

Cryoconservation d'apex de *Solanum tuberosum* et espèces apparentées par la technique de vitrification en gouttes

Catherine SOUCHET¹
Florence ESNAULT¹
Jean-Eric CHAUVIN¹

CORRESPONDANCE

catherine.souchet@inrae.fr

RÉSUMÉ

Le CRB BrACySol conserve 12 000 accessions de *Solanum tuberosum* et espèces apparentées. La préservation de ces clones est essentielle pour la recherche sur cette espèce. Pour sécuriser, à long terme, la conservation de certains de ces clones, nous avons opté pour la cryoconservation d'apex. Nous avons choisi la méthode de vitrification en goutte en utilisant la solution PVS2 (Plant Vitrification solution 2). Pour *Solanum tuberosum*, nous avons obtenu des résultats satisfaisants avec un taux de régénération moyen de 89 %. Ce taux nous permet d'utiliser cette méthode en routine pour cette espèce. Pour les espèces apparentées, le taux peut varier, selon les génotypes, au sein d'une même espèce. Mais cette méthode nous a permis de valider la cryoconservation de clones appartenant à 21 des 23 espèces testées.

MOTS-CLÉS

Solanum tuberosum, espèces apparentées, cryoconservation, vitrification en goutte, PVS2 (Plant Vitrification solution 2).

¹ INRAE, UMR 1349 Institut de génétique environnement et protection des plantes, F-29260 Ploudaniel, France.

Apex cryopreservation of *Solanum tuberosum* and related species using the droplet vitrification technique

Catherine SOUCHET¹
Florence ESNAULT¹
Jean-Eric CHAUVIN¹

CORRESPONDENCE

catherine.souchet@inrae.fr

ABSTRACT

BrACySol BRC conserves 12,000 accessions of *Solanum tuberosum* and related species. The preservation of these clones is essential for research on this species. To secure the long-term preservation of certain of these clones, we have opted for apex cryopreservation and the droplet vitrification method using the Plant Vitrification solution 2 (PVS2).

Regarding *Solanum tuberosum*, we have obtained satisfactory results with an average regeneration rate of 89%. This rate allows us to use this method routinely for this species. Regarding the related species, the rate can vary according to certain genotypes within the same species. Nonetheless, this method has allowed us to validate the cryopreservation of clones belonging to 21 of the 23 species tested.

KEYWORDS

Solanum tuberosum, related species, cryopreservation, droplet vitrification, PVS2 (Plant Vitrification solution 2).

¹ INRAE, UMR 1349 Institut de génétique environnement et protection des plantes, F-29260 Ploudaniel, France.

Introduction

Un des défis actuels de la recherche et de l'agriculture est la sauvegarde de la diversité génétique pour répondre aux changements climatiques, aux besoins actuels et futurs, aux évolutions des techniques culturales et industrielles ainsi qu'aux réglementations environnementales.

Le CRB BrAcYsol, porté par les unités INRAE IGEPP et RGCO sur le site de Ploudaniel (Finistère), héberge des espèces à propagation végétative appartenant aux genres : *Allium*, *Cynara* et *Solanum* et des espèces à multiplication par graines du genre *Brassica*. Les ressources génétiques de *Solanum* tubéreux représentent environ 12 000 clones appartenant à 32 espèces différentes. Ces pommes de terre et espèces apparentées peuvent être conservées sous forme de tubercules, qui devront être replantés chaque année au champ ou en serre, ou sous forme de boutures *in vitro*, qui devront être repiquées tous les 15 mois.

La charge de travail que représente le maintien de cette collection, les risques de pertes dues aux bioagresseurs, les problèmes climatiques et la diminution du personnel nous ont incités à réfléchir à une méthode de conservation à long terme.

Nous avons recherché une méthode facile à mettre en place, limitant les risques liés aux manipulations, préservant les plantes des contaminations et donnant des plantes conformes à la plante mère.

