

Propagation de *Phalaenopsis* issus de plateaux racinaires de *vitro*-plants

Par protocormes de régénération

I. Samson¹⁻²

L. Hamama¹

R. Letouze¹

Introduction

Les *Phalaenopsis* sont des Orchidées épiphytes à croissance monopodiale cultivées pour l'esthétique de leurs inflorescences ainsi que pour la qualité et la résistance de leurs fleurons. Le genre *Phalaenopsis* compte actuellement 47 espèces présentant une aptitude remarquable à vivre dans des conditions variées ainsi qu'un grand potentiel d'hybridation. De nos jours encore, la multiplication à l'échelle industrielle des *Phalaenopsis* se fait par la technique du semis (reproduction sexuée) ; les parents sont des cultivars natifs et/ou hybrides sélectionnés pour leurs caractéristiques morphologiques (fig. 1). Ils font l'objet d'hybridations dirigées qui condui-

¹ Laboratoire de recherche en Physiologie végétale des Pays de la Loire, 16, bd Lavoisier 49045 Angers cedex 01, France.

² Gaigard Fleurs Angers, chemin de la Glardière, 49130 Les Ponts de Cé, France.

sent 8 à 12 mois plus tard à la formation d'une capsule renfermant plusieurs centaines de milliers de graines (fig. 2). Les principaux avantages de ce mode de propagation sont le très fort taux de multiplication et le brassage génétique qu'il engendre. Néanmoins, la technique du semis présente de nombreux inconvénients parmi lesquels l'hétérogénéité, l'instabilité et la variabilité de la descendance. Pour pallier ces inconvénients, les techniques de multiplication végétative tels le bouturage et la culture de méristèmes se sont développées permettant l'obtention de matériel végétal homogène et conforme au pied-mère sélectionné pour son potentiel économique. Cependant, ces techniques de propagation ne permettent pas d'atteindre des taux de multiplication élevés et c'est la raison pour laquelle elles ont été progressivement délaissées au profit de l'embryogenèse somatique. L'embryogenèse somatique est donc apparue comme une alternative intéressante pour non seulement conserver des caractères sélectionnés mais aussi pour obtenir des taux de propagation compatibles avec une application industrielle.

Figure 1
Génotypes d'élites
de *Phalaenopsis* sélectionnés
pour leurs caractéristiques florales.

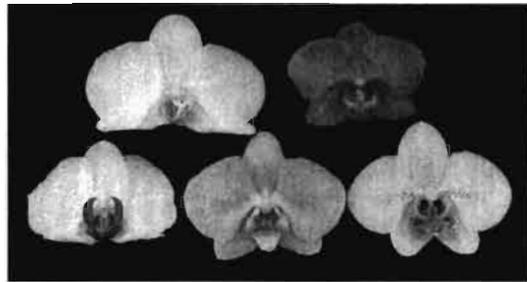


Figure 2
Capsule de *Phalaenopsis*
obtenue 8 à 12 mois
après les hybridations dirigées
entre les génotypes d'élites.



Les objectifs de notre travail étaient dans un premier temps d'établir une méthodologie permettant d'aboutir à la propagation clonale industrielle de génotypes d'élites sélectionnés pour leur intérêt économique. Pour ce faire, le schéma de propagation adopté comprenait l'établissement de clones à partir de génotypes d'élites puis la mise au point d'un protocole de multiplication végétative industrielle par embryogenèse somatique *via* l'exploitation des clones entretenus en culture de tissus. Dans un deuxième temps, nous avons contrôlé l'évolution tissulaire des explants au cours des différentes étapes de la propagation par embryogenèse somatique par des méthodes histologiques et moléculaires (PCR-RAPD).

■ Matériel et méthodes

Matériel végétal

Sept clones (A 78/46, B615, BSLRL, TS 313, TS 318, TS 345 et TS 256) de *Phalaenopsis* cultivés en serre, issus de la culture de méristèmes, ont servi de pieds-mères pour les mises en culture. Différents types d'explants, de milieux de culture (Vacin et Went, 1949 ; Tokuhara et Mii, 1993), et de régulateurs de croissance (ANA ; 2,4-D ; BAP ; F3iP ; CPPU) ont été testés pour l'établissement des clones en culture de tissus.

Régénération du Phalaenopsis par embryogenèse somatique

La propagation du *Phalaenopsis* par protocormes de régénération se déroule en 3 étapes distinctes : l'induction de l'embryogenèse somatique, la formation et la multiplication de protocormes de régénération et la conversion en jeunes plantes.

