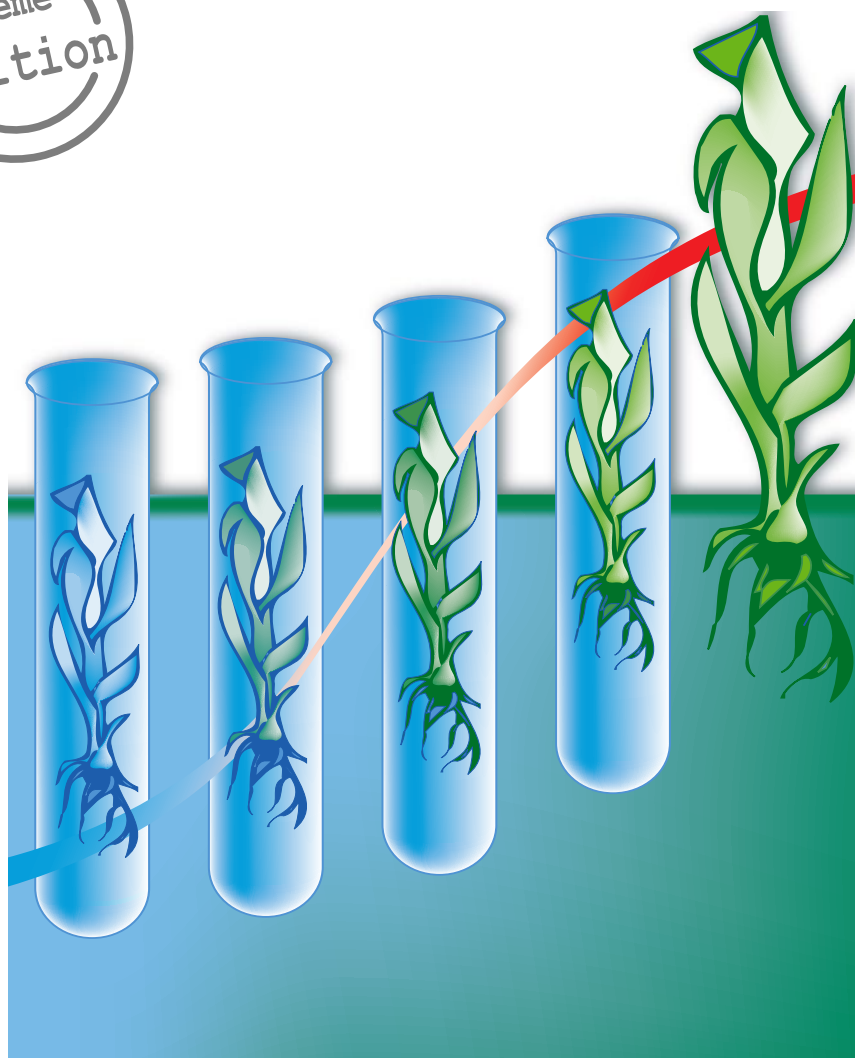




Cryoconservation de matériel génétique de bananier

Bart Panis



Bioversity International est un organisme scientifique indépendant à caractère international visant à promouvoir la conservation et le déploiement en champ et dans les forêts des ressources phytogénétiques au profit des générations actuelles et futures. Il est un des 15 centres fonctionnant sous l'égide du Groupe consultatif pour la recherche agricole internationale (GCRAI), une association de membres des domaines privés et publics qui soutiennent les efforts pour utiliser la science de pointe pour réduire la faim et la pauvreté, améliorer l'alimentation et la santé, et pour protéger l'environnement. Bioversity a son siège social à Maccarese, près de Rome, en Italie, et possède des bureaux régionaux dans plus de 20 pays à travers le monde. Il fonctionne sur la base de quatre programmes : (1) Diversity for Livelihoods (La diversité au service de tous) (2) Understanding and Managing Biodiversity (Mieux connaître et gérer la biodiversité) (3) Commodities for Livelihoods (Les denrées de base pour une vie meilleure) et (4) Global Partnerships (Partenariats internationaux)

Le statut international a été conféré à Bioversity au titre d'un accord d'établissement qui, en janvier 2008, avait été signé par les gouvernements des pays suivants: Algérie, Australie, Belgique, Bénin, Bolivie, Brésil, Burkina Faso, Cameroun, Chili, Chine, Congo, Costa Rica, Côte d'Ivoire, Chypre, Danemark, Egypte, Equateur, Ethiopie, Ghana, Grèce, Guinée, Hongrie, Inde, Indonésie, Iran, Israël, Italie, Jordanie, Kenya, Malaisie, Mali, Maroc, Mauritanie, Norvège, Oman, Ouganda, Pakistan, Panama, Pérou, Pologne, Portugal, République de Maurice, République Slovaque, République Tchèque, Roumanie, Russie, Sénégal, Soudan, Suisse, Syrie, Tunisie, Turquie, et Ukraine.