Nous avons opté pour la cryoconservation d'apex. Cette méthode de conservation à -196°C dans l'azote liquide stoppe toutes les réactions biochimiques, mais doit être précédée de différentes étapes afin de préserver la viabilité des cellules. Du fait de la teneur en eau très importante des cellules, la congélation peut provoquer la mort de ces cellules, lors de leur déshydratation et de la cristallisation de l'eau. Elle peut modifier la structure des membranes. Le stress inhérent à cette technique peut perturber le métabolisme cellulaire.

Pour initier ce travail nous avons bénéficié, en 2003, du soutien financier de l'ex. Bureau des ressources génétiques (BRG) qui nous a permis d'acquérir l'équipement nécessaire.

De 2009 à 2012, nous avons participé au projet Cryoveg financé par le GIS IBISA. Ce projet nous a permis d'échanger avec d'autres utilisateurs de techniques de cryoconservation, d'effectuer un stage à l'IRD de Montpellier pour nous familiariser avec différentes techniques de cryoconservation et nous a apporté un soutien financier pour poursuivre nos travaux.

Nos travaux ont ensuite été soutenus par l'UMT INNOPLANT, de 2012 à 2014, et par le GIS IBISA, de 2014 à 2015, dans le cadre du projet SecureBracysol.

Nous avons expérimenté différentes méthodes :

- **"Droplet Freezing"** (Mix et al., 1984), méthode qui a été abandonnée car, dans nos conditions, les plantes obtenues n'étaient pas conformes au champ.
- **Encapsulation-déshydratation** (Fabre et Dereuddre, 1990), méthode qui a aussi été abandonnée car, dans nos conditions, le taux de régénération était très lié au génotype et les résultats peu répétables.
- Finalement, nous avons opté pour la technique de **« Droplet-vitrification »** (Kim et al., 2006) ou vitrification en goutte que nous utilisons actuellement en routine pour cryoconserver les clones de *Solanum tuberosum*.

Afin de valider la méthode « Droplet-vitrification », la conformité des plantes cryoconservées a été vérifiée en réalisant des notations sur 12 mériclones par clone. Ces observations ont été effectuées au champ, pour les variétés issues de *S. tuberosum*, et en serre, pour les espèces apparentées. Nous avons utilisé 22 descripteurs (levée, hauteur, vigueur, niveau de ploïdie, fertilité, etc.).

Notre objectif, dans un premier temps, est de cryopréserver la collection nationale de pomme de terre, la core collection définie de façon à capturer la diversité allélique de la collection de variétés maintenue au sein du CRB BrAcYsol (Esnault et al., 2016) ainsi que les clones, les plus précieux et les plus difficiles à maintenir, issus des travaux de notre équipe.

Matériels et méthode

En préambule de la cryoconservation des accessions de *Solanum*, nous avons déterminé le nombre d'apex à cryoconserver par clone (100/clone) et le taux de régénération acceptable (60 %) pour sécuriser et valider la cryoconservation d'un clone (Dussert et al, 2003).

Pour respecter les durées des différentes étapes, nous travaillons sur 2 lots de 60 apex par clone. Pour chaque lot, nous cryoconservons 10 à 12 apex témoins (1 boîte de Petri). Ces apex témoins, décongelés au moment de la mise en place, nous permettent de contrôler le taux de survie et de régénération du clone en cours de cryoconservation.

Avant la cryoconservation de chaque clone, nous contrôlons l'état sanitaire, en effectuant des tests ELISA pour vérifier l'absence des virus PVA, PVM, PVX, PVY, PVS et PLRV.

Nous réalisons également un profil moléculaire de ce clone avec les 8 marqueurs SSR qui constituent le kit « Identification variétale » développé par la FN3PT (Marhadour et al, 2014).

Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé est conservé au sein de CRB BrACySol. Nous avons utilisé cette méthode pour cryoconserver :

- 78 clones de *Solanum tuberosum*
- 58 clones appartenant à 23 espèces apparentées (Tableau 1).