Étude histologique

Les tissus utilisés pour l'étude histologique ont été fixés dans un tampon phosphate de sodium 0,1M à pH7 additionné de paraformaldé-

hyde 2 %, de glutardialdéhyde 1 % et de caféine 1 %. Au terme de la fixation, les tissus ont été déshydratés dans une série de bains d'alcool et inclus dans de la résine. Des sections de 7 μm d'épaisseur ont alors été effectuées à l'aide d'un microtome. Les coupes ont enfin subi une double coloration à l'acide périodique Schiff et au Naphтол Blue Black.

Technique de PCR-RAPD

L'ADN génomique est extrait selon la méthode de Dellaporta *et al.* (1983). La technique permet l'extraction et la purification de l'ADN génomique par l'utilisation de protéinase K, d'un détergent anionique : le Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), de la RNase A, d'un mélange de phénol/chloroforme/alcool isoamylique et d'isopropanol.

La qualité de l'ADN génomique natif extrait des 7 variétés de *Phalaenopsis* a été évaluée par une migration dans un minigel d'agarose à 0,8 %. Parallèlement à la migration de l'ADN génomique total, des marqueurs de poids moléculaires connus, issus de la digestion d'un phage λ par les 2 enzymes de restriction Hind III et EcoRI, sont également mis à migrer.

L'analyse du minigel d'agarose a permis de visualiser une seule bande d'ADN de haut poids moléculaire (> 12.216 pb), garantie d'une bonne qualité des extractions.

Dosage des préparations

La quantification de l'ADN est réalisée par fluorimétrie (DNA fluorometer Model TKO 100 de Hoefer Scientific Instrument San Francisco).

Les mesures des concentrations d'ADN sont basées sur l'utilisation du réactif de Hoechst 33258. La quantité d'ADN est mesurée à 520 nm.

Le fluorimètre est étalonné grâce à 2 ml d'une solution de travail comprenant du TNE 1x (Tris 10 mM ; NaCl 0,1 M ; EDTA 1 mM, pH 7,4) et le réactif de Hoechst à 1mg/ml (point correspondant à 0 ng d'ADN) et à 2 ml de cette même solution auxquels est ajouté de l'ADN de thymus à la concentration de 1 $\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ (point correspondant à 500 ng d'ADN).

Le dosage de l'ADN extrait est réalisé avec 1 μl de chaque préparation dilué dans 2 ml de solution de travail ; plusieurs mesures sont effectuées sur le même extrait afin d'établir une moyenne.

Conditions d'amplification

Le volume réactionnel pour les amplifications est de 25 μ l ; il se compose de Tris HCl 10 mM pH 8,5, de KCl 50 mM, de $MgCl_2$ 2 mM, de 100 μ M de dNTP, de 15 ng d'amorce, de 25 ng d'ADN, d'une unité Taq et de deux gouttes d'huile.

Quarante huit amplifications peuvent être réalisées simultanément dans le thermocycleur ; il est programmé de la façon suivante :

- une phase de dénaturation de 4 mn 30 à 94 °C ;
- 45 cycles d'amplification :
 - 1 mn à 94 °C pour la dénaturation de l'ADN ;
 - 1 mn à 36 °C pour l'hybridation des amorces ;
 - 2 mn à 72 °C pour l'élongation des brins d'ADN ;
- une phase d'élongation de 15 mn à 72 °C ;
- une phase de stockage final à 4 °C.

Préparation des échantillons

Après l'amplification, les 25 μ l de volume réactionnel sont pipetés sous l'huile et additionnés de 2,5 μ l d'un mélange de bleu de bromophénol et de xylène cyanol et de ficoll.

Électrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet, grâce à un courant électrique, la migration et la séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille.

L'ADN, chargé négativement, est déposé au niveau de la cathode et migre, sous l'effet du courant, vers l'anode. La vitesse de migration des fragments est proportionnelle à leur taille, les fragments les plus petits migrant les plus vite et donc les plus loin.

La séparation des amplicons est réalisée sur un gel d'agarose à 1,4 % (p : v). Le gel, coulé à chaud dans un support de gel en présence de peignes, est placé dans une cuve électrophorétique Apelex IBI et est recouvert par un tampon d'électrophorèse composé de 0,04 M Tris-acétate ; 0,001 MEDTA ; pH8 (TAE 1x).

