

Production de microtubercules de pomme de terre de terre *in vitro*: effet de la durée de culture

Công-Linh Lê et Daniel Thomas, Station de recherche Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon
Renseignements: Công-Linh Lê, e-mail: cong-linh.le@acw.admin.ch, tél. +41 22 363 44 22



Photo: ACW

Microtubercules de pomme de terre produits *in vitro* (cv. Bintje).

Introduction

Les microtubercules de pomme de terre (*S. tuberosum* L.) produits *in vitro* sont actuellement utilisés dans de nombreux secteurs de l'agriculture comme matériel pour la recherche (Coleman *et al.* 2001), la conservation des ressources génétiques et la distribution internationale de génotypes cultivés (Estrada *et al.* 1986), ainsi que pour

les systèmes de certification (Slimmon *et al.* 1989). En pratique, les gros microtubercules sont préférés parce qu'ils sont faciles à manipuler et qu'ils produisent des plantes vigoureuses (Wiersema *et al.* 1987). Ils sont en outre moins sujets au dessèchement en conservation, ont une période de dormance courte et un taux de survie élevé lors d'un transfert direct dans le sol (Leclerc *et al.* 1994).

Un article précédent (Lê et Thomas 2009) avait montré qu'après une période de croissance et d'induction *in vitro*, les microboutures de pomme de terre cultivées étaient capables de développer des tubercules au bout de 16 semaines. Cet essai a pour but d'examiner l'effet de la durée de l'exposition des explants de pomme de terre au milieu de culture dans l'amélioration de leur qualité en termes de poids et de taille, pour optimiser leur utilisation en conditions de culture de plein champ (Ranalli *et al.* 1994).

Matériel et méthodes

Des microplantes de pomme de terre (cvs. Bintje, Charlotte, Désirée, Ditta et Urgenta), mutipliées *in vitro* selon les techniques décrites auparavant (Lê 1991), sont utilisées dans ces essais.

La production de microtubercules *in vitro* consiste à cultiver les microplantes de pomme de terre en trois phases différentes:

- **Croissance *in vitro*** : des segments uninodaux (microboutures à un noeud), prélevés sur la plante-mère, sont cultivés sur le milieu de base de Charles *et al.* (1992) auquel sont ajoutés les micro-éléments de Lê et Collet (1985) et 3 % de saccharose. Après ajustement du pH à 5,7 avec du NaOH (0,1N), le milieu nutritif est ensuite autoclavé à 121 °C (1,1 kg/cm² de pression) pendant 15 minutes. Les cultures sont placées dans un environnement climatique où elles reçoivent une photopériode de 16 heures par cycle de 24 heures. L'éclairement est de 80 µmoles/m²/sec au niveau des cultures. La température est maintenue à 22 ± 1°C de jour/18 ± 1°C de nuit.
- **Induction *in vitro*** : le développement des microtubercules s'effectue en soumettant les cultures à une photo-thermopériode courte et alternée (8 h /jour/ 20 °C et 16 h /nuit/12 °C) avec un apport supplémentaire de 8 % de saccharose dans le milieu de culture comme source d'énergie (Lo *et al.* 1972) jusqu'à l'apparition de structures tubérisées sur les stolons.
- **Grossissement des tubercules** : l'installation sur un nouveau milieu nutritif de base contenant 100 mM d'azote sous forme de NH₄NO₃ permet le grossissement des tubercules (Lê et Thomas 2009).

Les cultures sont ensuite transférées dans l'obscurité, à une température de 20 °C, jusqu'à la récolte des microtubercules, après une durée de tubérisation de 16 à 22 semaines.

Résumé La production de microtubercules *in vitro* s'effectue en plusieurs étapes : croissance de la microplante, initiation des stolons et formation des tubercules (ou tubérisation). Durant la phase de tubérisation, il est possible de développer des microtubercules de qualité en termes de poids et de taille. L'essai décrit ici montre que la qualité du matériel produit est encore meilleure lorsque la durée de tubérisation se prolonge au-delà de 16 semaines de culture *in vitro*.

