

Université Frères Mentouri Constantine

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Ecologie Végétale

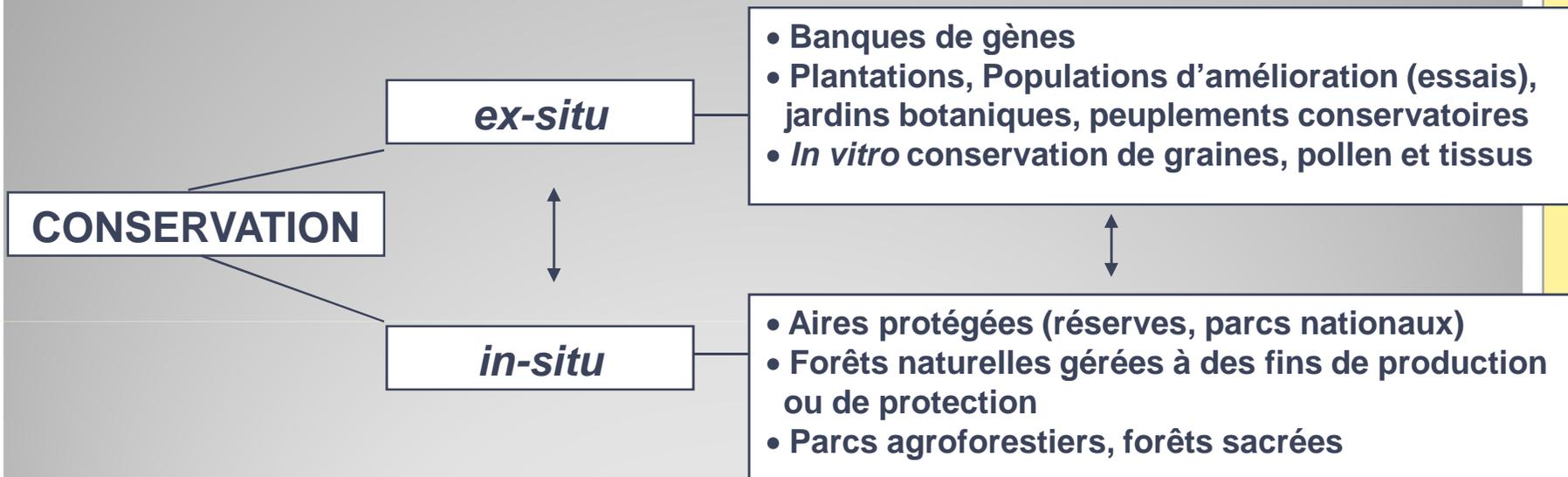
Master en Biologie et Génomique végétale

Cours de : Biotechnologie et Amélioration des Plantes

PGR Conservation



PGR Conservation



Forêts naturelles



Plantations



Champs des producteurs

Méthodes de conservation

L'utilisation des techniques de culture *in vitro* est d'un grand intérêt pour conserver :

- 1) les ressources génétiques d'espèces à semences récalcitrantes et propagées végétativement ;
- 2) les produits de la biotechnologie (génotypes élite, lignées cellulaires productrices de métabolites, matériel génétiquement modifié) ;
- 3) les espèces rares et menacées.

Méthodes de conservation

La conservation à **moyen terme** est réalisée en réduisant la croissance du matériel végétal, ce qui permet d'espacer les repiquages. Des protocoles de stockage en croissance ralentie sont employés pour de nombreuses espèces tropicales et tempérées.

Pour la conservation à **long terme**, la cryoconservation (azote liquide, -196 °C) permet de stocker le matériel végétal sans modifications ni altérations pendant des durées prolongées, à l'abri des contaminations et avec un entretien réduit.

Méthodes de conservation

La cryoconservation est bien développée avec les espèces à multiplication végétative.

Les recherches sont nettement moins avancées avec les espèces à semences récalcitrantes, du fait de certaines de leurs caractéristiques, telles leur sensibilité élevée à la dessiccation,

leur complexité structurale

et leur hétérogénéité en termes de stades de développement et de teneur en eau à maturité.

Conservation en croissance ralentie

Pour la croissance en vie ralentie, la technique la plus largement utilisée est la réduction de la température qui peut être combinée avec une diminution de l'intensité lumineuse ou avec une culture à l'obscurité.

Des températures de l'ordre de 0-5 °C sont employées pour les espèces tolérantes au froid.

Conservation en croissance ralentie

Les **espèces tropicales** sont souvent sensibles au froid et doivent être conservées à des températures plus élevées, qui dépendent de leur sensibilité au froid. Diverses modifications peuvent également être apportées au milieu de culture afin de ralentir la croissance.

Les techniques de conservation à moyen terme sont utilisées en routine pour de nombreuses espèces, à la fois d'origine tropicale et tempérée, telles que la pomme de terre, les *Musa* spp. et le manioc.

Conservation en croissance ralentie

En 1996, la FAO recensait environ 38 000 accessions conservées *in vitro* en vie ralentie.