Les échantillons ainsi que des marqueurs de poids moléculaires (1Kb DNA Ladder, U.S. Patent No. 4,403,036) sont déposés dans les puits for-

més par les peignes. Le système de refroidissement par circulation d'eau est mis en route et une tension de 120 V est appliquée pendant 3 h. Les marqueurs de poids moléculaires serviront, *via* le logiciel Bio 1D, pour établir une courbe étalon (distance de migration = f (Log P.M.)) qui permettra de déterminer la taille des fragments amplifiés.

Coloration des fragments amplifiés

À l'issue de l'électrophorèse, le gel d'agarose est incubé à l'obscurité dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à 0,5 µg/ml ; le BET est un colorant fluorescent sous ultra-violets (UV) qui s'intercale entre les bases de l'ADN et qui permet sa visualisation. Au bout de 15 mn de coloration, le gel est rincé à l'eau courante pendant 20 mn avant d'être observé et photographié sous UV par transmission de lumière sur des films Polaroid de type 557.

Résultats

Établissement de clones de Phalaenopsis par culture de tissus

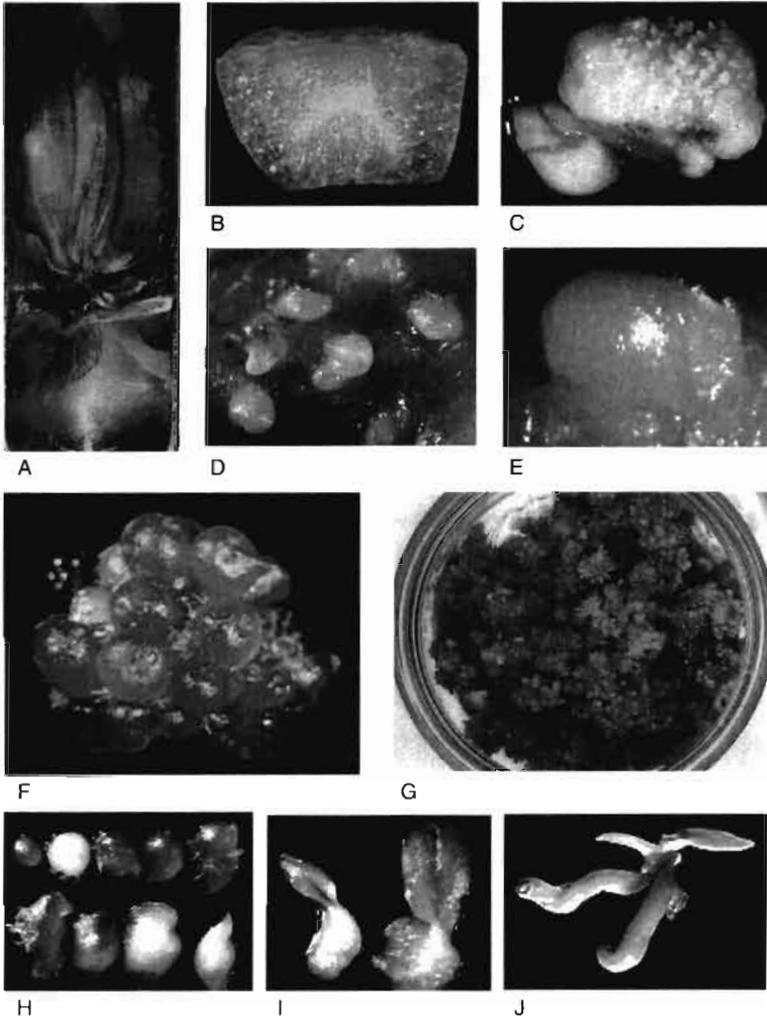
Induction de la caulogenèse

Les explants retenus pour la formation de pousses végétatives sont des boutures gemmées de hampes florales prélevées sur les pieds-mères cultivés en serre. Le milieu de culture permettant le démarrage maximal de ces boutures (entre 83,3 % et 100 %) est le milieu de Vacin et Went (1949) modifié et additionné de 0,1 mg.l⁻¹ d'ANA et de 1 mg.l⁻¹ de BAP. La culture des explants s'effectue durant 1 à 3 mois à l'obscurité et entre 21 et 24 °C.

Induction de la rhizogenèse

Les pousses végétatives obtenues à l'étape précédente sont cultivées sur le New Dogashima Medium (NDM) élaboré par Tokuhara et Mii (1993), modifié et additionné de 0,1 mg.l⁻¹ d'ANA et de 1 mg.l⁻¹ de BAP. La culture est réalisée en salle avec photopériodisme (16 h de

lumière et 8 h d'obscurité) pendant 1 à 3 mois. À l'issue de cette période, plus de 70 % des pousses végétatives se sont enracinées (planche 1).