Pour mener à bien son programme de recherche, Bioversity reçoit une aide financière de plus de 150 donateurs, incluant des gouvernements, des fondations privées et des organismes internationaux. Pour plus de renseignements sur les donateurs et les activités de recherche, consultez les rapports annuels de Bioversity. Des copies imprimées sont disponibles sur demande à bioversity-publications@cgiar.org ou à partir du site web de Bioversity (www.bioversityinternational.org).

Les désignations géographiques utilisées dans cette publication ainsi que la présentation de matériel ne sont en aucun cas le signe d'une opinion, quelle qu'elle soit, exprimée par Bioversity ou le GCRAI quant au statut légal d'un pays, d'un territoire, d'une ville ou une zone ou l'autorité qui les dirige, ou sur la délimitation de ses frontières géographiques ou administratives. De même, les opinions exprimées sont celles des auteurs et ne reflètent pas nécessairement celles de ces organisations.

La mention d'une marque déposée ne constitue pas le cautionnement du produit et n'est faite qu'à titre d'information

Le Centre technique de coopération agricole et rurale (CTA) a été créé en 1983 dans le cadre de la Convention de Lomé entre les États du Groupe ACP (Afrique, Caraïbes, Pacifique) et les pays membres de l'Union européenne. Depuis 2000, le CTA exerce ses activités dans le cadre de l'Accord de Cotonou ACP-UE.

Le CTA a pour mission de développer et de fournir des services qui améliorent l'accès des pays ACP à l'information pour le développement agricole et rural, et de renforcer les capacités de ces pays à produire, acquérir, échanger et exploiter l'information dans ce domaine. Les programmes du CTA sont conçus pour : fournir un large éventail de produits et services d'information et mieux faire connaître les sources d'information pertinentes ; encourager l'utilisation combinée de canaux de communication adéquats et intensifier les contacts et les échanges d'information, entre les acteurs ACP en particulier ; renforcer la capacité ACP à produire et à gérer l'information agricole et à mettre en œuvre des stratégies de GIC, notamment en rapport avec la science et la technologie. Le travail du CTA tient compte de l'évolution des méthodologies et des questions transversales telles que le genre et le capital social.

Le CTA est financé par l'Union Européenne.

Site Web : www.cta.int

Citation: Panis B. 2009. Cryoconservation de matériel génétique de bananier: 2ème édition. Guides techniques No. 9 (F. Engelmann et E. Benson, eds). Bioversity International, Montpellier, France.

INIBAP ISBN 978-2-910810-87-0

© Bioversity International, 2009

Bioversity International
Via dei Tre Denari, 472/a
00057 Maccarese
Rome, Italie

Bioversity - France
Parc Scientifique Agropolis
34397 Montpellier Cedex 5
France

CTA
Postbus 380
6700 AJ Wageningen
Pays-Bas





Cryoconservation de matériel génétique de bananier

2^{ème} édition

Bart Panis

Laboratory of Tropical Crop Improvement, Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgique

Florent Engelmann¹ et Erica Benson², éditeurs

¹ IRD, UMR DIAPC, BP 64501 34394 Montpellier cedex 5, France et Bioversity International, Via dei Tre Denari 472/a, 00057 Maccaresse (Fiumicino), Rome, Italie

² Damar Research Scientists, Damar, Drum Road Cupar Muir, Fife, Ky15 5RJ, Ecosse.



Remerciements

L'auteur souhaite remercier:

- le *Directorate General for Development Cooperation* (DGDC), Belgique pour l'appui financier apporté au travers de l'Inibap (Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, aujourd'hui Bioversity International), ainsi que la Banque Mondiale, dans le cadre du projet *Global Crop Diversity Trust* et de la *Collective Action for the Rehabilitation of Global Public Goods in the CGIAR Genetic Resources System*, et la Fondation Gatsby, pour leur collaboration financière aux recherches concernant le développement des protocoles décrits dans ces guides techniques.
- Bioversity International et le Centre technique de coopération agricole et rurale (CTA) pour leur appui financier à la publication de ces guides techniques.

Doivent également être tout particulièrement remerciés :

- Erica Benson et Florent Engelmann, spécialistes en cryoconservation, pour l'édition scientifique de cet ouvrage,
- Claudine Picq et Vincent Johnson pour son édition technique.