Chaque phase de culture se déroule sur une même quantité de milieu nutritif de 12,5 ml par explant initial. A la fin des essais, les tubercules développés *in vitro* sont récoltés et triés selon les calibres utilisables (> 0,5 cm et plus). L'évaluation des différentes parts de microtubercules utilisables, du nombre moyen de tubercules produits par explant, ainsi que de la taille et du poids frais des microtubercules, est réalisée sur la base des observations de 16 explants par conteneur de culture et par traitement. L'expérience a été répétée trois fois.

Résultats et discussion

Développement de tubercules *in vitro*

La durée de culture des explants uninodaux de pomme de terre pendant la phase de tubérisation a une influence importante sur la qualité des tubercules développés. Les résultats présentés dans la figure 1 montrent que le prolongement de la phase de tubérisation *in vitro* a permis

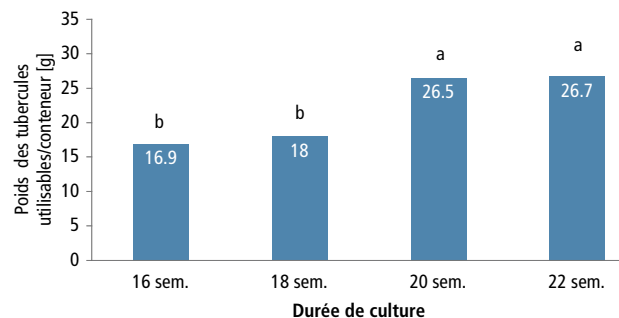


Figure 1 | Effet de la durée de culture sur la production *in vitro* de tubercules utilisables (cv. Bintje). Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ($p = 0,05$).

d'augmenter la masse de microtubercules utilisables dès la vingtième semaine de culture et que cette amélioration tend à se stabiliser après cette période. Toutefois, le nombre de tubercules produits par explant initial demeure inchangé avec les différentes durées de tubérisation (fig. 2). Dans le cas présent, il semble que le nombre de structures tubérisées qui se développent durant la phase d'induction demeure identique pour toutes les périodes de culture. En d'autres termes, aucun nouveau tubercule ne peut être formé après cette phase, le changement intégral des conditions physico-chimiques de l'environnement de culture s'avérant défavorable à cette induction. Ce fait a aussi été remarqué par Leclerc *et al.* (1994). Ces auteurs constatent que la durée de tubérisation n'influe pas sur le nombre de microtubercules produits par explant, malgré un prolongement important de la durée de culture des variétés Kennebec, Superior et Russet Burbank. Dans nos essais, un taux moyen d'environ trois microtubercules utilisables par explant initial a été relevé pour la variété Bintje pour toutes les périodes de tubérisation expérimentées (fig. 2).

Notre procédé de développement de microtubercules *in vitro* est comparable au système de culture de Kämäräinen-Karppinen *et al.* (2010) qui, en prolongeant l'exposition des plantules au milieu de culture, obtiennent effectivement davantage de microtubercules utilisables sur un cycle de culture de 16 semaines. Toutefois, ils constatent que le rendement par explant initial reste encore faible : le taux moyen varie, selon le cultivar, entre 0,7 et 1,4 microtubercules par explant initial et par cycle de culture. Comparativement, notre procédé fournit, pour une même période de tubérisation, deux fois plus de tubercules utilisables. La faible production de microtubercules obtenue par Kämäräinen-Karppinen *et al.* (2010) semble être due à la quantité réduite en éléments nutritifs mise à la disposition des explants initiaux. Ces auteurs ont effectivement apporté un volume de quatre millilitres d'éléments nutritifs par explant en moyenne, contre trois fois plus (12,5 ml/explant) dans cet essai, pour la même durée de culture. En outre, le renouvellement d'éléments nutritifs adaptés à chacune des trois étapes de notre procédé permet également d'augmenter le nombre de tubercules utilisables (Lê et Thomas 2009).