■ Planche 1

Régénération du *Phalaenopsis*

- A : pousse feuillée enracinée entretenue en culture de tissus ;
- B : coupe longitudinale d'un plateau racinaire ;
- C : induction d'embryons somatiques ;
- D et E : protocormes de régénération formés à partir d'un plateau racinaire ;
- F : amas de protocormes de régénération en début de multiplication ;
- G : multiplication des protocormes après 2 mois de culture ;
- H, I et J : conversion des protocormes de régénération en jeune plante.

Entretien des clones

Des repiquages réguliers pendant 8 à 12 mois conduisent à des jeunes plantes qui sont prêtes à être acclimatées en serre ou qui peuvent servir de source d'explants pour l'induction de l'embryogenèse somatique.

Régénération du *Phalaenopsis* par embryogenèse somatique

Induction et formation des protocormes de régénération

Les explants retenus pour induire l'embryogenèse somatique sont les plateaux racinaires prélevés sur les *in vitro*-plants entretenus en culture de tissus. Les plateaux racinaires sont constitués des tissus compris entre la zone d'insertion des racines et celle des feuilles (planche 1). Ils peuvent être assimilés à une assise pseudo-méristématique. Mis en culture sur le NDM additionné d'ANA et de F3iP : (E)-6- [3- (trifluorométhyl)-but-2-enylamino] purine (Clémenceau *et al.*, 1996 ; fig. 3) et placés à l'obscurité interrompue par des flashes de lumière rouge clair (660 nm) à intervalles réguliers, 83,3 % des explants forment des protocormes de régénération (planche 1).

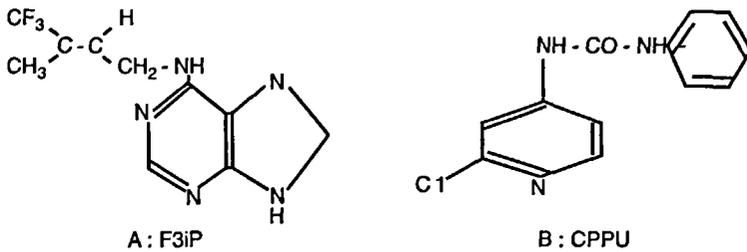
Multiplication des protocormes de régénération

Des amas de 10 à 15 protocormes sont mis en culture dans des Récipients à immersion temporaire automatique (Rita®) contenant le NDM modifié liquide additionné d'ANA et de CPPU N-2 (chloropyridyl) 4-N'phénylurée (fig. 3). À l'issue de 40 jours en salle de culture avec photopériodisme, la matière fraîche est multipliée par 40 (planche 1).

Conversion des protocormes de régénération en jeunes plantes

Au sortir de l'étape de multiplication, les protocormes de régénération sont individualisés et mis en culture pendant 8 à 12 mois sur le NDM modifié additionné d'ANA et de BAP (planche 1). Au terme de cette période, les plantes sont acclimatées en serre et leur floraison est observée dans les 14 mois qui suivent.

Le schéma de propagation que nous avons développé conduit à l'obtention en 3 à 4 ans de plusieurs dizaines de milliers de plantes fleuries phénotypiquement identiques aux pieds-mères dont elles sont issues. À titre de comparaison, ces délais sont comparables voire inférieurs à ceux observés dans le cas de la multiplication par voie sexuée.