Si la conservation *in vitro* semble une option simple et pratique pour la conservation à moyen terme de nombreuses espèces,

son utilisation nécessite une adaptation à chaque nouveau matériel ainsi que des apports continus d'intrants,

Conservation en croissance ralentie

Des questions se posent quant à la stabilité génétique du matériel stocké pour certaines espèces.

Des directives techniques ont été publiées récemment qui peuvent servir de guide aux chercheurs et gestionnaires des banques de gènes pour l'établissement et la gestion des collections *in vitro* de ressources génétiques.

Cultures *in vitro* en conditions de croissance réduite :

Avantage :

Faible surface / jardin botanique

Exemple : Conservation de cultures de bananes

Inconvénients :

Importantes charges de travail

risque de pertes : contaminations,
erreur humaine

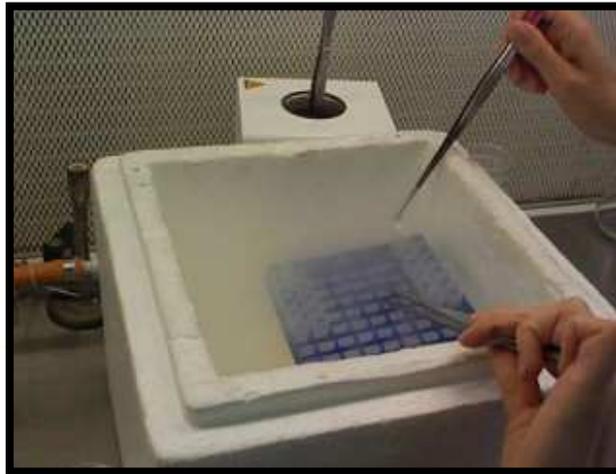
variations somaclonales



<http://www.biw.kuleuven.be>

Meilleure solution : la cryopréservation

Stockage à -196°C



- Cryopréservation de cultures de tissus (**100 espèces**)
- Cyopréservation de graines récalcitrantes (**40 espèces**)
- Conservation de souches de cellules fortement productrices de métabolites secondaires
- Conservation de tissus génétiquement modifiés

Cryoconservation

- Conservation de matériel vivant à très basse température
 - Azote liquide (-196°C)
 - Vapeurs d'azote (-150°C)
- État de vie suspendue, réversible

Problématique :

Conservation d'espèces en voie de disparition :

Objectif agronomique : réservoir de variabilité utilisable pour des plans de sélection

Objectif médical : réservoir de substances actives inconnues

Objectif éthique : préservation d'une richesse de nature non-marchande

Conservation de variétés agronomiques ou horticoles intéressantes

Éviter de perdre les variétés tombées en abondance

Érosion génétique des espèces à multiplication végétative



Conservation de graines
orthodoxes à basse
température

Graines récalcitrantes

Espèces à multiplication
végétative (pomme de terre,
bananier, manioc)

Souches de culture *in vitro*

Applications

La résistance à la congélation a été prouvée pour de nombreux matériels (semences orthodoxes et intermédiaires, bourgeons dormants, pollen, cultures *in vitro*).

Le développement de la cryoconservation est beaucoup plus avancé pour les espèces multipliées végétativement que pour celles à semences récalcitrantes.

Principes

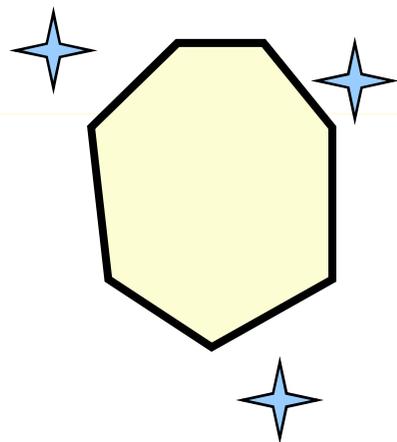
Les progrès réalisés récemment dans la mise au point de techniques simples et performantes de cryoconservation et dans la compréhension des phénomènes **physiques** et **biochimiques** y afférant devraient accroître son emploi dans les programmes de conservation des ressources génétiques et de biotechnologie.

Principes

- Éviter la formation de cristaux dans le cytoplasme
 - Congélation rapide
 - Déshydratation des échantillons
 - Séchage à l'air
 - Déshydratation par congélation lente

Déshydratation par congélation

- Prérefroidissement (- 40°C)

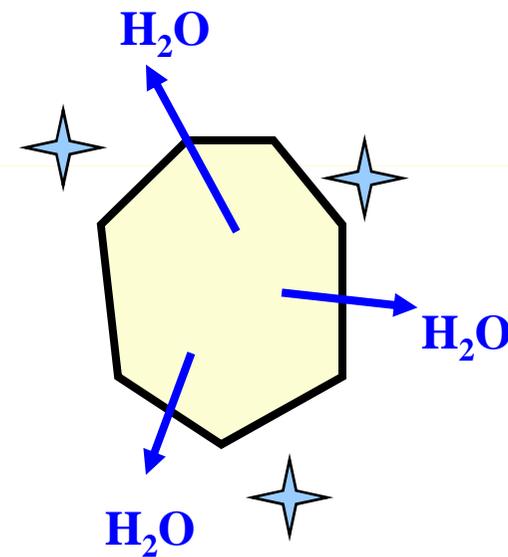


Formation de cristaux dans le milieu extracellulaire

Le cytoplasme reste en surfusion



Abaissement du potentiel hydrique du milieu extracellulaire



Déshydratation de l'échantillon

Vitrification du milieu intracellulaire

- Solidification non-cristalline du cytoplasme
 - Concentration de solutés osmoprotectants
 - Congélation rapide