Préparation des milieux et réactifs

Les milieux utilisés sont les suivants :

- Milieu Tendille et Lecerf modifié
- Milieu M1 Cryo (Prétraitement) et milieu M2 Cryo (Reprise) utilisés à l'IRD pour les apex d'igname
- Milieu El Cryo
- Solution de vitrification PVS2
- Solution de charge
- Solution de rinçage

Ils sont préparés selon les fiches en annexe 1.

Les milieux gélosés sont stérilisés à l'autoclave pendant 20 min, à 1 bar. Les solutions sont stérilisées en unité de filtration avec des filtres de 0,45 µm.

Préparation des plantes avant le prélèvement des apex

Les plantes *in vitro* sont repiquées au minimum 2 fois, à 3 semaines d'intervalle, en bocaux, sur le milieu Tendille et Lecerf modifié. Selon le génotype choisi et sa sensibilité à l'hygrométrie, on utilisera des bocaux à couvercles aérés (coton) ou non. Lors du dernier repiquage, seules des boutures terminales sont réalisées afin d'obtenir des plantes fortes et homogènes.

Six jours avant le prélèvement des apex, la partie haute des plantules (2/3 de la hauteur) est prélevée. Les feuilles et les pétioles sont éliminés en tirant vers le bas de la bouture. Les apex terminaux sont éliminés. Quatre à cinq tronçons de 0,5 cm avec un seul œil sont coupés et repiqués dans une boîte de Petri de 90 mm de diamètre, contenant 20 ml

Tableau 1 : Nombre de clones cryoconservés, validés par espèce

GRUPE GÉNÉTIQUE	ESPÈCE	NOMBRE DE CLONES CRYOCONSERVÉS	NOMBRE DE CLONES CRYOCONSERVÉS VALIDÉS	TAUX MOYEN DE SURVIE	TAUX MOYEN DE RÉGÉNÉRATION
Clade 1-2	<i>S. brachistotrichum</i>	4	1	95	95
	<i>S. bulbocastanum</i>	3	3	91	78
	<i>S. polyadenium</i>	7	4	100	91
	<i>S. trifidum</i>	4	4	97	84
Clade 4 Espèces Cultivées	<i>S. tuberosum</i>	78	72	98	90
	<i>S. andigenum</i>	1	1	100	90
	<i>S. chaucha</i>	1	1	95	95
	<i>S. phureja</i>	1	1	100	90
	<i>S. stenotomum</i>	1	1	100	94
Clade 4 Nord	<i>S. demissum</i>	1	1	100	78
Clade 4 Sud	<i>S. alandiae</i>	6	5	97	89
	<i>S. albicans</i>	1	1	83	79
	<i>S. berthaultii</i>	1	1	100	82
	<i>S. chacoense</i>	2	1	100	83
	<i>S. fendleri</i>	6	5	95	79
	<i>S. kurtzianum</i>	1	1	95	97
	<i>S. gourlayi</i>	2	0		
	<i>S. oplocense</i>	4	2	100	81
	<i>S. polytrichon</i>	3	3	95	91
	<i>S. sparsipilum</i>	1	0		
	<i>S. spegazzinii</i>	1	1	100	89
	<i>S. stoloniferum</i>	4	4	98	89
	<i>S. tarijense</i>	1	1	100	83
	<i>S. verneii</i>	1	1	100	80
	Espèce inconnue (69. 56. 52)	1	1	100	91
		118	104		

de milieu Tendille et Lecerf modifié, en conservant la polarité du fragment.

Prélèvement des apex axillaires et préculture

La loupe binoculaire est placée sous la hotte, après désinfection à l'alcool. Avec une aiguille stérile, les apex composés du dôme méristématique, recouvert partiellement de 2 ébauches foliaires (0,5 à 1,5 mm), sont prélevés (Figure 1) et déposés dans une boîte de Pétri de diamètre 55 mm, contenant 10 ml de milieu de prétraitement M1 (12 apex par boîte). Les boîtes de Pétri sont placées, à l'obscurité, dans un papier aluminium, pendant 1 jour, à 21 °C.