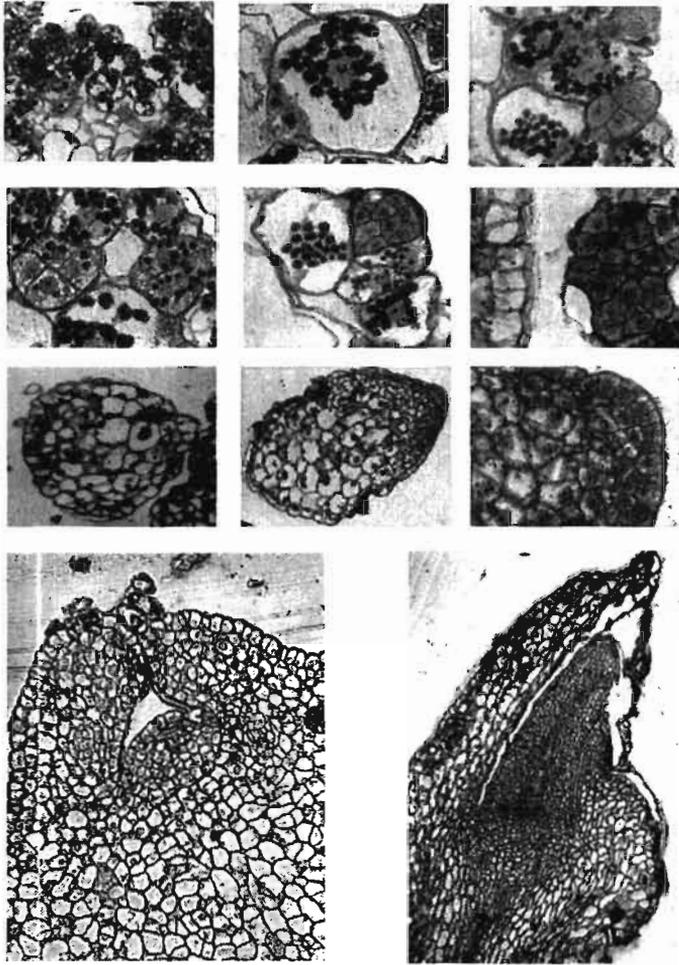
■ Figure 3
Formules semi-développées des molécules de synthèse à activité cytokininé.

Étude histologique

L'observation à la loupe binoculaire des plateaux racinaires, aux différentes étapes de la régénération, par le processus de l'embryogenèse somatique a révélé la présence de structures nodulaires sphériques de couleur verte se formant à la surface des plateaux racinaires et se détachant facilement de ces explants-mères. Ces structures, à des stades de développement plus ou moins avancés, ont par la suite fait l'objet de coupes histologiques (planche 2) confirmant qu'elles possédaient toutes les caractéristiques des embryons somatiques et qu'elles pouvaient donc être définies comme étant des protocormes de régénération.

Les coupes histologiques réalisées tout au long de la culture ont par ailleurs permis d'établir un parallèle entre le développement des embryons zygotiques des *Orchidaceae* (Leroux *et al.*, 1995) et celui des embryons somatiques (ou protocormes de régénération).

Notre étude histologique montre que les protocormes de régénération se forment à partir d'une cellule dédifférenciée unique (cellule



■ Planche 2

Étude histologique au cours de la régénération du *Phalaenopsis* par le processus de l'embryogenèse somatique.

1	2	3
4	5	6
7	8	9

10	11
----	----

1 : tissu embryogène ;

2 : cellule dédifférenciée individualisée ;

3, 4 : premières divisions des cellules méristématiques ;

5, 6 : amas de cellules méristématiques ;

7 : protocorme de régénération au stade globulaire constitué de cellules parenchymateuses ;

8, 9 : formation d'un dôme méristématique au pôle antérieur du protocorme ;

10 : méristème caulinaire organisé au pôle antérieur du protocorme, formation de primordia foliaires ;

11 : formation d'un méristème racinaire au pôle postérieur du protocorme.

de cal) qui s'isole des autres par un épaississement de sa paroi et qui acquiert des caractéristiques embryonnaires et notamment des potentialités méristématiques. Les divisions cellulaires successives conduisent à la formation d'un amas cellulaire qui s'isole de l'explant-mère par la constitution d'un épiderme monocouche pour former un embryon globulaire composé dans un premier temps uniquement de cellules parenchymateuses. Ensuite, un méristème caulinaire s'organise et entre en fonctionnement pour produire des primordia foliaires et des bourgeons. Plus tardivement des cellules parenchymateuses, proches de la zone vasculaire, se différencient et s'organisent pour former un méristème racinaire au pôle opposé (instauration de la bipolarité de l'embryon). Dès qu'il est formé, l'apex radiculaire entre en activité mitotique et la jeune racine croît droit en perçant les cellules corticales de la tige ; la première racine naît toujours à l'aisselle de la feuille la plus âgée. L'ensemble de ces observations corroborent celles faites par Vanseveren et Freson (1969), Freson et Vanseveren (1968), Vanseveren (1969, 1970).

Caractérisation moléculaire des clones : technique de PCR-RAPD

Extraction de l'ADN génomique

Quantités d'ADN extrait

Les rendements des extractions ont été calculés en microgrammes d'ADN par gramme de matière fraîche. Ils sont présentés dans le tableau 1.

