertilisation and progressively increased air renewal in the enclosure. One tested treatment allowed survival, growth and hardening of 95% of the plantlets, so they could be transferred to the greenhouse without requiring a saturated humidity stage. For such plantlets, the rate of rooting after 21 days in the greenhouse reached 81%.*

Keywords : *Syringa vulgaris, ornamental, ligneous, bio-encapsulation, synthetic seed, storage, acclimatisation*

1 Introduction

Pour le lilas (*Syringa vulgaris* L.) dont les variétés sont des clones, maîtriser les méthodes de multiplication végétative est essentiel. En pépinière, le greffage reste souvent pratiqué. Deux inconvénients sont cependant associés à cette technique : des coûts de production élevés et la formation intempestive de rejets sur le porte-greffe.

La micropropagation du lilas *in vitro* permet en principe la multiplication efficace des clones par microbouturage (Einset et Alexander, 1984). Toutefois, à l'heure actuelle, une part restreinte de la production annuelle est issue de multiplication *in vitro* proprement dite. Cette technique qui peut constituer un outil puissant pour la propagation de masse (Daguin et Letouzé, 1997) et le développement de différentes biotechnologies, reste d'usage assez limité chez les ligneux ornementaux (Ríordáin, 1992). Pour le cas spécifique du lilas, plusieurs raisons peuvent être invoquées : (1) de faibles taux de multiplication pour certains clones ; (2) des difficultés d'acclimatation ; (3) les exigences des pépiniéristes qui souhaitent être livrés au cours d'une période limitée de l'année (mai-juin) d'où des difficultés de gestion du travail et des salles de culture *in vitro* ; (4) les coûts de production prohibitifs imposés par ces différentes contraintes.

Développer et proposer de nouveaux itinéraires de production valables pour la multiplication en masse par culture *in vitro* est nécessaire. La voie des semences artificielles paraît raisonnablement prometteuse : encapsulation, stockage et reprise de croissance d'un matériel très homogène font entrevoir la possibilité d'une production de masse avec automatisation des procédures. Appliqué initialement uniquement aux embryons somatiques (Redenbaugh *et al*., 1986), le terme de semence artificielle (ou semence synthétique) englobe aujourd'hui toute unité végétative de propagation encapsulée. Le concept s'étend donc désormais à des espèces pour lesquelles la régénération par embryogenèse somatique n'est pas encore maîtrisée (Machii, 1992 ; Piccioni et Standardi, 1995).

Nous décrivons ici des expériences portant sur des bourgeons axillaires de lilas, encapsulés dans des billes d'alginate. L'étude a pour objectif d'accroître les potentiels de la micropropagation *in vitro* du lilas en développant les trois aspects suivants : (1) maîtriser la reprise de croissance de bourgeons axillaires encapsulés ; (2) déterminer les conditions de stockage des bourgeons pendant plusieurs semaines au froid et mesurer l'effet de l'encapsulation ; (3) réaliser un endurcissement et une préacclimatation des plants obtenus.

2 Matériel et méthodes

2.1 Matériel végétal

Les variétés 'Mme Lemoine', 'Katherine Havemeyer' et 'Comtesse d'Harcourt' ont été utilisées. Des boutures à un nœud sont cultivées *in vitro* classiquement sur le milieu A (Einset et Alexander, 1984) défini dans le tableau n°1 et ayant pour base les éléments de Murashige et Skoog. Le pH des milieux est ajusté à 5.8. Les conditions de culture en salle sont toujours : 14 h d'éclairement (35 $\mu mol/m^2/s$) à 24°C/10 h d'obscurité à 21°C. Les bourgeons axillaires utilisés sont prélevés sur des vitroplants âgés de 80 jours environ. Chaque explant comporte un fragment du pétiole et de la tige et constitue au sens morphologique un écusson de 2-3 mm.

2.2 Encapsulation en billes d'alginate

Les bourgeons sont placés dans le milieu B (cf Tableau n°1). Chaque explant est ensuite prélevé dans une goutte de cette solution puis plongé dans du $CaCl_2$ 50 mM. Après polymérisation de l'alginate de calcium, l'écusson se trouve emprisonné dans une bille de gel d'un diamètre de 4 à 5 mm (cf Photo n°1a). Un premier test de capacité à la reprise de croissance a été effectué en plaçant les explants encapsulés dans les conditions habituelles utilisées pour les vitroplants de lilas (milieu A, cf Tableau n°1).