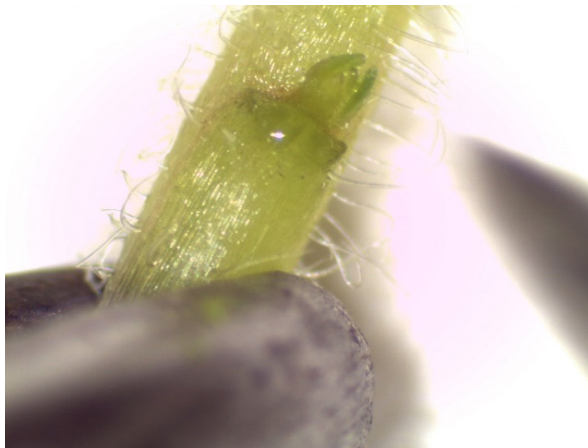


Figure 1. Prélèvement d'apex

Vitrification et congélation

Les apex sont ensuite déposés dans la solution de charge durant 20 minutes, dans un couvercle de tube Eppendorf stérile, à l'aide de la pointe d'un scalpel. Cette solution, contenant du saccharose et du glycérol, permet une déshydratation partielle des tissus.

De petits papiers aluminium, de 25 mm de long sur 8 mm de large, sont préparés. Leur bonne conductivité thermique permettra un refroidissement ou un réchauffement rapide des apex.

Chaque petit papier aluminium sera corné afin de faciliter son transport avec une pince.

Puis, sur chaque petit papier aluminium, 10 gouttes (8 µl) de solution de vitrification PVS2 (Sakai A, 1990) sont disposées (Figure 2). Cette solution, composée de 30 % (w/v) de glycérol, 15 % (w/v) d'éthylène glycol, 15 % (w/v) de DMSO (Diméthyle sulfoxyde) et 0,4 M de saccharose, a un rôle cryoprotecteur en permettant la transition vitreuse de l'eau résiduelle à -115 °C (Gallard, 2008).

Les petits papiers aluminium sont placés dans une boîte de Petri.

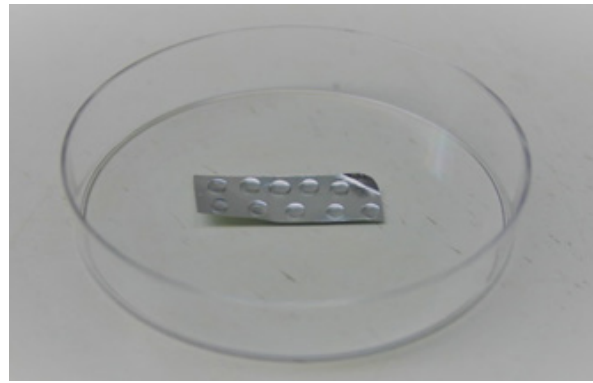


Figure 2. Gouttes de solution PVS2 sur papier aluminium

Dans chaque gouttelette, un apex est déposé à l'aide de la pointe du scalpel ou de l'aiguille, et la boîte de Petri est placée sur de la glace durant 30 minutes. Le faible volume de PVS2 entourant l'apex favorisera aussi un refroidissement rapide.

Chaque papier aluminium est ensuite glissé, à l'aide d'une pince, dans un cryotube (Figure 3) qui sera plongé et maintenu dans l'azote liquide puis transféré dans le cryoconservateur.



Figure 3. Transfert des apex dans un tube de cryoconservation

Décongélation

Les apex sont décongelés en plongeant chaque papier aluminium dans 5 ml de solution de rinçage contenus dans une boîte de Pétri (diamètre 55 mm), placée au bain marie à 40 °C. La solution rinçage riche en saccharose (1,2 M) permet d'éliminer les cryoprotecteurs.

La décongélation rapide des apex se fait par un passage de -196 °C à 40 °C, au bain-marie, durant 30 secondes, puis à température ambiante durant 20 minutes.