Clone	Masse de MF (g)	Concentration d'ADN (ng/μl)	Quantité d'ADN (μg)	Rendement (μg d'ADN/g MF)
1	1,38	516,20	30,97	22,44
2	1,48	252,66	20,21	13,66
4	1,46	451,32	36,11	24,73
8	1,35	256,50	15,39	11,40
9	1,31	274,00	16,44	12,55
10	1,41	203,32	12,20	8,63
12	1,33	558,00	27,90	20,78

I Tableau 1

Rendements des extractions d'ADN

à partir des *vitro*-plants entretenus en cycle clonal.

Résultats exprimés en μg d'ADN par g de matière fraîche.

Le tableau 1 indique que les rendements des extractions sont compris entre 8 et 24 μg d'ADN/g MF. En moyenne, un peu plus de 16 μg d'ADN sont extraits par gramme de matière fraîche.

Caractérisation variétale *via* les marqueurs RAPD

Sélection des amorces

Plusieurs dizaines d'amorces ont été testées, 8 amorces seulement ont été retenues :

OPE-03	5' CCAGATGCAC 3';
OPE-04	5' GTGACATGCC 3';
OPE-07	5' AGATGCAGCC 3';
OPE-09	5' CTTCACCCGA 3';
OPE-11	5' GAGTCTCAGG 3';
OPE-16	5' GGTGACTGTG3';
OPE-18	5' GGACTGCAGA 3';
OPE-19	5' ACGGCGTATG 3'.

Profils d'amplification

Des profils d'amplification ont été établis pour chacune des 7 variétés de *Phalaenopsis* (planche 3) avec les 8 amorces présentées précédemment (planche 4). Chaque amplification a été répétée 2 fois.



1 : A 78/46



2 : B 615



4 : BSLR



8 : TS 313

■ Planche 3
photographie des 7 clones
de *Phalaenopsis*
entretenus *in vitro*
en culture de tissus.



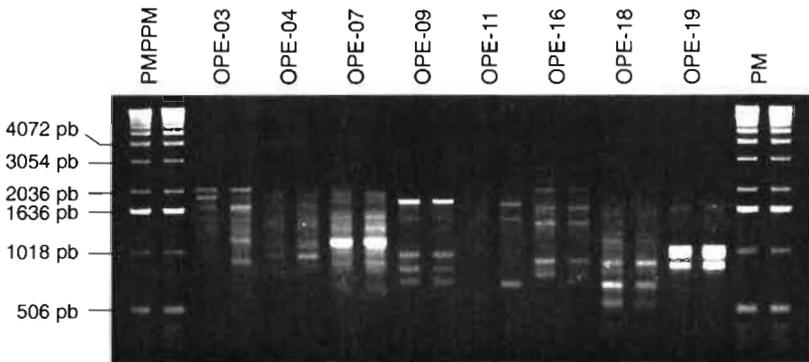
9 : TS 318



10 : TS 345



12 : TS 256



■ Planche 4

Profil d'amplification obtenu à partir de l'ADN génomique du clone 12 entretenu *in vitro* en culture de tissus. Utilisation des amorces OPE-03, 04, 07, 09, 11, 16, 18 et 19.

Les profils d'amplification sont constitués de fragments d'ADN amplifiés dont le nombre et la taille varient en fonction de l'amorce et de la variété utilisées.

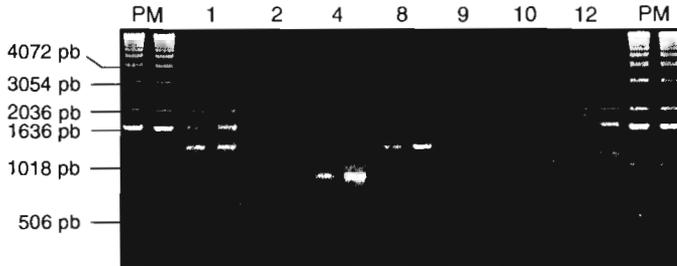
Les profils PCR-RAPD de chacune des 7 variétés, obtenus à partir d'une même amorce, sont comparés les uns aux autres de manière à trouver des marqueurs RAPD spécifiques. Sur l'ensemble des fragments amplifiés, seules les bandes reproductibles ont été prises en considération pour l'analyse des profils (les bandes instables et/ou difficilement visualisables sont éliminées). Parmi ces bandes reproductibles, certaines sont constantes pour toutes les variétés, elles révèlent un monomorphisme et ne permettent pas de caractérisation variétale. D'autres, par contre, sont variables et conduisent à un polymorphisme entre les différentes variétés. Elles peuvent être considérées comme des marqueurs moléculaires et permettent de caractériser les variétés.