2.3 Culture sur plots de cellulose

Le système Sorbarod® a été testé (plots de 10 x 20 mm). Chaque boîte contenant 64 plots reçoit 300 ml du milieu C (cf Tableau n°1).

2.4 Culture en microplaques

Les explants encapsulés sont placés dans des microplaques (Greiner®) 24-puits, chacun ayant un diamètre de 15 mm et une hauteur de 17 mm. Chaque puits reçoit 0.5 ml de milieu liquide E ou 1 ml des milieux gélosés A ou D (cf Tableau n°1). A titre de témoin, des bourgeons qui n'ont pas été encapsulés sont placés uniquement sur les milieux gélosés.

Milieu	**Composition par litre**
Base	MS macroéléments. oligo-éléments et Na-FeEDTA ; saccharose 30 g ; myo-inositol 100 mg ; thiamine 1 mg ; Ca-panthotenate 1 mg ; biotine 0.1 mg ; pyridoxine-HCl 1 mg
A	Base + agar 7 g + BAP 5 mg + ANA 0.01 mg
B	Base avec les macroéléments MS au 1/2 + Na-alginate 20% (p/v) + BAP 5 mg + ANA 0.01 mg
C	Base + BAP 1mg + AIB 0.2 mg
D	Base avec les macroéléments MS au 1/2 + BAP 5 mg + ANA 0.01 mg + agar 7 g
E	D – agar

Tableau n°1 : Milieux de culture utilisés

2.5 Stockage au froid

Des microplaques contenant des explants encapsulés ou non sont stockées à l'obscurité à 3 ou 5°C sur milieu D.

2.6 Préacclimatation et transfert en serre

Lorsque les microplants cultivés en microplaques présentent 2 à 3 paires de feuilles bien développées, le transfert en enceinte de préacclimatation (cf Figure n°1) est effectué et les microplaques sont ouvertes.

Différents traitements en pulvérisation ont été testés durant cette phase. Un effet antimicrobien est recherché avec l'utilisation de p-hydroxybenzoate de méthyle en solution à 3‰ (w/v). L'antimicrobien

est dissous dans l'eau ou directement dans une solution nutritive Plantprod® (Fertil, France) d'équilibre N/P/K 22/11/22 ou 22/21/24 à 2 g/l.

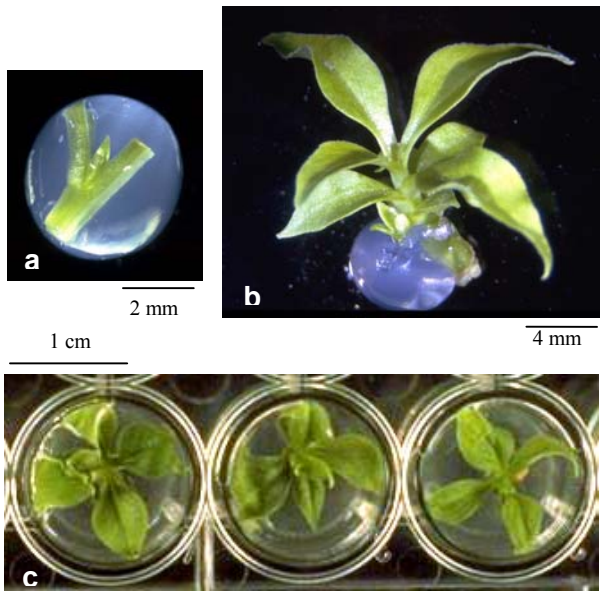

Photo n°1 : a, bourgeon axillaire encapsulé dans une bille d'alginate ; b, microplant 5 semaines après la reprise de croissance ; c microplants en culture

Les microplants restent 16 jours maximum en préacclimatation. Avant repiquage sur Steckmedium® (Klasmann, Allemagne), ils sont traités à l'aide d'un fongicide (Sanix®, 10% w/v). La base des pousses non enracinées est traitée au Rhizopon® à 1% d'AIB (Rhizopon B.V., Pays-Bas). Les pousses préacclimatées sont transférées en serre (HR ~65%, température 20-30°C) sans autre précaution particulière. Des microplants témoins, qui n'ont pas été préendurcis sont placés en hygrométrie saturante pendant deux semaines puis exposés progressivement à l'air ambiant de la serre.

