

Études préalables à la mise en place d'une cryobanque d'apex de *Pelargonium* : optimisation du procédé, vérification de la conformité des plantes régénérées

Agnès GRAPIN^{(1)*}, Dominique DUMET⁽¹⁾, Jean-Luc VERDEIL⁽²⁾,
Christophe BAILLY⁽³⁾, Noëlle DORION⁽¹⁾

⁽¹⁾ UMR 1259 GenHort (INRA/INH/UA), Institut National d'Horticulture,
2 rue Le Nôtre, 49045 Angers Cedex, France

⁽²⁾ Laboratoire de biologie cellulaire, BIOTROP, UMR 1098/BEPC, CIRAD,
avenue Agropolis, 34398 Montpellier Cedex, France

⁽³⁾ Laboratoire de Physiologie Végétale Appliquée. Université Pierre et Marie
Curie, Tour 53, 75252 Paris Cedex 05, France

Abstract: Preliminary studies before applying apex cryopreservation to a *Pelargonium* genebank: process improvement and analysis of genetic fidelity of regenerated plants. In order to guarantee the safe, long-term conservation of the National Institute of Horticulture (I.N.H.) *Pelargonium* collection, apex cryopreservation studies have been undertaken. Various steps of the encapsulation-dehydration process have been studied choosing *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' as a model. The preculture step was simplified using a direct preculture in 0.75 M sucrose liquid medium for 40 h. The rate of evaporative desiccation had no effect on *Pelargonium* apex survival, in contrast to the temperature of desiccation. 24°C or 28°C resulted in significantly higher survival than 8°C. After direct freezing in liquid nitrogen, the encapsulated apices were immersed in a 0.75 M sucrose liquid medium at 20°C for 1 mn and then cultivated following the standard procedure. An histo-cytological study was performed on 'Balcon Lilas' apices submitted to the cryopreservation process. Starch accumulation was observed in most of the cells following preculture. Heavily stained nuclei were observed immediately after thawing. Five days later, the nucleolus was visible again. Additional observations are necessary to determine the recovery growth pattern of the apices. This process was tested on 19 genotypes representative of the diversity of our collection. Apex survival was obtained for 18 of them, but variability in cryopreservation tolerance was observed.

* Correspondance et tirés à part : Agnes.Grapin@inh.fr

Survival percentages were between 27.5% (*P. x hortorum* 'Renard Bleu') and 83.9% (*P. x hortorum* 'Bicolor'). Plants were produced after cryopreservation for *P. x grandiflorum* 'Pansy' and *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' and 'Balcon Rouge'. After the morphological evaluation of the stems, the leaves and the flowers, 'Pansy' plants were considered all true-to-type. 'Balcon' plants are still under evaluation. Studies should be continued on a large sample of genotypes in order to improve regeneration and to try to understand the origin of cryopreservation tolerance variability according to genotype. The control of the sanitary status and the conformity of cryopreserved material representing a large sample of genotypes would be the last step before deciding to implement cryopreservation in the *Pelargonium* genebank.

Pelargonium / cryopreservation / apex / sucrose / histology

Résumé : En vue d'assurer la conservation à long terme d'une collection de *Pelargonium*, l'évaluation du procédé de cryoconservation d'apex par encapsulation-déshydratation appliqué à ce genre a été entreprise. Les différentes étapes du procédé ont été étudiées en se servant du cultivar *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' comme modèle. Un protocole standard de cryoconservation des apex de *Pelargonium* a été établi : préculture directe des apex encapsulés en milieu liquide avec 0,75 M de saccharose pendant 40 heures, déshydratation évaporative à 24 ou 28 °C au-dessus de silicagel jusqu'à une teneur en eau comprise entre 0,2 et 0,3 g.g⁻¹ MS, congélation directe dans l'azote liquide et réchauffement des apex par immersion dans la solution de préculture. Il permet d'obtenir des taux de survie généralement compris entre 45 % et 80 %. L'impact de chaque étape du protocole a été étudié en réalisant une étude histologique. Ce protocole a ensuite été validé en le testant sur 19 autres génotypes de *Pelargonium*. Des plantes issues de cryoconservation ont été régénérées pour 'Balcon' et 'Pansy' et leur conformité phénotypique est en cours d'évaluation. L'amélioration du taux de régénération est maintenant indispensable pour évaluer la possibilité d'utiliser la cryoconservation comme technique de conservation à long terme pour *Pelargonium*.

