

Bioencapsulation de la vigne pour la production et la conservation de semences miniaturisées

Katia GINDRO, Daniel THOMAS, Eric REMOLIF, Jean-Pierre DE JOFFREY, Susete ULLIEL, Corinne JULMI-MOREILLON, Maëlle CORMINBOEUF et Eric DROZ, Agroscope, 1260 Nyon

Renseignements: Eric Droz, e-mail eric.droz@agroscope.admin.ch, tél. +41 22 363 44 19, www.agroscope.ch

La bioencapsulation est une méthode de conservation couramment utilisée pour conserver les aliments, les molécules ou encore des échantillons liés à la médecine (éléments prophylactiques) ou à l'agronomie (enrobage de graines) (Chang 2012).



Microbille de vigne.

Les molécules, les matières organiques ou inorganiques sont enrobées dans une substance qui permet une prolongation de la conservation, sans détérioration. La dimension des échantillons encapsulés peut varier de quelques nanomètres de diamètre à des objets de grande taille. Par exemple, des protéines peuvent être enrobées dans divers polymères (formation de particules sphériques nanométriques) afin de les conserver tout en empêchant leur dégradation. En plus, la bioencapsulation permet de mieux protéger les échantillons en empêchant par exemple la prolifération de microorganismes. Ces dernières années, des techniques ont été développées en particulier dans la production de semences artificielles enrobées notamment dans des matrices de polysaccharides (Murano 2000). Ces matrices renferment des fragments de plantes bioencapsulés, ou micro-encapsulés, afin de pouvoir disposer de semences saines, de qualité, en vue d'une large distribution ou pour conserver des génotypes agronomiquement importants. Ces semences

artificielles ont été mises au point pour plusieurs espèces végétales cultivées, telles que les conifères (Attré *et al.* 1994), les plantes maraîchères (Ghosh et Sen 1994), fruitières (Pattnaik et Chand 2000), ornementales (Jainero *et al.* 1997), aromatiques (Sharma *et al.* 1994) et la pomme de terre (Lê *et al.* 2002; 2003). Dans la plupart des cas, on utilise des embryons somatiques pour la production de ces semences. Toutefois, l'utilisation des bourgeons axillaires ou d'autres parties végétatives peut être très intéressante pour la diffusion en masse et la conservation stable de diverses plantes. Dans le travail présenté ici, une étude a été entreprise pour évaluer la réalisation de semences artificielles de vigne par micro-encapsulation de bourgeons axillaires. Cette technique devrait permettre la conservation *in vitro* à long terme de matériel végétal de haute qualité. Ce procédé réalisable tout au long de l'année réduit de façon considérable les opérations conventionnelles de repiquage d'une collection *in vitro*.



Figure 1 | Vignes en culture *in vitro* issues du conservatoire d'Agroscope.

Description du procédé

A cette fin, les trois premiers bourgeons axillaires depuis l'apex ont été prélevés stérilement à partir de micro-plantes de différents cépages (Divico, Diolinoir, Rouge de Diolly) issus du conservatoire *in vitro* d'Agroscope (fig.1). Les bourgeons prélevés ont été immergés dans une solution nutritive de base selon Murashige et Skoog (1962) contenant 3 % d'alginate, puis l'opération a été répétée dans une solution de chlorure de calcium à 100mM, ce qui permet la formation de microbilles sphériques. Une deuxième couche d'alginate a été ajoutée selon le même procédé, des résultats précédemment obtenus sur pomme de terre par Agroscope ayant en effet montré que l'utilisation de plusieurs couches d'alginate permettait d'améliorer la survie des microbilles (Lê *et al.* 2003). Ces microbilles ont été placés dans des boîtes de Pétri et maintenues en chambre froide (4°C) sous lumière alternée (8h lumière/14h nuit) durant la période de conservation. L'humidité relative a été maintenue à plus de 55%. Toutes les étapes de production des microbilles sont illustrées dans la figure 2. Afin d'évaluer le taux de sur-