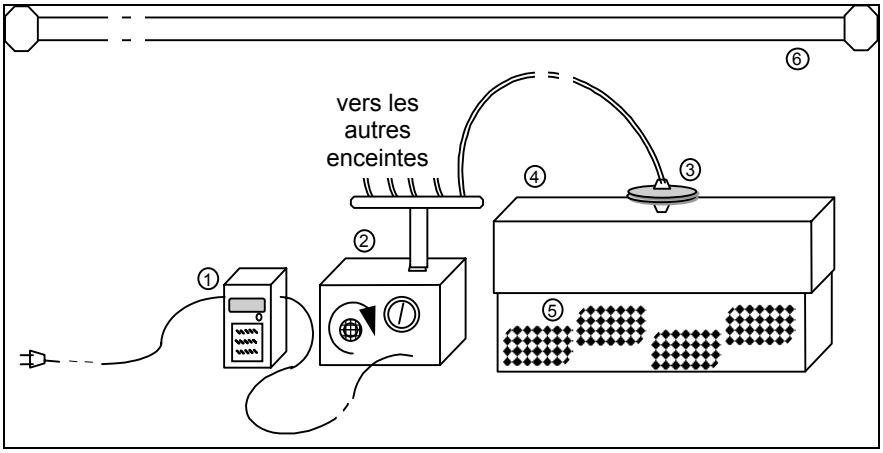

Figure n°1 : Dispositif de pré-endurcissement. 1, Programmateur horaire ; 2, pompe à air ; 3, disque filtrant 0.2 µm ; 4, enceinte de préacclimatation ; 5, microplaques ouvertes; 6, éclairage fluorescent

2.7 Traitement des données

Les expériences ont été effectuées en majorité sur 48 explants (2 microplaques) puis confirmées en utilisant 6 à 8 microplaques pour chaque point de mesure. Sauf spécification, les résultats expriment la moyenne de deux répétitions. Les données sont traitées par analyse de variance après transformation par arcsin√% et test bilatéral de comparaison des moyennes de Student au seuil d'erreur de 5%.

3 Résultats

3.1 Reprise de croissance des bourgeons encapsulés

Les explants encapsulés présentent un taux de survie très faible lorsqu'ils sont replacés immédiatement dans les conditions habituelles de culture *in vitro* (cf Tableau n°2). Dans ce cas, 15% seulement des explants montrent une reprise de croissance suffisante (cf Photo n°1b). L'utilisation du système Sorbarod® a conduit à des résultats quantitativement meilleurs. L'utilisation de ce type de support cause cependant certains problèmes : (1) augmentation des contaminations en raison du nombre élevé (64) d'explants encapsulés par boîte ; (2) difficulté d'appréciation du niveau adéquat d'imbibition du substrat. Des conditions plus satisfaisantes pour la reprise de croissance des bourgeons encapsulés ont donc été recherchées.

Variété	Conditions	Milieu	Microplant avec 3 paires de feuilles (%)	
'Mme Lemoine'	*In vitro*	A	15	
	Sorbarod	C	52	
	Microplaque	A	100	
		D	96	
'Katherine Havemeyer'	Microplaque	A	11	b
		D	78	a, b
'Comtesse d'Harcourt'	Microplaque	A	98	
		D	84	a

Tableau n°2 : Pourcentage de reprise de croissance après encapsulation. Résultats après 5 semaines. Seuls les microplants qui présentent 3 paires de feuilles au bout de 5 semaines sont pris en compte. a, résultat différent des résultats pour la même variété sur un autre milieu ; b, résultat différent des autres variétés en condition identique

L'utilisation des microplaques 24-puits est apparue intéressante, car elle permet de traiter des effectifs suffisants d'explants encapsulés, dans des conditions faciles de manipulation et de culture (faibles surface et volume occupés, matériel stérile jetable, automatisation possible de la distribution des milieux nutritifs liquides ou gélosés). Les nœuds encapsulés placés dans ces conditions sur un milieu gélosé appauvri en macroéléments (milieu D) conduisent à des résultats satisfaisants puisque les taux d'obtention d'une pousse feuillée allongée varient de 84 à 100% pour les trois variétés (cf Tableau n°2). Le cultivar 'Katherine Havemeyer' se révèle ici très sensible à une diminution de la concentration en macroéléments. Le milieu MS avec macroéléments dilués au 1/2 gélosé conduit à multiplier par 7 le pourcentage de reprise de croissance. Au bout de 5 semaines, les pousses obtenues par reprise de croissance des bourgeons encapsulés comportent 3 paires de feuilles étalées et l'axe atteint approximativement 15 mm (cf Photo n°1c). Avec un enracinement rapide (supérieur à 85% en 21 jours), ces microboutures peuvent être acclimatées de manière classique en serre avec succès. Leur morphologie plus trapue que celle des vitroplants classiques permet une manipulation aisée. Les

expériences rapportées ici sont les premières, à notre connaissance, faisant appel à l'utilisation de microplaques 24-puits pour l'élongation de microboutures.