Pelargonium / cryoconservation / apex / saccharose / histologie

Abréviations : *P. x h.* : *Pelargonium x hortorum*, *P. x p.* : *Pelargonium x peltatum*, *P. x g.* : *Pelargonium x grandiflorum*, M.Sk. : Murashige and Skoog, AIA : acide 3-indole acétique, BAP : 6 benzyl-amino-purine, AIB : acide 3-indole butyrique, AHS : adénine hémi-sulfate, rpm : rotation par minute, MS : matière sèche, PFBV : *Pelargonium* flower break virus, PLPV : *Pelargonium* line pattern virus, ΩH_f : variation d'enthalpie de fusion, MDB : microcalorimétrie différentielle à balayage

1. INTRODUCTION

Le genre *Pelargonium*, principalement originaire d'Afrique du Sud, comprend plus de 250 espèces dont certaines occupent une place importante en horticulture ornementale. Les cultivars de *P. x hortorum* Bailey (géranium zonal) et *P. x peltatum* (géranium lierre) sont parmi les plantes à massif les plus utilisées en Europe et Amérique du Nord. Les cultivars de *P. x grandiflorum* (géranium des fleuristes) sont principalement utilisés comme plantes en pot fleuries. Ces cultivars sont très majoritairement multipliés végétativement pour en préserver la stabilité. L'INH entretient sous tunnel une collection de 490 espèces et variétés de *Pelargonium*, dont de nombreuses plantes sont contaminées par des virus (PFBV, PLPV). Un procédé de conservation à long terme de cette collection doit être développé afin de minimiser les risques de perte de matériel et les frais de gestion. Une étude de la cryoconservation d'apex, qui peut combiner à la fois conservation à long terme [7] et assainissement [3], a donc été engagée, ce qui n'avait jamais été rapporté dans la littérature pour ce genre. *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' a été choisi comme modèle pour sa capacité de régénération à partir d'apex. Un premier procédé, basé sur un protocole de type 'encapsulation-déshydratation' [8] a été défini [10]. Une fois les apex enrobés, les étapes sont : la préculture dans une solution progressivement enrichie en saccharose, la déshydratation évaporative, la congélation et le réchauffement. Cependant, pour être appliqué à la conservation d'une collection, un procédé doit être efficace, reproductible, applicable à une large gamme de génotypes, et suffisamment simple pour être réalisé en routine et permettre la régénération de plantes conformes [6], [16]. Différentes étapes du procédé de cryoconservation ont donc été étudiées dans un souci d'optimisation. Le nouveau protocole ainsi défini a alors été appliqué à d'autres génotypes de la collection. La vérification de la conformité du matériel régénéré après cryoconservation a été entreprise. Parallèlement, des études histologiques ont été menées pour connaître l'évolution des structures cellulaires au cours des différentes phases de cryoconservation et pour suivre le développement des apex lors de la régénération. De plus, des mesures de microcalorimétrie différentiel à balayage, évaluant la teneur en eau cristallisable des tissus, ont été entreprises, la formation de cristaux dans les cellules étant un facteur défavorable à la survie lors de la cryoconservation [2].

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel végétal

Les bourgeons axillaires ont été prélevés sur des tiges provenant de plantes cultivées sous serre. *P. x p.* 'Balcon Lilas' est le cultivar choisi comme modèle. Des bourgeons de 9 autres cultivars ont également été prélevés au cours de 3 répétitions (*P. x h.* 'Alain', 'Bicolor', 'Cahors', 'Isabell', 'Renard Bleu', 'Stellar Artic', *P. x p.* 'Amethyst', 'Balcon Rouge', *P. x g.* 'Pansy'). Un essai de cryoconservation a été réalisé sur 5 cultivars d'origine française (*P. x h.* 'Distinction' et 'Le Quinteau', *P. x p.* 'La France', 'Papa Crousse' et 'Raymonde') ainsi que sur 3 espèces sauvages (*P. scandens* Ehrh., *P. radens* H.E. Moore, *P. madagascariense* Baher) et 2 espèces parfumées (*P. x fragrans*, *P.* 'Limoneum') (8 apex pour chacun).

2.2. Culture *in vitro* des apex

Après désinfection en surface des tiges à l'éthanol 70 %, les apex (dôme apical avec 1 à 2 primordia foliaires) sont disséqués sous la loupe en conditions stériles. Ils sont mis en culture durant une semaine sur le milieu semi-solide M0 contenant les sels minéraux M.Sk. [13] dont le FeEDTA est remplacé par du citrate de fer (50 mg.l⁻¹), additionnés des vitamines de Morel et Wetmore [14], de 0,5 mg.l⁻¹ d'AIA, 90 mM de saccharose, 2 g.l⁻¹ de charbon actif et 6 g.l⁻¹ d'agarose. Les apex sont ensuite transférés pour un mois sur le milieu de culture M1 contenant les éléments de M0, sans charbon actif, et additionnés de BAP à 0,1 mg.l⁻¹ et d'AHS à 40 mg.l⁻¹. La culture se poursuit un mois sur le milieu M2 (M1 dont les macroéléments ont été dilués (x ½) et 45 mM saccharose). Les apex ayant développé une jeune pousse sont alors transférés sur le milieu M3 (M2 contenant 30 mM de saccharose, 80 mg.l⁻¹ de MnSO₄, H₂O et dont les seuls régulateurs de croissance sont l'AIB (0,5 mg.l⁻¹) et l'AHS (40 mg.l⁻¹)). Les plantules sont alors transférées sur un milieu de croissance M4 (macroéléments de M.Sk. x ½, microéléments de M.Sk., vitamines de Morel et Wetmore, saccharose (30 mM), AHS (40 mg.l⁻¹), AIA (0,5 mg.l⁻¹) et phytagel (2,5 g.l⁻¹)). Les cultures sont réalisées à une température de 24 °C le jour et 22 °C la nuit, sous une photopériode de 16 heures de jour (65 μmol.m⁻².s⁻¹) et 8 heures de nuit.