Repiquage pour régénération

Les apex sont repiqués, par 10, sans séchage, en boîtes de Pétri de diamètre 55 mm, contenant 10 ml de milieu M2 et placées une semaine à 21 °C, à l'obscurité, enveloppées dans un papier aluminium.

Ils sont ensuite repiqués, chaque semaine, sur un milieu de régénération EI (Figure 4). Les boîtes parafilmées sont placées, en boîte cristal, à 21 °C avec 16 h d'éclairage. Après 2 semaines sur le milieu de régénération, le taux de survie est évalué. Lorsque les régénérations atteignent 1 cm, elles sont repiquées, en tube, sur le milieu Tendille et Lecerf.



Figure 4. Régénération des apex

Validation des lots après cryoconservation

Afin de valider la cryoconservation d'un clone, nous calculons le taux de survie et le taux de régénération des apex.

Le taux de survie, calculé 15 jours après la décongélation, correspond au nombre d'apex verts après 2 repiquages sur le milieu EI.

Le taux de régénération correspond au nombre de plantules viables, 4 à 12 semaines après la décongélation des apex, par rapport au nombre d'apex repiqués après décongélation.

La viabilité et la conformité des plantules ainsi que l'observation de leur état sanitaire, après repiquage en tube, permettent de confirmer la validation des lots placés dans le cryoconservateur.

Résultats

L'objectif de ce travail était de mettre au point, au sein de notre laboratoire, une technique de cryoconservation et de vérifier qu'elle était applicable à différents clones de *Solanum tuberosum* et à des clones de différentes espèces apparentées de *Solanum*.

Applicabilité de la technique utilisée

Sur les 136 clones testés, toutes espèces confondues, nous avons validé la cryoconservation de 116 clones (Tableau 1).

Sur les 24 espèces testées, seules 2 espèces appartenant au Clade 4 Sud n'ont aucun clone validé (Tableau 1) :

- *S. sparsipilum* : le clone, cryoconservé à 2 reprises, a un taux moyen de survie de 100 % et un taux moyen de régénération de 42 %. Des apex témoins, ayant subi toutes les étapes sauf le passage dans l'azote liquide, ont un taux de régénération de 60 %.
- *S. gourlayi* : le premier clone, cryoconservé 2 fois, a un taux moyen de survie de 96 % et un taux moyen de régénération de 34 % ; le second clone, cryoconservé à 6 reprises, a un taux moyen de survie de 82 % et un taux moyen de régénération de 17 %. Les témoins, sans passage dans l'azote liquide, ont un taux de régénération respectivement de 50 et 28 %.
- Au total, la cryoconservation de 20 clones, répartis dans les différents clades, n'a pas pu être validée :
 - 10 clones n'ont pas atteint le taux minimum de régénération de 60 % pour sécuriser la cryoconservation.
 - 7 clones avaient un taux de régénération supérieur à 60 %, mais avec une contamination bactérienne au sein des boîtes témoin.
 - 3 clones n'ont pas atteint le taux minimum de régénération de 60 % et présentaient une contamination bactérienne.

Cryoconservation de *S. tuberosum*

La diversité génétique de la collection de variétés, maintenue au sein du CRB BrACySol, est bien représentée dans le panel des variétés intégrées dans cette étude. En effet, ce panel comprend les 48 variétés de la core collection définie pour représenter la diversité allélique de cette collection (Esnault et al., 2016).

Le taux de survie moyen des 78 variétés de *Solanum tuberosum* est de 98 % et le taux de régénération est de 89 %. Un total de 72 variétés de *Solanum tuberosum* sont considérées cryoconservées.

Ainsi, 6 variétés n'ont pas été validées. Deux (Ratte et Christa) n'ont pas atteint le taux minimum de régénération de 60 % pour sécuriser la cryoconservation. Les témoins de ces variétés, sans passage dans l'azote liquide, avaient un taux de régénération de 36 %.

Quatre clones avaient un taux de régénération supérieur à 60 %, mais avec une contamination bactérienne au sein des boîtes témoins.