3.2 Effet d'un stockage au froid sur les explants encapsulés ou non

Des écussons encapsulés appartenant à deux variétés ont été stockés en microplaques sur milieu D, à 5°C et à l'obscurité avant d'être replacés en condition de reprise de croisssance. Après 50 jours de stockage, les encapsulations restent viables en très grande majorité. La variété 'Mme Lemoine' présente les meilleures aptitudes à la reprise de croissance (83% des explants). Les résultats sont de 75% pour la variété 'Comtesse d'Harcourt'. A titre de témoins, des écussons non encapsulés de cette variété ont été conservés dans les mêmes conditions. On observe que pour ce matériel les taux de reprise de croissance diminuent plus rapidement. Après 50 jours de stockage, 63% seulement des encapsulations sont viables ce qui est différent significativement au seuil d'erreur de 5% des résultats obtenus pour les bourgeons encapsulés (cf Tableau n°3).

La recherche de nouvelles modalités de stockage (conditions, prétraitements, détermination du stade optimal,...) devrait permettre d'augmenter les durées de stockage et les taux de survie après stockage. Machii a montré en 1992 que des bourgeons adventifs de mûrier encapsulés en billes d'alginate pouvaient être stockés 80 jours à 4°C sur milieu liquide minéral de MS additionné de saccharose et de fructose (concentrations finales respectives de 30 et 20 g/l) puis reprendre ensuite à 100% leur croissance. De même, Piccioni et Standardi (1995) indiquent que des bourgeons axillaires de végétaux ligneux peuvent être stockés à 4°C pendant 4 mois avec des taux de reprise satisfaisants.

D'ores et déjà, les résultats obtenus pour le lilas permettent une souplesse relative de production des explants qu'ils soient encapsulés ou non avant leur stockage. La reprise de croissance peut être programmée pour l'ensemble de la production, sans intervention d'une main d'œuvre importante au dernier stade.

3.3 Préacclimatation et transfert en serre

Les expériences ont porté sur la variété 'Comtesse d'Harcourt'. Les microplants obtenus par reprise de croissance des bourgeons (45 jours de culture en microplaques sur milieu A subissent un endurcissement après ouverture des microplaques et transfert dans des conditions non stériles (cf Figure n°1). Pour prévenir le développement de contaminations fongiques et bactériennes sur les milieux contenus dans les puits, le p-hydroxybenzoate de méthyle (à 3 g/l). Au cours des premières expériences, le p-hydroxybenzoate de méthyle a été dissous directement dans la solution nutritive utilisée en pulvérisation foliaire. Les résultats ont alors été négatifs car on a observé une brûlure complète du feuillage des pousses. Par la suite, les traitements ont été modifiés : la solution de p-hydroxybenzoate de méthyle a été préparée avec de l'eau et pulvérisée séparément, juste avant la solution nutritive qui est appliquée jusqu'à ruissellement. Cette procédure permet d'éviter le contact prolongé du p-hydroxybenzoate de méthyle avec la partie aérienne des plantes tout en maintenant son action au niveau du milieu de culture. Dans ces conditions, les essais ont fourni des résultats beaucoup plus satisfaisants pour la survie des microplants.

Les meilleurs résultats sont obtenus avec pulvérisation du p-hydroxybenzoate de méthyle et de solution nutritive tous les 4 jours. En particulier, la solution Fertil® 22/11/22 (N/P/K) a permis d'obtenir 95% de pousses présentant 3-5 paires de feuilles bien développées contre 51% seulement avec la solution 22/21/24 (résultats significativement différents au seuil d'erreur de 5%). A la fin de la phase de préacclimatation, les taux d'enracinement sont toujours inférieurs à 18%. Le transfert en serre du matériel végétal préendurci est effectué sans période d'adaptation préalable supplémentaire. Tous les résultats obtenus ici montrent que, pour le lilas, il est préférable d'utiliser une fertilisation

20/11/22, moins riche en phosphore. Dans ce cas, les taux de reprise en serre sont de 81% contre 58% dans le cas d'utilisation de la solution nutritive 22/21/24. Par ailleurs, ce traitement permet de manipuler en fin de préacclimatation 96% de pousses qui n'ont pas encore formé de racines et sont donc moins fragiles lors des manipulations.