2.3. Cryoconservation

2.3.1. *Préculture*

Les apex sont enrobés dans des billes d'alginate de calcium [8] et placés dans des erlenmeyers contenant un milieu liquide agité (100 rpm.) M0s (M0 sans charbon actif et enrichi en saccharose). La préculture progressive est réalisée en transférant les apex enrobés dans 4 milieux successifs à teneur en saccharose croissante : 4 h à 0,25 M, 4 h à 0,5 M, 16 h à 0,75 M et 24 h à 1 M. En cas de préculture directe pendant 40 h, 4 concentrations de saccharose (0,5, 0,75, 1 et 1,25 M) ont été comparées.

2.3.2. *Désydratation évaporative*

Trois méthodes de désydratation ont été utilisées : billes placées dans une boîte contenant une solution saturée en NaCl à 75 %, billes placées au milieu de silicagel dans un cryotube, billes posées au-dessus de silicagel dans des boîtes hermétiques [5]. Pour cette dernière méthode, 3 températures (8 °C, 24 °C, 28 °C) ont été expérimentées. Toutes les désydratations sont réalisées à l'obscurité, jusqu'à obtenir une teneur en eau comprise entre 0,2 et 0,3 g.g⁻¹ MS.

2.3.3. *Congélation et réchauffement*

Après désydratation, les billes sont transférées dans des cryotubes qui sont directement plongés dans l'azote liquide durant 1 heure. Pour le réchauffement, les billes sont plongées dans le milieu M0s (à 0,75 M saccharose) à 20 °C pendant une minute. Les billes contenant les apex sont alors remises en culture sur un milieu M0 pendant quatre jours à l'obscurité puis elles sont transférées sur M1 et suivent le protocole standard de régénération.

2.4. Mesure des résultats et analyses

Les taux de survie sont déterminés trois semaines après le réchauffement en comptabilisant les apex présentant une reprise de croissance. Les taux de régénération ont été établis en évaluant le nombre d'apex ayant formé une tige feuillée (sans signe d'hyperhydricité) trois mois après le réchauffement. Les taux de survie ont été comparés avec le test d'indépendance du Chi² (avec p = 0,05) avec la correction de Yates (logiciel Statgraphics plus[®]).

Pour étudier la conformité des plantes régénérées, des plantes de 'Pansy', 'Balcon Lilas' et 'Balcon Rouge' issues d'apex cultivés *in vitro* cryoconservés ou non, ont été acclimatées en serre (3 plantes par apex initial). L'évaluation a été réalisée en comparant, sur des critères de taille, forme et couleur, le port, les feuilles et les fleurs des plantes régénérées avec ceux de plantes multipliées en serre par bouturage.

La teneur en eau des billes a été déterminée en déshydratant des billes témoins dans un four à 85 °C pendant 48 heures. Elle est exprimée en g d'eau par g de matière sèche.

2.5. Histocytologie

Les échantillons prélevés sont fixés pendant 24 heures dans un tampon phosphate 0,2 M (pH 7,2) contenant 2 % de paraformaldéhyde, 1 % de glutaraldéhyde et 1 % de caféine. Après déshydratation dans des bains successifs d'éthanol, ils sont inclus dans la résine Technovit 7100 (Kulzer®), et des coupes de 3 µm d'épaisseur sont réalisées au microtome. Les coupes sont traitées par la double coloration PAS-naphthol blue black. L'acide périodique Schiff (PAS) colore spécifiquement les polysaccharides (amidon, parois) en rouge et le naphthol blue black les protéines solubles ou de réserves en bleu sombre [9].

2.6. Mesures en microcalorimétrie différentielle à balayage

Des mesures en MDB ont été réalisées suivant le protocole décrit par Dumet *et al.* [5] en utilisant un Mettler-Toledo DSC30 (Mettler-Toledo, GmbH, Scgwerzenbach, Switzerland). Des apex ayant subi une déshydratation de 2 heures 'dans le silicagel' ou 6 heures 'au-dessus du silicagel' ont été refroidis jusqu'à -150 °C (à 50 °C min⁻¹), conservés à -150°C pendant 1 mn et réchauffé jusqu'à 25 °C (à 10 °C min⁻¹). Pendant le réchauffement, l'enthalpie et la température de fusion sont enregistrées.

3. RÉSULTATS

3.1. Simplification de l'étape de préculture

Suite à une préculture directe, 100 % des apex sont demeurés vivants jusqu'à une concentration de 0,75 M. À partir de 1 M, la survie a

diminué [11]. Une préculture directe de 40 heures dans 0,75 M a donné des taux de survie après cryoconservation (48 %) équivalents à ceux obtenus après la préculture progressive quand une déshydratation de 6 heures à 24 °C a été réalisée [5]. La préculture directe à 0,75 M a donc été adoptée pour la suite des expériences.