Figure 5. Taux de survie et de régénération des variétés de *Solanum tuberosum*

Conclusion

L'adaptation de la méthode de vitrification en goutte, au sein de notre laboratoire, la mise au point des différentes étapes préalables à la cryoconservation, telles que la préparation des plantules in vitro, la détermination de la taille optimale des apex ainsi que la mise au point d'un milieu de régénération nous ont permis d'obtenir des résultats qui nous confortent dans le choix de cette méthode.

Globalement, cette méthode permet la survie d'apex de tous les clones cryoconservés. Le plus faible taux de survie obtenu étant de 54 %.

En 2016, le CIP (Centre international de la pomme de terre) obtenait, pour des clones de *Solanum tuberosum*, avec la méthode de vitrification en goutte précédée de 2 semaines de préculture à 6 °C, un taux de survie moyen de 72 % et un taux de régénération de 59 %. Le CIP a travaillé également

sur 3 autres espèces, communes à notre liste, mais sur un nombre d'accessions beaucoup plus important que nous. Pour les espèces *Solanum chaucha*, *S. phureja* et *S. stenotomum*, ils ont obtenu des taux moyens de survie compris entre 63 et 66 % et un taux de régénération compris entre 47 et 53 % (Vollmer et al., 2016). Nous avons donc obtenu des taux de survie et de régénération supérieurs aux leurs.

Le faible nombre de clones cryoconservés, au sein de chaque espèce apparentée, ne permet pas de déterminer l'aptitude à la cryoconservation, par la méthode de vitrification en goutte, de ces espèces, ni de relier les taux de régénération des clones au groupe génétique auquel ils appartiennent.

Les témoins sans passage dans l'azote liquide, des clones testés de *S. sparsipilum* et de *S. gourlayi* ainsi que des 2 variétés récalcitrantes de *S. tuberosum* (Ratte et Christa), ont aussi un taux de régénération faible.

Pour ces clones, nous pourrions tester de nouveaux équilibres hormonaux dans le milieu de régénération.

Pour tous les clones récalcitrants, il faudra revoir différentes étapes de cette méthode, comme le temps d'exposition à la solution PVS2 ou la durée du bain dans la solution de rinçage. Ainsi, on pourrait augmenter la durée du bain de rinçage (passer de 20 à 40 min), afin d'être sûr d'avoir éliminé les cryoprotecteurs qui peuvent s'avérer toxiques pour les apex après la décongélation.

Si, toutefois, ces modifications ne s'avéraient pas suffisantes pour les espèces apparentées, nous pourrions, pour ces clones, accepter un taux de régénération minimum de 40 % (Reed, 2001).

Dix clones ont présenté des contaminations bactériennes. Lors de la préparation des plantules *in vitro*, les bocalux présentant des bactéries sont éliminés. Ainsi, ces bactéries, non

visibles et non pathogènes pour les clones, semblent endogènes. Lors de la cryoconservation, l'apex subit un stress qui l'affaiblit. Après décongélation, la reprise de l'activité cellulaire peut être lente ce qui semble favoriser la multiplication bactérienne. Certains méristèmes arrivent malgré tout à régénérer une plante, d'autres pas.

Il nous faudra dorénavant nous assurer de l'absence de bactéries, sinon les éliminer ou refaire une mise en culture *in vitro* à partir de plants sains.

La méthode de vitrification en goutte est adaptée à notre problématique de conservation à long terme des ressources génétiques *Solanum* et peut être utilisée en routine pour de nombreuses espèces dont *Solanum tuberosum*. Toutefois, elle devra faire l'objet d'amélioration pour être utilisée pour certains clones récalcitrants. ■