L'évaluation de la taille des amplicons se fait grâce au logiciel Bio-profil.

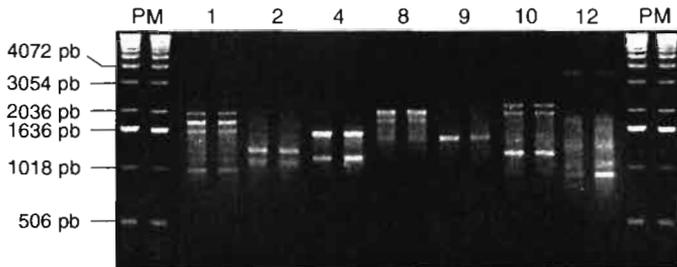
Les gels 1 à 3 (planche 5) illustrent les amplifications de l'ADN génomique des 7 clones de *Phalaenopsis* en utilisant à titre d'exemple 3 des 8 amorces sélectionnées (OPE-03, OPE-04, OPE-07, OPE-09 et OPE-18). Les résultats indiquent que les marqueurs RAPD peuvent être utilisés pour identifier et caractériser les 7 variétés de *Phalaenopsis*.

Clones de *Phalaenopsis* –

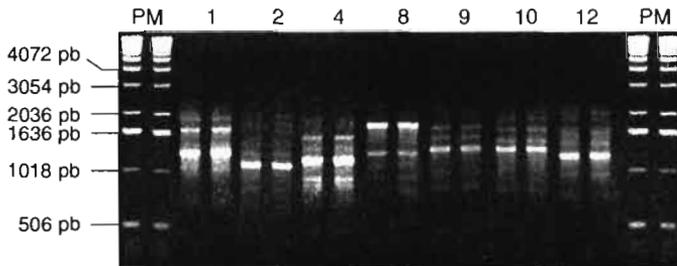
1 : A 78/46 ; 2 : B 615 ; 4 : BSLR ; 8 : TS 313 ; 9 : TS 318 ; 10 : TS 345 ; 12 : TS 256



Gel 1 : Profil d'amplification obtenu en utilisant l'amorce OPE-03.



Gel 2 : profil d'amplification obtenu en utilisant l'amorce OPE-04.



Gel 3 : profil d'amplification obtenu utilisant l'amorce OPE-07.

I Planche 5

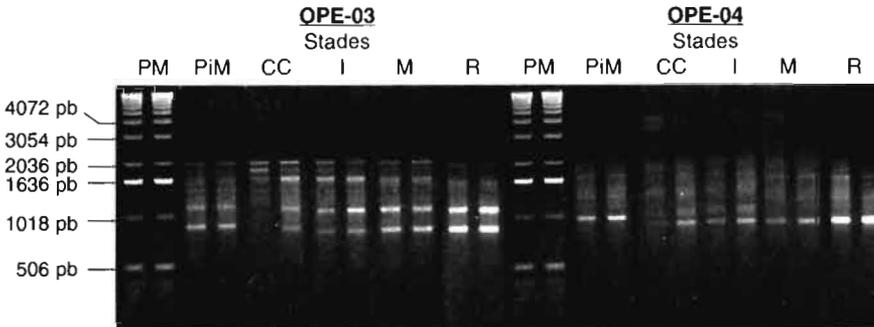
Profils d'amplification de l'ADN génomique de 7 clones de *Phalaenopsis* entretenus en culture de tissus en utilisant les amorces OPE-03, 04 et 07.

Comparaison pour une amorce donnée du profil de bandes RAPD à différents stades de la régénération

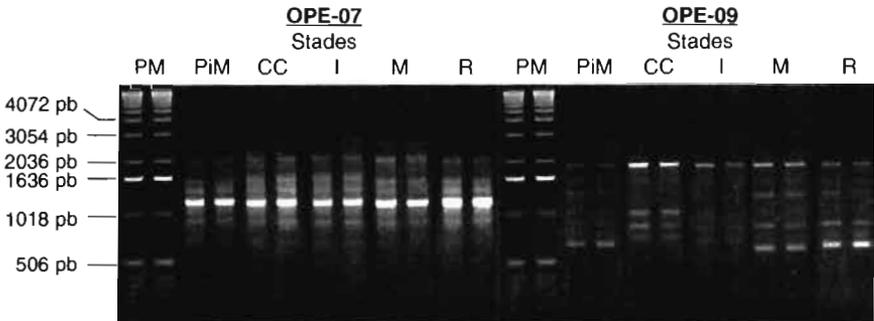
La stabilité génétique des plantes régénérées par embryogenèse somatique à partir du pied-mère TS 256 a été évaluée grâce à la technique de PCR-RAPD. Le matériel végétal a été prélevé aux stades suivants :