3.2. Optimisation de l'étape de déshydratation évaporative

3.2.1. Effet de la vitesse de déshydratation sur la tolérance à la cryoconservation

Une teneur en eau voisine de 0,3 g.g⁻¹ MS a pu être obtenue avec les trois modes de déshydratation mis au point, cela après 2 h, 6 h ou 24 h respectivement avec les traitements 'dans le silicagel', 'au-dessus du silicagel' et 'au-dessus d'une solution de NaCl saturée'. Aucun effet significatif de la vitesse de déshydratation sur les taux de survie obtenus après déshydratation ou après déshydratation et cryoconservation n'a été mis en évidence [5].

L'étude en MDB menée lors de la congélation d'apex a mis en évidence que de l'eau cristallisable, en faible quantité, peut persister dans les apex après une déshydratation menant à une teneur en eau de 0,20 g.g⁻¹ MS ($\Omega_{Hf} = 8 \text{ Jg}^{-1}\text{FW}$), que la vitesse de déshydratation soit élevée (2 h dans le silicagel) ou moyenne (6 h au-dessus du silicagel). Malgré la cristallisation de cette eau, plus de 50 % des apex survivent à la cryoconservation [5].

3.2.2. Effet de la température de déshydratation sur la tolérance à la cryoconservation

Lorsque les billes sont déshydratées 'au-dessus du silicagel', il faut des durées de déshydratation de 5 h, 7 h et 17 h aux températures respectives de 28 °C, 24 °C et 8 °C, pour aboutir à une teneur en eau voisine de 0,25 g.g⁻¹ MS. La condition 17 h à 8 °C donne des taux de survie significativement inférieurs (25 %) à ceux obtenus avec 7 h à 24 °C (58 %) et 5 h à 28 °C (83 %).

3.3. Étude histocytologique des apex au cours du processus de cryoconservation

Les dômes des apex axillaires prélevés sur les plantes en serre sont constitués de cellules isodiamétriques, à caractère méristématique : rapport nucléocytoplasmique élevé, noyau en position centrale,

nucléole unique, cytoplasme dense, présence de nombreuses vacuoles de petite taille (fig. 1.1).

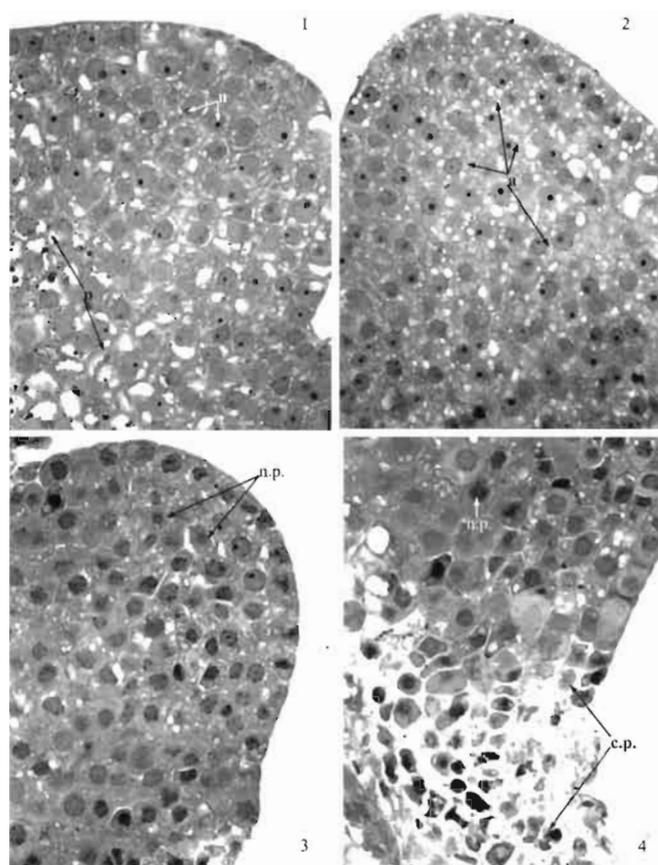
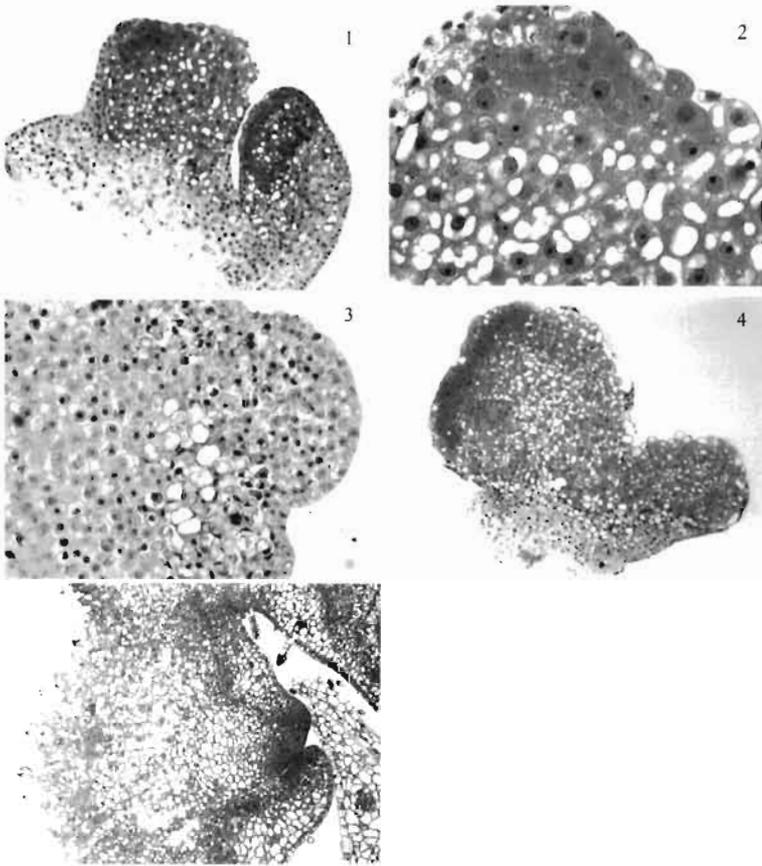