Qualité des microtubercules

L'examen des résultats présentés dans la figure 3 montre que la part des tubercules utilisables pesant moins d'un gramme se réduit à mesure que la durée de culture se prolonge au-delà de seize semaines. A 18 semaines de tubérisation, la part de microtubercules pesant plus d'un gramme n'est pas différente de celle de 16 semaines de

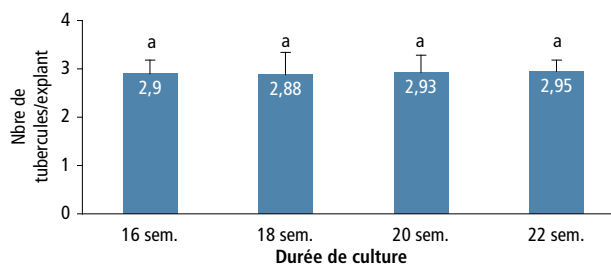


Figure 2 | Effet de la durée de culture sur le développement de tubercules utilisables par explant initial (cv. Bintje). Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes selon le test de Duncan ($p = 0,05$).

culture. En revanche, dès la vingtième semaine, elle augmente de manière significative. Seuls 2 % des microtubercules avaient un poids supérieur à 1 g lors d'un cycle de 16 semaines, contre 14,2 % à la fin de 22 semaines de culture. Ce fait corrobore les résultats de Leclerc *et al.* (1994) montrant l'effet bénéfique de la période d'incubation dans le processus de tubérisation *in vitro* des cultivars Kennebec, Superior et Russet Burbank, et mentionnant un poids frais significativement plus important à 56 jours qu'à 28 jours de culture. En outre, nos essais montrent une amélioration indéniable du volume des tubercules bénéficiant d'une plus longue durée de culture (fig. 4). La part des microtubercules supérieurs à 1 cm s'élève à près de 30 % après 22 semaines de tubérisation (fig. 5). Dans cette étude, l'effet bénéfique de la durée de culture semble également renforcé par le

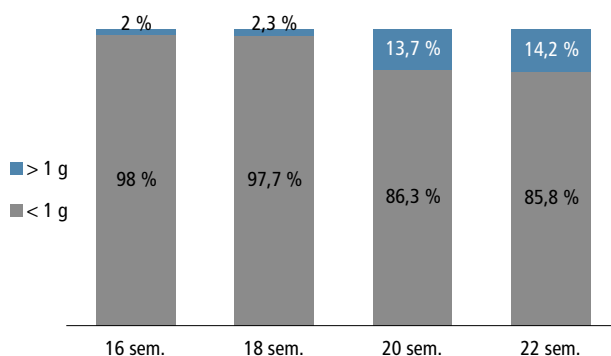


Figure 3 | Répartition des tubercules utilisables (cv. Bintje) selon deux catégories de poids (< 1 g et > 1 g).



Figure 4 | Microtubercules utilisables développés selon les durées de tubérisation. De gauche à droite : 16 et 18 semaines (en haut), 20 et 22 semaines (en bas). La barre représente une longueur de 1 cm.

mode de nutrition pratiqué pendant la période de grossissement des tubercules, en particulier l'apport d'azote supplémentaire sous forme de NH_4NO_3 dans un rapport de 1:4 (Lê et Thomas 2009). Ces résultats confirment les observations de Garner et Blake (1989) qui montrent le rôle important de la nutrition azotée au cours de la tubérisation. Ils soulignent qu'un apport inadéquat en matière d'azote durant cette phase peut entraîner une réduction du poids et de la taille des tubercules. A cet égard, Struik (2007) relève que la grosseur des tubercules produits dépend non seulement des conditions de culture, mais aussi de l'environnement où évolue chaque stolon. Dans nos essais, le micro-environnement des stolons réunissait les conditions optimales pour développer des tubercules de qualité : en particulier, la facilité de s'approvisionner en éléments nutritifs dispensée par un milieu de culture liquide (Debergh 1983) a vraisemblablement favorisé le grossissement des jeunes tubercules en formation, conjointement au prolongement de la durée de tubérisation.