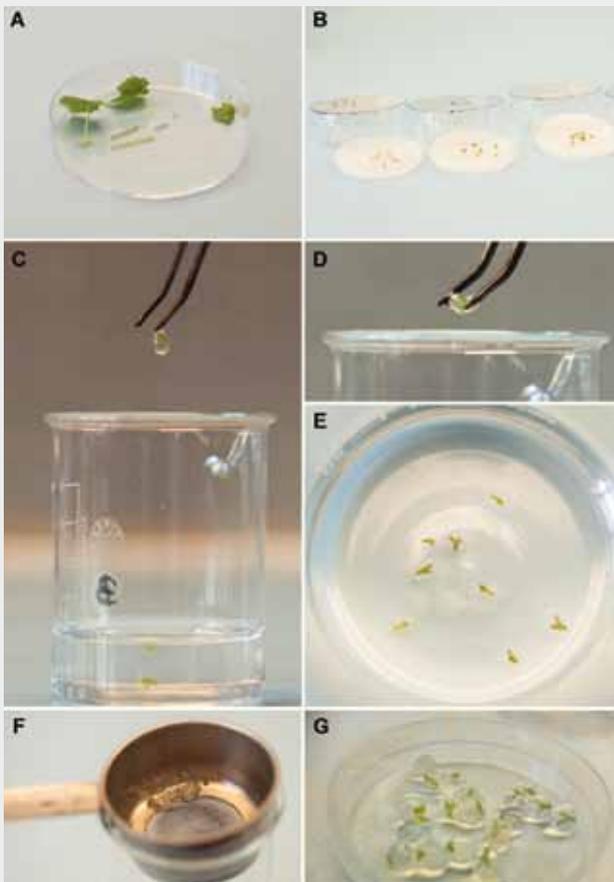


Figure 2 | Étapes de production des microbilles de vigne. A-B. Récolte des bourgeons axillaires. C à E. Enrobage progressif des bourgeons axillaires. F. Rincage et récolte des microbilles. G. Microbilles.

vie et l'effet de l'enrobage et du stockage à froid sur le potentiel de reprise et de croissance végétative des bourgeons, les microbilles ont été prélevées régulièrement (tous les mois durant six mois), incluant un temps zéro sans stockage à 4°C. Après sortie du froid, les microbilles ont été mises en culture à la surface d'un milieu liquide stérile (GPDT1) contenant des sels minéraux, du fer, des sucres et des vitamines jusqu'au développement des racines. Le taux de reprise a été quantifié, puis les microplantes ainsi développées ont été transplantées dans des mélanges terre de vigne:perlite, en différentes proportions (respectivement 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 et 100:0) afin d'évaluer leur croissance sur différents substrats. Les vignes ainsi transplantées ont été acclimatées durant dix jours à l'humidité puis placées en serre sans autre traitement.

Résultats de l'essai

Les résultats ont montré que le niveau d'insertion des bourgeons axillaires était déterminant pour obtenir un taux de reprise optimal: en effet, seuls les bourgeons de l'apex permettent un taux de reprise supérieur à 80 % sur des microbilles non stockées. En parallèle, le maintien au froid durant un peu plus de six mois a très peu altéré le taux de reviviscence. Les microbilles stockées durant neuf mois manifestent toutefois un taux de reprise plus faible, d'environ 60 %. Le transfert des microbilles aux conditions de culture conventionnelles exige une étape de reviviscence en immersion partielle sur un milieu nutritif. La transplantation directe des microbilles sur la terre et/ou la perlite n'a pas été possible. En revanche, après l'étape de reviviscence, les micro-plantes peuvent être indifféremment transplantées sur de la terre ou l'un des mélanges proportionnels de terre de vigne-perlite, puis acclimatées (fig. 3). Ces plantes suivent un développement tout à fait normal, permettant l'obtention de bois utilisable pour le greffage après deux ans.