Figure 1 : Histologie des apex de 'Balcon Lilas' aux différentes étapes du protocole de cryoconservation. (x 756). 1.1 : après le prélèvement sur la plante (dôme) ; 1.2 : après 40h de préculture dans une solution à 0,75 M de saccharose (dôme) ; 1.3 : après la déshydratation évaporative (dôme) ; 1.4 : après congélation et réchauffement (base). n : nucléole, p : réserves protéiques, a : réserves amylicées, n.p. : noyau pycnotique, c.p. : cellule plasmolysée

Les cellules plus proches de la base comportent des vacuoles plus développées, celles-ci renfermant quelques protéines de réserves. Par contre aucune réserve amylicée n'est mise en évidence. Aucune figure de mitose n'est visible. Après les 40 h de préculture dans 0,75 M de saccharose (fig. 1.2), des réserves amylicées sont présentes sous forme de grains d'amidon dans la majorité des cellules. Les protéines de

réserve ne sont plus visibles. Après la phase de déshydratation (fig. 1.3), les nucléoles sont peu ou pas visibles, les noyaux comportent de nombreux îlots fortement colorés en bleu-noir par le naphthol blue-black qui correspondent à de l'hétérochromatine, certains ont un contour moins régulier. Après la congélation et le réchauffement (fig. 1.4), les cellules de la base sont fortement plasmolysées, et certaines ont un contenu qui semble détérioré. La structure des autres cellules est majoritairement conservée, les noyaux peuvent être pycnotiques, fortement et uniformément colorés, l'amidon est toujours présent.

Cinq jours après le réchauffement, les apex présentent des zones plus ou moins étendues de cellules détériorées (fig. 2.1). Dans les zones où les structures cellulaires semblent conservées, les nucléoles sont de nouveau souvent bien visibles (fig. 2.2). Certaines cellules du dôme comportent des vacuoles plus importantes que précédemment. Les réserves amylacées sont en voie de disparition. Les apex n'ayant présenté aucune reprise de croissance 14 jours après la cryoconservation sont constitués de cellules dont le noyau reste pycnotique et dont la structure est détériorée (fig. 2.3). Pour les apex en développement (fig. 2.4), les cellules semblant intactes sont majoritaires, les cellules fortement plasmolysées étant le plus souvent localisées à la base de l'apex. Cependant on peut observer que l'ensemble du dôme peut ne pas être intact : quelques cellules sont lésées et la régularité de la première assise cellulaire qui recouvre l'apex est par endroit interrompue par des cellules entièrement vacuolisées. Par comparaison, un apex, en culture depuis 14 jours sans avoir été cryoconservé (fig. 2.5), continue son développement, différenciant des primordia foliaires successifs. Aucun cal n'est visible, même dans la zone cicatricielle.



Figures 2 : 2.1 à 2.5 : Histologie de l'évolution des apex de 'balcon Lilas' après la cryoconservation. 2.1 : 5 jours après le réchauffement (x 179) ; 2.2 : 5 jours après le réchauffement (x 562) ; 2.3 : 14 jours après le réchauffement, apex ne montrant pas de signe de croissance (x 357) ; 2.4 : 14 jours après le réchauffement, apex montrant une reprise de développement (x 111.6) ; 2.5 : histologie d'un apex non cryoconservé en cours de régénération, 14 jours après la mise en culture (x89). v : vacuole, m : méristème, p.f. : primordium foliaire, flèche : perte de régularité de la première couche cellulaire.

3.4. Validation du nouveau protocole sur d'autres génotypes de *Pelargonium*

En vue d'une validation, le protocole défini sur *P. x p.* 'Balcon Lilas' (fig. 3) a ensuite été testé sur d'autres génotypes [11].

Deux autres espèces importantes en horticulture ornementale ont d'abord été utilisées : *P. x b.* et *P. x g.* Ainsi, le comportement de

'Alain' et 'Pansy' a respectivement été comparé à celui de 'Balcon Lilas'. La survie d'apex a été observée pour les trois cultivars, *P. x g.* 'Pansy' donnant des résultats significativement supérieurs (70,3 %) à ceux de *P. x p.* 'Balcon Lilas' et *P. x h.* 'Alain' (44,8 et 42,3 % respectivement) (fig. 2). Pour ces deux dernières espèces, l'étape de déshydratation provoque une chute significative du taux de survie.