Références

- Dussert S., Engelmann F., Noirot M., 2003. Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *Cryo-letters* : 24, 149-160.
- Esnault F., Pellé R., Dantec J.-P., Bérard A., Le Paslier M.-C., Chauvin J.-E., 2016. Development of a potato cultivar (*Solanum tuberosum* L.) core collection, a valuable tool to prospect genetic variation for novel traits. *Potato Research*, 59, 4 : 329-343. DOI 10.1007/s11540-016-9332-x.
- Fabre J. and Dereuddre J., 1990. Encapsulation dehydration - A new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips. *Cryo-Letters* 11(6) : 413-426.
- Gallard A., 2008. Étude de la cryoconservation d'apex en vue d'une conservation à long terme de ressources génétiques végétales : Compréhension des phénomènes mis en jeu et évaluation de la qualité du matériel régénéré sur le modèle Pélargonium. Thèse de doctorat. École doctorale d'Angers.
- Huang B., Ruess H., Liang Q., Colleoni C., Spooner D., 2019. Analyses of 202 plastid genomes elucidate the phylogeny of *Solanum* section *Petota*. *Scientific Reports* 9 : 44-54.
- Hawkes J. G., 1990. The potato: Evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, London.
- Marhadour S., Dargier C., Esnault F., Laversin N., Méar A., Perramant M. and Le Hingrat Y., 2014. Construction d'une base de données multi-utilisateurs pour améliorer la gestion des empreintes génétiques des variétés de pomme de terre produites en plants. *FranceInnovations Agronomiques* 35 : 161-172.
- Mix-Wagner G., 1999. The conservation of potato cultivars. *Potato Research* 42: 427- 436.
- Murashige T. and Skoog F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology* 15: 473-497.
- Kim H. H., Yoon J. W., Park Y.E., Cho E.G., Sohn J.K., Kim T.S., Engelmann F. (2006). Cryopreservation of potato cultivated varieties and wild species : Critical factors in droplet vitrification. *Cryo-letters* 27(4) : 223-234.
- Reed B. (2021). Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *Cryo-letters* 22: 97-104.
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama L (1990). Cryopreservation of nucellar cells of navel orange by vitrification. *Plant cell reports* vol 9: 30-33.
- Sakai A, Engelmann F (2007). Vitrification, encapsulation-Vitrification and droplet-vitrification : A review. *Cryo-letters* 28(3): 151-172.
- Spooner D., McLean K., Ramsay G., Waugh R., Bryan G. J., 2005. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: N°41.
- Spooner D., 2009. DNA barcoding will frequently fail in complicated groups : An example in wild potatoes. *American journal of botany* 96(6) : 1177-1180.
- Tendille C. and Lecerf M., 1974. La multiplication végétative de l'asperge (*ASPARAGUS OFFICINALIS* L.). Action de divers facteurs en particulier la nutrition minérale, sur le développement des méristèmes d'asperge, sur la croissance des plantules issues de ces méristèmes et sur la production de plante adultes. *Annales Amélioration des plantes* 24 (3) : 269-282.
- Vollmer R., Villagaray R., Egúsqüiza V., Espirilla J., Garcia M., Torres A., Rojas E., Panta A., Barkley N. A., Ellis D., 2016. The potato cryobank at the International Potato Center (CIP): A model for long term conservation of clonal. *CryoLetters* 37(5), 318-329.

Annexe 1. Milieux de culture

Milieu de culture Tendille et Lecerf modifié

Tendille et Lecerf modifié

	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments KNO3	10x	100cc
Micro-éléments MS	1000x	1cc
Fer EDTA	50x	20cc
Vitamines MS modifiées	1000x	1cc
Myo inositol		100mg
Saccharose		25g
Agar Agar VWR		7g
pH: 5.8		

Macro-éléments KNO3

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X10) 1L
KNO3	26.90 g
NH4NO3	5.36 g
Ca(NO3)2 4H2O	4.72 g
Mg SO4 7H2O	4.186 g
KH2 PO4	2.74 g
KCL	3.50 g

Micro-éléments MS

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X1000) 1L
H3BO3	6.2 g
Mn SO4 H2O	16.9 g
Zn SO4 7 H2O	10.6 g
KI	0.83 g
Cu SO4 5 H2O	0.025 g
Co Cl2 6 H2O	0.025 g
Na2 MoO4 2 H2O	0.25 g