Discussion et conclusions

Afin de garantir la haute qualité du matériel végétal, de pouvoir le conserver des mois de façon stable dans un espace réduit avec un minimum de manipulations et de pouvoir le diffuser rapidement et aisément, une méthode de bioencapsulation de micro-boutures de vigne a été testée. Des optimisations techniques sont en cours pour les conditions d'enrobage spécifiques à la vigne. L'utilisation par exemple de charbon actif, de chélateurs ou d'adsorbants tels que le polyvinylpyrrolidone durant les étapes d'enrobage devrait permettre d'améliorer le taux de reprise à long terme, en mobilisant et en détoxifiant les exsudats phénoliques de la vigne. En effet, la



Figure 3 | Reviviscence de la vigne après stockage en microbille à 4 °C. A. Stade de reviviscence de la vigne après culture sur milieu nutritif liquide. B. Acclimatation des microplantes de vigne sur des mélanges de terre de vigne et de perlite en différentes proportions.

vigne synthétise de nombreux métabolites phénoliques oxydables pouvant mener à terme à une auto-phyto-toxicité pour la plantule, même en stockage au froid. De même, le matériel d'enrobage pourrait être amélioré en ajoutant une surcouche de membrane de chitosan afin d'optimiser le temps de désintégration progressive de l'alginate (Sobol *et al.* 2013). A terme, l'utilisation de microbilles pour le maintien en conservatoire et un sevrage en serre pour une diffusion rapide de vignes saines sont les objectifs que nous nous proposons d'atteindre, tout en travaillant parallèlement sur l'étude de la stabilité génétique du matériel végétal. La même démarche expérimentale est en cours pour les anciennes variétés de fraises conservées à Agroscope. ■

Bibliographie

- Attre S. M., Pomeroy M. K. & Fowke L. C., 1994. Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce (*Picea glauca* [Moench.] Voss.) synthetic seeds in a bioreactor. *Plant Cell Report* **13**, 601–606.
- Chang T. M. S., 2012. From artificial red blood cells, oxygen carriers, and oxygen therapeutics to artificial cells, nanomedicine, and beyond. *Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology* **40** (3), 197–199.
- Ghosh B. & Sen S., 1994. Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Asparagus cooperi* Baker. *Plant Cell Report* **13**, 381–385.
- Lê C. L., Thomas D. & Nowbuth L., 2002. Conservation des pommes de terre *in vitro* et caractérisation des variétés cultivées en Suisse. *Revue suisse d'Agriculture* **34** (3), 133–136.
- Lê C. L., Thomas D., de Joffrey J. P. & Tschuy F., 2003. Bioencapsulation: production et conservation de semences de pomme de terre miniaturisées *in vitro*. *Revue suisse d'Agriculture* **35** (4), 199–203.

- Murano E., 2000. Natural gelling polysaccharides: indispensable partners in bioencapsulation technology. *Minerva Biotechnologica* **12** (4), 213–222.
- Murashige T. & Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology of Plant* **15**, 473–497.
- Pattnaik S. & Chand P. K., 2000. Morphogenic response of the alginate-encapsulated axillary buds from *in vitro* shoot cultures of six mulberries. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **60**, 177–185.
- Sobol M., Bartkowiak A., de Haan B. & de Vos P., 2013. Cytotoxicity study of novel water-soluble chitosan derivatives applied as membrane material of alginate microcapsules. *Journal of Biomedical Materials Research* **101A** (7), 1907–1914.

Publicité

 The advertisement features a woman with brown hair, smiling, standing in a vineyard. She is holding a bunch of green grapes. The background shows rows of grapevines under a clear sky.

«**Dynali** est au centre de ma stratégie contre l'oïdium.»

Salomé Roux
Vigneronne/œnologue, Champlan/VS
www.dynali-syngenta.ch

syngenta®