- stade 1, pied-mère d'élite cultivé en serre (PiM) ;
- stade 2, clone obtenu par boutures de nœuds de hampes florales du pied-mère et maintenu en culture de tissus (CC) ;
- stade 3, plateaux racinaires de *in vitro*-plants à partir desquels des protocormes de régénération ont été induits et néformés (I) ;
- stade 4 ; protocormes de régénération en phase de multiplication (M) ;
- stade 5, plantes régénérées par embryogenèse somatique juste avant leur sortie de l'*in vitro* et leur acclimatation en serre (R).

La planche 6 présente, à titre d'exemple, pour 4 des 8 amorces sélectionnées (OPE-03, 04, 07, 09) les profils d'amplification de l'ADN génomique, aux différentes étapes de la régénération du matériel végétal.



Gel 4 : profil d'amplification obtenu en utilisant les amorces OPE-03 et OPE-04.



Gel 5 : profil d'amplification obtenu en utilisant les amorces OPE-07 et OPE-09.

■ Planche 6

Profils d'amplification de l'ADN génomique TS 256 à 4 stades de développement en utilisant les amorces OPE-03, 04, 07 et 09. Stades de développement :

PiM : pied-mère cultivé en serre ;

CC : clone entretenu *in vitro* en culture de tissus ;

I : initiation et formation des protocormes de régénération ;

M : multiplication des protocormes ; R : plantes régénérées par embryogenèse somatique.

Les résultats montrent que le polymorphisme révélé par les marqueurs RAPD diffère en fonction des amorces utilisées mais que pour une amorce choisie aucun polymorphisme de bandes n'est détecté quel que soit le stade de développement considéré.

Discussion-conclusion

La technique mise au point pour la propagation du *Phalaenopsis* par protocormes de régénération permet d'aboutir à un taux de multiplication compatible avec les exigences industrielles. Les améliorations apportées à la technique par l'utilisation des « Rita® » et par l'utilisation d'explants issus de plateaux racinaires d'un clone entre- tenu en culture *in vitro* augmentent considérablement la disponibilité des mises en culture. L'utilisation des outils de la biologie moléculaire, la technique PCR-RAPD, a permis de confirmer l'homogénéité et la stabilité du matériel régénéré.

Bibliographie

- Clemenceau D, Cousseau J, Martin V, Molines H, Wakselman C, Momet R, Nogue F, Laloue M 1996 — Synthesis and cytokinin activity of two fluoro derivatives of N6-Isopentenyladenine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44 : 320-322.
- Dellaporta S.L., Wood, J., Hicks J.B. 1983 — A plant DNA miniprep: revision II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Freson R, Vanseveren N 1968 — La propagation des orchidées par la méthode de culture des méristèmes *in vitro*. Association nationale des professeurs de biologie de Belgique 2 : 85-93.
- Leroux G, Barabe D, Vieth J 1995 — Morphogenèse comparée de protocormes de *Cypridium acaule* (Orchidaceae) cultivés *in vitro* avec ou sans sucre. *Can. J. Bot.* 73 : 1391-1406.
- Tokuhara K, Mii M 1993 — Micropropagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* by culturing shoot tips of flower stalk buds. *Plant Cell Reports* : 7-11.
- Vacin E, Went F.W 1949 — Some pH changes in nutrient solutions. *Bot. Gaz.* 110 : 605-613.

Vanseveren N 1969 —
Quelques phénomènes
d'organogenèse dans des plantules
de *Cattleya* Lindl. (orchidaceae)
obtenues par propagation
méristématique *in vitro*. Bull. Soc.
Roy. Bot. Belgique 102 : 211-220.

Vanseveren N 1970 —
Note sur quelques aspects
morphologiques et histologiques

de plantules de *Cattleya* Lindl.
A croissances anormales,
obtenues par propagation
méristématique. Bull. Soc. Roy. Bot.
Belgique 103 : 11-17.

Vanseveren N, Freson R 1969 —
La multiplication des Orchidées
par la technique de culture *in vitro*
des méristèmes de tige.
Les naturalistes belges 50-8 : 443-460.