Vitamines de Murashige & Skoog modifiées

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X1000) 100ML
H2 NCH2 COOH	200mg
Vit B1	50 mg
Vit B6	50 mg
Vit B3	50 mg

Fer EDTA

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X50) 1L
SO4Fe 7H2O	1.39 g
NA2EDTA2H2O	2.37 g

Milieu de régénération (EI) :

milieu Tendille et Lecerf modifié avec l'équilibre hormonal suivant :

HORMONES	SOLUTION MÈRE	POUR 1L DE MILIEU
AIA	1mg / ml	100µl
GA3	1mg / ml	200µl
Zéatine riboside	1mg / ml	200µl

Ce milieu est autoclavé, avec les hormones, 20 min à 1 bar.

Milieux de culture utilisés à IRD Montpellier pour la préparation et décongélation des apex d'igname

Tous ces milieux et solutions sont préparés avec H₂O ultra pure.
Les pH des milieux sont ajustés à 5,75.

M1 : Milieu de pré-traitement

M2 : Milieu de reprise des apex après congélation

M1			M2		
	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE		SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments MS IRD	20x	25cc	Macro-éléments MS IRD	20x	25cc
Micro-éléments MS IRD	100x	10cc	Micro-éléments MS IRD	100x	10cc
Fer EDTA IRD	1000x	10cc	Fer EDTA IRD	1000x	10cc
Vitamines IRD	1000x	1cc	Vitamines IRD	1000x	1cc
Myo inositol		100mg	Myo inositol		100mg
Saccharose		100g	Saccharose		100g
Charbon actif		2g	Charbon actif		2g
Agar Agar VWR		7g	BAP	1mg/L	2cc
			ANA	1mg/L	100µl
			Agar Agar VWR		7g

Macro-éléments MS

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE
NH ₄ NO ₃	33 g
KNO ₃	38 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	8.8 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	7.4 g
KH ₂ PO ₄	3.4 g

Oligo-éléments A

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE
H ₃ BO ₃	10000 mg
Mn SO ₄ H ₂ O	2500 mg
Zn SO ₄ 7 H ₂ O	1000 mg
KI	83 mg
Cu SO ₄ 5 H ₂ O	2.5 mg
Co Cl ₂ 6 H ₂ O	2.5 mg
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	2.5 mg

Vitamines IRD

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X1000) 100ML
Thiamine hydrochloride	100 mg
Pyridoxine hydrochloride	100 mg
Acide Nicotinique anhydre	100 mg
Pantothénate de calcium	100 mg

Fer EDTA

FORMULE CHIMIQUE	SOLUTION MÈRE (X1000) 1L
SO ₄ Fe 7H ₂ O	2.49 g
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	2.61 g

Solutions pour la cryoconservation

Toutes ces solutions sont préparées avec H₂O ultra pure et stérilisées par filtration.

Solution de charge

	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments MS IRD	20X	100cc
Oligo-éléments A	100X	1cc
Fer EDTA IRD	1000X	20cc
Vitamines IRD	1000X	1cc
Myo inositol		100mg
Saccharose		0.4M=136.92
Glycerol		2M=184.18g
Ph : 5.8		

Solution de rinçage

	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments MS IRD	20X	100cc
Oligo-éléments A	100X	1cc
Fer EDTA IRD	1000X	20cc
Vitamines IRD	1000X	1cc
Myo inositol		100mg
Saccharose		1.2M=410.76
Ph : 5.8		
Ph : 5.8		

PVS2

	SOLUTION MÈRE	POUR 1 LITRE
Macro-éléments MS IRD	20X	25cc
Oligo-éléments A	100X	10cc
Fer EDTA IRD	1000X	10cc
Vitamines IRD	1000X	1cc
Myo inositol		100mg
Saccharose		0.4M=136.92
Glycérol		30% (w/v)
DMSO		15% (w/v)
Ethylène glycol		15% (w/v)
Ph : 5.75		



Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-SA). <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « NOV'AE », la date de sa publication et son URL.