Les résultats de cette étude sur l'effet favorable d'une phase de préendurcissement rejoignent ceux obtenus par Deng et Donnelly (1993) sur l'endurcissement de vitroplants de framboisier, avec cependant dans ce cas, utilisation d'apports en CO2.

Variété	**Stockage (j)**	**Microplants avec 3 paires de feuilles (%)**			
		Encapsulés		*Non encapsulés*	
'Mme Lemoine'	0 (témoin)	100		-	
	15	88	a	-	
	30	79	a	-	
	50	83	a, b	-	
'Comtesse d'Harcourt'	0 (témoin)	100		100	
	15	96		100	
	30	92	a	79	a, c
	50	75	a, b	63	a, c

Tableau n°3 : Effet du stockage au froid sur le pourcentage de reprise des explants encapsulés ou non. Expériences portant sur 6 microplaques de chaque variété. Seules les pousses ou qui présentent 3 paires de feuilles au bout de 5 semaines sont prises en compte. a, pourcentage différent du témoin ; b, pourcentage différent de l'autre variété ; c, pourcentage différent des explants encapsulés

4 Conclusion

Au cours de ce travail, l'encapsulation de bourgeons de lilas a été réussie. Des conditions de reprise de croissance satisfaisantes ont été déterminées et associées à des périodes de stockage. Un schéma de production nouveau, directement applicable au lilas, est donc ainsi défini. Ce schéma fait intervenir au dernier stade de la multiplication *in vitro* l'utilisation d'une entité comportant un seul axillaire, ce qui représente un grand avantage en regard des impératifs de productivité. Dans les conditions définies ici, une très bonne aptitude à la reprise de croissance est obtenue pour ce type d'explant, avec ou sans stockage de plusieurs semaines à 5°C. Globalement, les meilleurs résultats sont obtenus avec les axillaires encapsulés en billes d'alginate de calcium, ce qui justifie l'application d'une technologie de bio-encapsulation. En complément, la phase d'endurcissement progressif du matériel végétal permet de limiter les risques liés à l'acclimatation classique des vitroplants.

Cette nouvelle méthode de production, directement applicable, offre une meilleure souplesse de production de masse et donc une meilleure efficacité en regard des impératifs saisonniers de production en laboratoire de culture *in vitro*.

L'étude plus approfondie des conditions de stockage et/ou des prétraitements à appliquer devrait permettre d'allonger les durées de conservation des bio-encapsulations et d'augmenter les taux de viabilité après stockage. Par ailleurs, les recherches engagées par notre équipe visent à accroître les potentialités d'un tel schéma de production par la maîtrise de méthodes nouvelles de régénération de masse *in vitro* du lilas (organogenèse adventive ou embryogenèse somatique) plus efficaces que le microbouturage classique, sous réserve du maintient de la conformité du matériel produit au matériel d'origine.

Bibliographie

Daguin F., Letouzé R., 1997, Le clonage végétal, *Biofutur*, 193, 1-8

Deng R., Donnelly D.J., 1993, *In vitro* hardening of raspberry by CO2 enrichment and reduced medium sucrose concentration, *Hort. Sci.*, 28, 1048-1051

Einset J.W., Alexander J.H., 1984, Multiplication of *Syringa* species and cultivars in tissue culture, In *Comb. Proc. Plant Prop. Soc.*, 34, 628-636

Machii H., 1992, *In vitro* growth of encapsulated adventitious buds in Mulberry, *Morus alba* L. *Japan J. Breed*, 42, 553-559

Piccioni E., Standardi A., 1995, Encapsulation of micropropagated buds of six woody species, *Plant Cell Tissue Organ. Cult.,* 42, 221-226

Redenbaugh K., Paasch B., Nichol J., Kossler M., Viss P., Walker K., 1986, Somatic seeds, encapsulation of asexual plant embryos, *Bio/Technology*, 4, 797-801

Ríordáin F.Ó., 1992, The european plant tissue culture industry 1990, *Agronomie*, 12 (10), 743-746