Effet du génotype

L'augmentation du nombre de tubercules de qualité en termes de poids et de taille, obtenue en prolongeant la culture du cultivar Bintje au-delà de 16 semaines, nous a

amenés à réaliser l'expérience avec d'autres génotypes (fig. 6). L'effet de la durée de culture se révèle manifestement bénéfique pour l'ensemble des variétés de pomme de terre expérimentées. Cependant, ces variétés se comportent très différemment vis-à-vis du prolongement de leur séjour en milieu de tubérisation. L'augmentation des microtubercules dépassant un gramme était indéniable chez les variétés Ditta et Désirée, mais beaucoup moins marquée chez Charlotte et Urgenta. Cette différence significative de masse des microtubercules

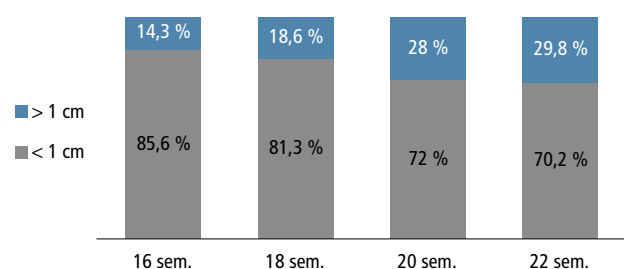


Figure 5 | Répartition des tubercules utilisables (cv. Bintje) selon deux calibres (< 1 cm et > 1 cm).

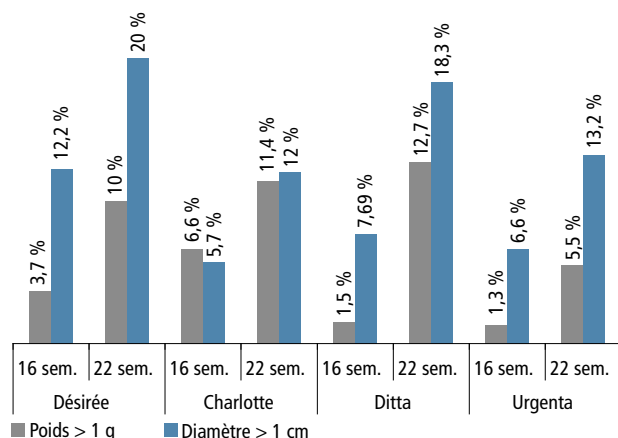


Figure 6 | Influence du génotype de pomme de terre sur la production de microtubercules de qualité.

entre cultivars a été également signalée par Leclerc *et al.* (1994) qui comparaient la variété Russet Burbank aux cultivars Kennebec et Superior lors d'un prolongement de la période de tubérisation de 28 à 56 jours de culture. De même, la taille des tubercules produits durant la phase de grossissement est fortement influencée par le cultivar pour l'ensemble des périodes de tubérisation. Dans cette étude, la part de tubercules d'un diamètre supérieur à un centimètre augmente notablement chez Désirée (20%), suivie de Ditta (18,3%), tandis que, dans les mêmes conditions, les variétés Urgenta et Charlotte développent respectivement 12% à 13,2% de tubercules d'un même calibre. Des caractéristiques particulières liées au génotype pourraient être à l'origine de cette variabilité de tubérisation en milieu de culture contrôlé, comme l'ont souligné Ranalli *et al.* (1994) et Hossain (2005) qui rapportent que le potentiel de microtubérisation des pommes de terre est un caractère dépendant du génotype, lui-même fortement influencé par les facteurs environnementaux.

Conclusions

- Le prolongement de la durée de culture au-delà de 16 semaines n'affecte pas le nombre de tubercules produits par explant initial, mais favorise en revanche l'augmentation de leur biomasse.
- Grâce à une alimentation différenciée durant les phases de tubérisation, le potentiel de production de tubercules utilisables selon notre procédé est élevé par rapport à un système de culture similaire pour une même durée de tubérisation.
- L'amélioration de la qualité du matériel produit *in vitro* se manifeste, dans le cas présent, par une augmentation importante du nombre de microtubercules utilisables en termes de poids (> 1 g) et de taille (> 1 cm).
- La variabilité génotypique des pommes de terre peut entraîner des différences importantes dans l'amélioration de la qualité des microtubercules utilisables. ■

Riassunto**Produzione di microtuberi di patate *in vitro*. Effetto della durata di coltura**

La produzione di microtuberi *in vitro* si effettua in diverse tappe : crescita della micropianta, iniziazione degli stoloni e formazione dei tuberi (detta anche tuberizzazione).