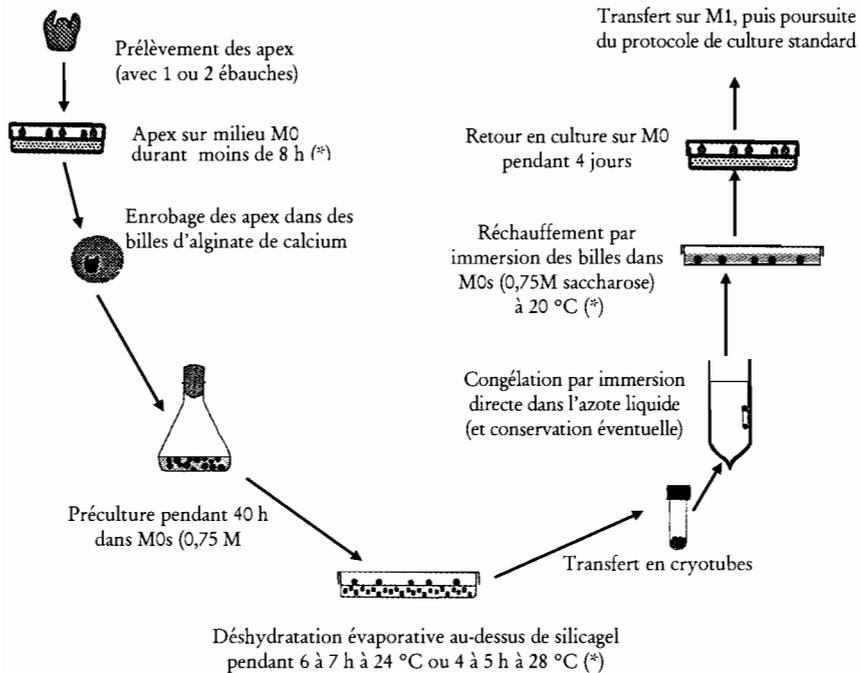


Figure 3 : Schéma du protocole de cryoconservation. Les (*) indiquent les étapes étudiées au cours du projet.

L'élargissement de la gamme de cultivars de *P. x peltatum* et de *P. x hortorum* utilisés a permis de mettre en évidence une variabilité intraspécifique : les taux de survie obtenus ont varié entre 83,9 % (*P. x h.* 'Bicolor') et 27,5 % (*P. x h.* 'Renard Bleu'). Tous les génotypes testés à une seule reprise ont produit des apex survivants, sauf *P. x h.* 'Le Quinteau'.

3.5. Évaluation de la régénération des apex

Les taux de régénération après cryoconservation, évalués pour *P. x g.* 'Pansy' et *P. x p.* 'Balcon Lilas', étaient respectivement de 44 % et de

36 %. Pour 'Balcon Lilas' 80 % des méristèmes ayant survécu à la cryoconservation ont formé une plante, ils ne sont que 63 % pour 'Pansy'.

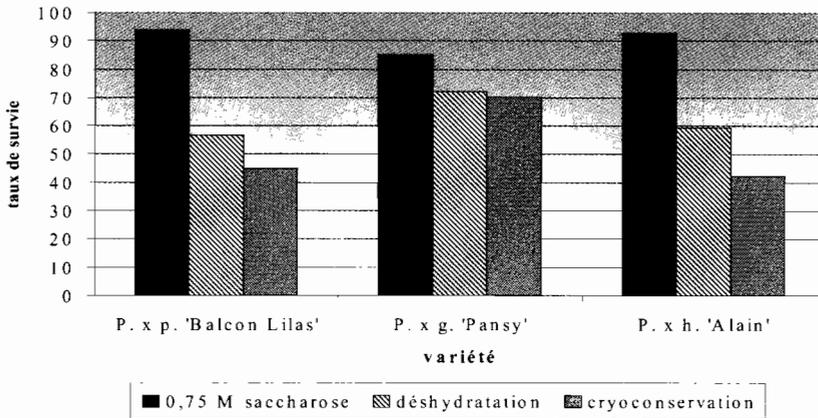


Figure 4 : Évolution des taux de survie après chaque étape du protocole de cryoconservation pour 3 cultivars de *Pelargonium* : *P. x p.* 'Balcon Lilas', *P. x g.* 'Pansy', *P. x h.* 'Alain' : après la préculture de 40 h à 0,75 M de saccharose, après la déshydratation sur silicagel, après cryoconservation et réchauffement.

3.6. Évaluation de la conformité

Vingt-quatre plantes de *P. x grandiflorum* 'Pansy', régénérées à partir de 8 apex cryoconservés, ont été acclimatées. L'évaluation de la conformité s'est faite en mai 2003, après induction de la floraison par le froid. Aucune variabilité n'a été notée aussi bien pour le port, les feuilles que les fleurs entre les plantes régénérées et les plantes témoins. Les plantes de *P. x g.* 'Pansy' issues d'apex régénérés après cryoconservation ont donc été considérées conformes, tout comme celles obtenues après une régénération classique d'apex.