Substances cryoprotectrices

- DMSO, glycérol, proline
- Adaptation métabolique:
 - Froid
 - Réduction photopériode
 - ABA

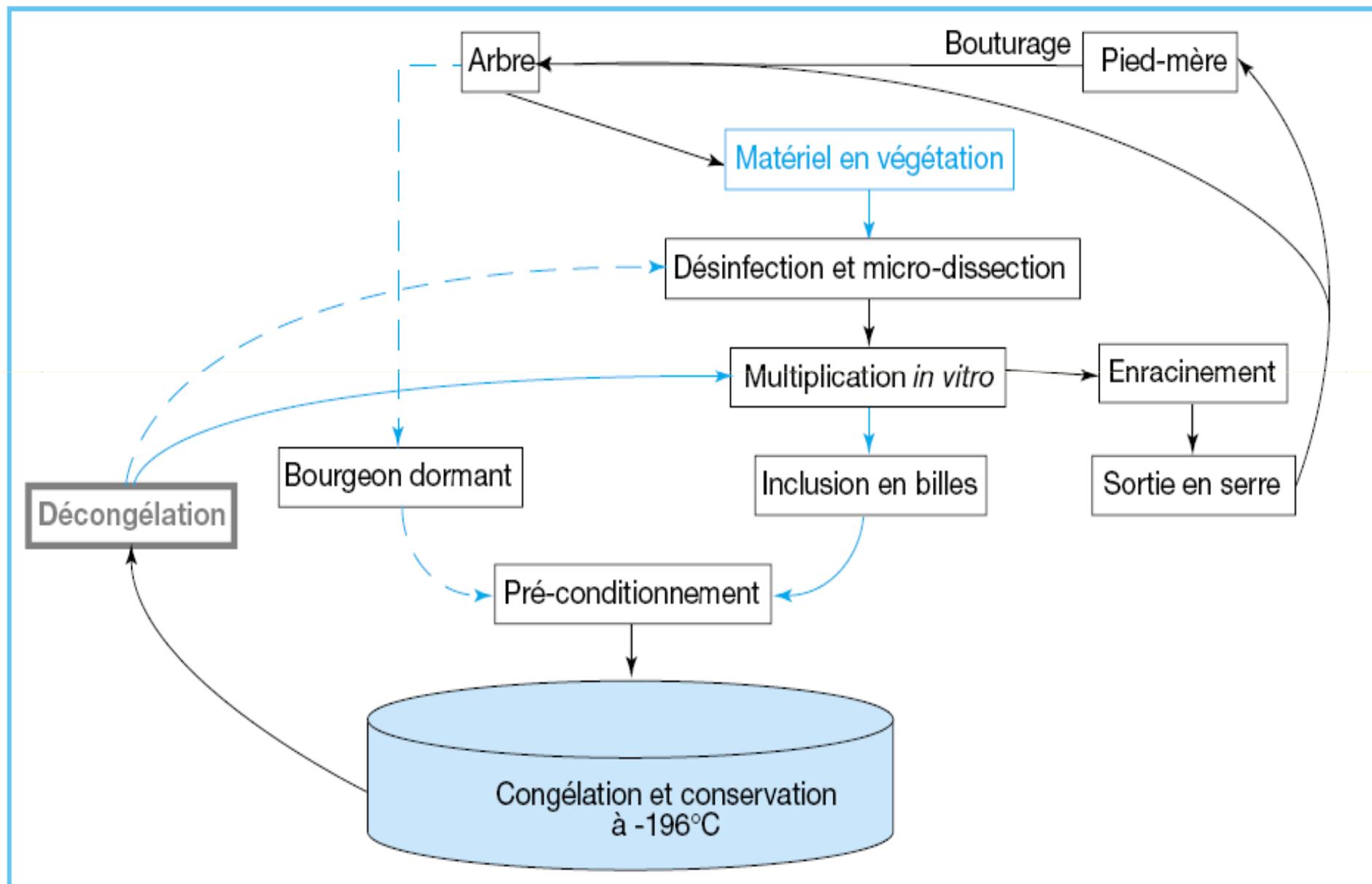
} [solutés] ↗
Sucres, proline,
glycine bétaine

Exemple de cryoconservation



Aperçu des étapes de la cryoconservation du rameau prélevé en forêt à la plante régénérée en passant par le cryotube et les étapes de réactivation en culture *in vitro* (microbouturage).

Deux techniques différentes de cryoconservation sont utilisées selon l'état de végétation du bourgeon cryoconservé (dormant : flèches bleues pointillées ; végétation active : flèches bleues continues)





Réceptacle d'azote
liquide avec des
échantillons
végétaux
cryopreservés