Durante la fase di tuberizzazione è possibile sviluppare microtuberi qualitativamente buoni in termini di peso e di taglia. Questo studio dimostra che la qualità del materiale prodotto è migliore quando la durata della tuberizzazione si estende delle oltre le 16 settimane di coltura *in vitro*.

Summary***In vitro* production of potato microtubers: effect of culture duration**

The *in vitro* production of potato microtubers was carried out through several stages: at first microplant growth, then initiation of stolon followed by tuber formation (or tuberization). During the last stage, it is possible to develop high quality microtubers in terms of weight and size. However, after examination, the quality of plant material produced *in vitro* is so far better when the duration of tuberization is extended over 16 weeks culture.

Key words: *Solanum tuberosum* L., single-node cutting, microtubers, *in vitro* tuberization, culture duration.

Bibliographie

- Charles G., Rossignol L. & M.?, 1992. Environmental Effects on Potato Plants in vitro. *J. Plant Physiol.* **139**, 708–713.
- Coleman W. K., Donnelly D. J. & Coleman S. E., 2001. Potato microtubers as a research tools : A review. *Am. J. Potato Res.* **78**, 47–55.
- Debergh P. C., 1983. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* **59**, 270–276.
- Estrada R., Tovar P. & Dodds J. H., 1986. Induction of in vitro tubers in a broad range of potato genotypes. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* **7**, 3–10.
- Garner N. & Blake J., 1989. The induction and development of potato microtubers in vitro on media free of growth regulating substances. *Annals of Botany* **63**, 663–674.
- Hossein M. J., 2005. In vitro microtuberisation in potato obtained from diverse sources. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* **15** (2), 157–166.
- Kämäräinen-Karppinen T., Virtanen E., Rokka V.-M. & Pirttilä A. M., 2010. Novel bioreactor technology for mass propagation of potato microtubers. *Plant Cell Tiss. & Org. Cult.* **101**, 245–249.
- Lê C. L., 1991. Aspects pratiques de la micropropagation de la pomme de terre (*Solanum tuberosum* L.). *Revue suisse Agric.* **23** (6), 357–358.
- Lê C. L. & Thomas D., 2009. Production de microtubercules de pomme de terre *in vitro*. *Revue suisse Agric.* **41** (5), 289–293.
- Lê C. L. & 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. *Revue suisse Agric.* **17** (4), 221–225.
- Leclerc Y., Donnelly D. J. & Seabrook J. E. A., 1994. Microtuberization of layered shoots and nodal cuttings of potato: the influence of growth regulators and incubation periods. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* **37**, 113–120.
- Lo F. M., Irvine B. R. & 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.
- Ranalli P., Bizarri M., Borghi L. & Mari M., 1994. Genotypic influence on *in vitro* induction, dormancy length, advancing age and agronomical performance of potato microtubers (*Solanum tuberosum* L.). *Ann. Appl. Biol.* **125**, 161–172.
- Slimmon T., Machado V. S. & Coffin R., 1989. The effect of light on *in vitro* microtuberization of potato cultivars. *Am. Potato J.* **66**, 843–848.
- Struik P. C., 2007. Above-ground and below-ground plant development. In: *Potato Biology and Biotechnology-Advances and Perspectives*. Ed. Dick Vreugdenhil, Elsevier, ISBN-13: 978–0–444–51018–1, 000–000.
- Wiersema S. G., Cabello R., Tovar P. & Dodds J. H., 1987. Rapid seed multiplication by planting into beds microtubers and *in vitro* plants. *Potato Res.* **30**, 200–214.