Pour *P. x peltatum* 'Balcon Lilas' et 'Balcon Rouge', l'étude de la conformité a débuté par l'évaluation de plantes issues de la régénération *in vitro* d'apex. Pour 'Balcon Lilas' (4 apex), le port et la morphologie foliaire sont en général conservés (une seule tige secondaire panachée). Par contre, une modification plus ou moins généralisée s'est manifestée quant à la couleur des fleurs. Il s'agit d'un retour au type initial 'Balcon Rose', total ou partiel (quelques pétales). Pour 'Balcon Rouge' (14 apex), 85,7 % des apex ont donné des plantes conformes pour le port et

le feuillage. Par contre, seul un apex a produit des plantes totalement conformes. En effet, 85,7 % des apex ont donné au moins une plante possédant des fleurs roses (sur les 3 plantes acclimatées par apex), 50 % donnant 3 plantes à fleurs roses sur 3.

4. DISCUSSION

L'étude des différentes étapes du procédé de cryoconservation par encapsulation-déshydratation appliqué à *P. x p.* 'Balcon Lilas' a permis de mieux connaître l'impact de certains facteurs sur le taux de survie des apex. Ainsi, il a été démontré que la vitesse de déshydratation n'influait pas la survie. On peut donc supposer que le faible taux de survie obtenu avec une déshydratation à 8 °C est dû à l'application de cette faible température sur les apex et non à la lenteur de la déshydratation (17 h au lieu de 6 h à 24 °C). À notre connaissance, l'impact de la température lors de la déshydratation n'avait jamais été évalué. La reprise de ces conditions en évaluant la survie après déshydratation sans congélation permettra de mieux cerner les causes de ce phénomène.

On a ainsi défini un nouveau protocole (fig. 3) pouvant se dérouler sur 3 jours au lieu de 4 comme précédemment. Il a été démontré que, dans ces conditions, de l'eau cristallisable pouvait encore être présente en faible quantité dans les apex. La définition, à l'aide de mesures en MDB, de conditions permettant d'éliminer cette eau cristallisable résiduelle pourrait aboutir à une augmentation de la survie.

Les observations histologiques réalisées sont proches de celles obtenues sur *Phoenix dactylifera* [1], notamment pour l'accumulation d'amidon suite à la préculture. Le suivi en histologie de l'évolution des apex après cryoconservation sur une plus longue période que 15 jours permettra de savoir si la régénération se fait directement ou après callogenèse. Des coupes en microscopie électronique vont permettre d'approfondir l'analyse de l'évolution des cellules au cours du processus de cryoconservation en accédant à l'échelle infrastructurale. Elles aideront aussi à interpréter les premiers résultats semblant démontrer que le saccharose a un rôle spécifique, en comparaison avec quatre autres osmotocums, lors de la phase préparatoire à la déshydratation évaporative.

Le procédé mis au point a ensuite été évalué sur différents génotypes choisis parmi la collection. Des apex présentant une reprise de croissance après cryoconservation semblent pouvoir être obtenus facilement, même si les taux de survie varient suivant le génotype. Des coupes histologiques en microscopie optique ont été réalisées après les différentes étapes du protocole sur des apex de 'Balcon Lilas', 'Bicolor' et 'Renard Bleu', en vue de fournir des hypothèses à la différence de tolérance à la cryoconservation constatée pour ces 3 cultivars.

Le point le plus critique à résoudre se situe actuellement lors de la phase de régénération suivant la cryoconservation. Différents axes de recherche ont été explorés pour tenter d'améliorer les taux de régénération après cryoconservation comme la modification des milieux de culture ou l'extraction des apex de l'alginate après le réchauffement, afin d'éliminer un éventuel effet inhibiteur de la bille. En effet, même si pour de nombreuses espèces, dont la vigne [15], une encapsulation prolongée n'a pas d'effet négatif, l'extraction des apex deux semaines après le réchauffement favorise la reprise de croissance pour le citrange cv. Troyer [17]. Pour l'instant, les délais n'ont pas permis d'identifier des conditions apportant une amélioration notable, plus de quatre mois étant nécessaires pour évaluer correctement la régénération après cryoconservation. L'amélioration de cette étape permettra de compléter les premiers résultats obtenus sur 'Pansy' quant à la conformité. L'évaluation de la conformité des plants de 'Balcon Rouge' issus de cryoconservation est en cours. Il faut noter que les cultivars de la série 'Balcon' sont connus pour leur instabilité. Par exemple, un retour au type initial 'rose' a été systématiquement observé après néoformation sur feuilles ou pétioles [4]. Il faudra donc évaluer la conformité du matériel végétal après cryoconservation avec d'autres génotypes de *Pelargonium*, notamment des génotypes dont la structure chimérique est connue. Les résultats seront à relier avec la poursuite de l'étude histologique du développement des apex après cryoconservation qui permettra de délimiter les zones de l'apex participant à la régénération.

Les premiers travaux démontrant que la cryoconservation d'apex pouvait être plus efficace pour assainir une plante qu'une simple culture de méristème ont été réalisés sur un porte-greffe de *Prunus* contaminé par le virus de la Sharka [3]. Un résultat similaire a été obtenu pour *Vitis vinifera* L. cv. Brutti vis-à-vis du virus A de la vigne [18]. La cryoconservation d'apex de *Musa* spp. cv Williams permet d'améliorer

l'assainissement mais les taux varient en fonction du virus [12]. Les plantes de la collection étant majoritairement virosées, l'état sanitaire des pélargoniums issus de cryoconservation sera à contrôler aussi bien pour le PFBV que pour le PLPV.

Une fois toutes ces étapes franchies, on pourra complètement évaluer la pertinence de la mise en place d'une cryobanque pour la conservation à long terme de la collection de *Pelargonium*. Si cette stratégie est choisie, il faudra alors établir la liste des taxons à cryoconserver en priorité, en privilégiant ceux d'origine française et ceux représentatifs d'une large diversité.

REMERCIEMENTS

Nous souhaitons remercier Hélène HOLOTA, Aurélie GAUDUIN, Angélique FOCON et Stéphanie DOUAY pour leur participation aux essais de cryoconservation, Liliane BRISSET pour les acclimations, Éric MORTREAU pour l'aide pour les photographies, et Jacques ESCOUTE (Cirad) pour ses conseils en histologie. Ces travaux ont été réalisés dans le cadre de l'appel à propositions BRG 2001-2002.

RÉFÉRENCES

- [1] Bagniol S., Engelmann F., Michaux-Ferrière N., Histo-cytological study of apices from *in vitro* plantlets of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) during a cryopreservation process, *Cryo-letters* 13 (1992) 405-412.
- [2] Block W., Water status and thermal analysis of alginate beads used in cryopreservation of plant germplasm, *Cryobiology* 47 (2003) 59-72
- [3] Brison M., de Boucaud M.T., Pierronnet A., Dosba F., Effect of cryopreservation on the sanitary state of a cv. *Prunus* root-stock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus, *Plant Science* 123 (1997) 189-196.
- [4] Dorion N., Ben Jouira H., Renou J.P., Is the genetic stability of plants regenerated *in vitro* from *Pelargonium peltatum* and *P. x hortorum*, influenced by ploidy level of the original explant? in: Doyle B.M., Curry R.F., Cassells A.C. (éd.), Abstracts of ISHS conference 'methods and markers for quality assurance in micropropagation, Cork, 24-27 August, 1999, National University of Ireland, Cork, 1999, pp. 196-196.
- [5] Dumet D., Grapin A., Bailly C., Dorion N., Revisiting crucial steps of an encapsulation/dessiccation based cryopreservation process: importance of

- thawing method in the case of *Pelargonium* meristems, *Plant Science* 163 (2002) 1121-1127.
- [6] Engelmann F., Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources, in: Engelmann F., Takagi H. (éds), *Cryopreservation of tropical plant germplasm*. IPGRI, Rome, 2000, pp. 8-20.
- [7] Engelmann F., Dussert S., Développement de la cryoconservation pour la conservation des ressources génétiques végétales, *Cahiers Agricultures* 9 (2000) 937-945.
- [8] Fabre J., Dereuddre J., Encapsulation-dehydration: a new approach to cryopreservation of *Solanum* shoot-tips, *Cryo-Letters* 11 (1990) 413-426.
- [9] Fisher D.B., Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy, *Histochemie* 16 (1968) 92-96.
- [10] Grapin A., Hupel C., Marche C., Dorion N., First results of *Pelargonium* shoot apex cryopreservation, *Acta Hort.* 560 (2000) 157-160.
- [11] Grapin A., Dumet D., Holota H., Dorion N., Cryopreservation of *Pelargonium* shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of sucrose concentration, dehydration duration, and genotype, *Acta Hort.* 623 (2003) 225-230.
- [12] Helliot B., Panis B., Poumay Y., Swennen R., Lepoivre P., Frison E., Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Rep.* 20 (2002) 1117-1122.
- [13] Murashige T., Skoog F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* 15 (1963) 473-497.
- [14] Morel G., Wetmore R.H., Fern callus tissue culture, *Ann. J. Bot.* 38 (1951) 141-143.
- [15] Plessis P., Leddet C., Collas A., Dereuddre J., Cryopreservation of *Vitis vinifera* L. cv Chardonnay shoot tips by encapsulation-dehydration: effects of pretreatment, cooling and postculture conditions, *Cryo-Letters* 14 (1993) 309-320.
- [16] Schäfer-Menuhr A., Scumacher H.M., Mix-Wagner G., Cryopreservation of potato cultivars - Design of a method for routine application in genebanks, *Acta Hort.* 447 (1997) 477-482.
- [17] Wang Q.C., Batuman Ö., Li P., Bar-Joseph M., Gafny R., Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of 'Troyer' citrange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.) by encapsulation-dehydration, *Plant Cell Rep.* 20 (2002) 901-906.
- [18] Wang Q., Mawassi M., Li P., Gafny R., Sela I., Tanne E., Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L., *Plant Science* 165 (2003) 321-327.

Grapin A., Dumet D., Verdeil Jean-Luc, Bailly C., Dorion N

Etudes préalables à la mise en place d'une cryobanque
d'apex de Pelargonium : optimisation du procédé, vérification
de la conformité des plantes régénérées

In : Un dialogue pour la diversité génétique. Paris : BRG, 2005,
p. 411-426

(Les Actes du BRG ; 5). ISBN 2-908-447-33-9 Colloque
National du BRG : Un Dialogue pour la Diversité Génétique, 5.