Illustration de couverture : Roberto Hamm, Crayon & Cie

Table des matières

Avant-propos	5
1. Protocoles de cryoconservation des méristèmes du bananier	8
1.1 Introduction	8
1.1.1 Détection de bactéries endophytes	8
1.2 Cryoconservation de méristèmes apicaux de bananier	9
1.2.1 Matériel végétal	10
1.2.2 Cryoconservation par vitrification en gouttes	11
1.3 Cryoconservation de massifs de méristèmes (structures en chou-fleur)	14
1.3.1 Matériel végétal	14
1.3.2 Méthode de congélation simple	16
1.3.3 Vitrification en gouttes de massifs de méristèmes en 'chou-fleur'	18
2. Cryoconservation de suspensions embryogènes de bananier	21
2.1 Introduction	21
2.2 Matériel végétal	22
2.2.1 Matériel de départ	22
2.3 Cryoconservation des suspensions cellulaires	23
2.3.1 Préculture	23
2.3.2 Cryoprotection	23
2.3.3 Congélation et stockage	23
2.3.4 Décongélation et reprise	25
2.3.5 Test de viabilité des suspensions cellulaires	26
3. Cryoconservation d'embryons zygotiques	27
3.1 Matériel et méthodes	27
3.1.1 Préculture	27
3.1.2 Déshydratation	28

3.1.3	Congélation	28
3.1.4	Décongélation et reprise	28
4.	Discussion et perspectives	29
4.1	Cryoconservation de méristèmes de bananier	29
4.1.1	Vitrification en gouttes des méristèmes apicaux de bananier	29
4.1.2	Cryoconservation de massifs de méristèmes	30
4.1.3	Méthode de congélation simple	30
4.1.4	Vitrification en gouttes des massifs de méristèmes en chou-fleur	31
4.1.5	Optimisation des protocoles	31
4.1.6	Cryoconservation de la collection de bananier	33
4.2	Suspensions cellulaires	34
4.2.1	Prétraitement	34
4.2.2	Cryoprotection	34
4.2.3	Congélation	35
4.3.4	Traitements après décongélation	35
Annexes		37
	Annexe 1. Composition des milieux et solutions	39
	Annexe 2. Equipement de base nécessaire	42
	Annexe 3. Liste des abréviations	43
Références bibliographiques		44
	Bibliographie complémentaire	47

Avant-propos

Les bananiers et les bananiers plantain (*Musa* spp.) sont parmi les plantes cultivées les plus importantes au monde. Plus de 400 millions de personnes dans les pays en voie de développement tropicaux et subtropicaux dépendent de ces plantes, tant pour leur alimentation que comme source importante de revenu généré par son commerce local et international.

Les bananiers et les bananiers plantain sont cultivés presque exclusivement par des petits agriculteurs et la production est basée sur une large gamme de variétés d'intérêt local. Cependant, dans de nombreuses régions, cette production souffre de plus en plus de la pression des maladies et ravageurs. En réponse à ce problème, plusieurs programmes sur les bananiers et bananiers plantain dans le monde travaillent à l'obtention de variétés améliorées, dotées d'un rendement élevé et résistant aux phytopathogènes.

Les matériels de départ pour l'amélioration du bananier sont les espèces sauvages de *Musa* et diverses variétés trouvées plus particulièrement en Asie, centre de diversité des *Musa*, mais également en Afrique et en Amérique latine. Ces espèces et cultivars contiennent les gènes nécessaires pour améliorer durablement la production contre les attaques de maladies et de ravageurs et le changement des conditions environnementales. Afin d'assurer la disponibilité de ces ressources cruciales pour l'amélioration et la production futures, il est essentiel que le matériel génétique de *Musa* soit conservé en sûreté.

Bioversity International (antérieurement INIBAP) est en charge de la collection mondiale de matériel génétique de *Musa*. Celle-ci est constituée de plus de 1185 accessions, tant espèces sauvages que variétés cultivées et est placée sous les auspices de la FAO. Cette collection active est actuellement maintenue *in vitro*, dans des conditions de faibles luminosité et température afin de ralentir la croissance des cultures. Malgré ces conditions de croissance ralentie, un repiquage de toutes les accessions sur milieu neuf une fois par an reste nécessaire. Le processus de repiquage demande une main-d'œuvre importante et fait encourir des risques de contamination fongique ou bactérienne aux accessions. En outre, malgré des conditions de croissance ralentie, les accessions maintenues *in vitro* sont sujettes aux phénomènes de variation somaclonale.

Pour surmonter ces problèmes et assurer une conservation à long terme en toute sécurité des ressources génétiques de *Musa*, Bioversity finance la recherche sur la cryoconservation, c'est-à-dire la conservation à température ultra basse, généralement dans l'azote liquide (-196°C). C'est

une méthode de choix pour assurer un stockage à long terme rentable et sûr des ressources génétiques d'espèces à germination récalcitrante ou à propagation végétative, telles *Musa*. Ces recherches sont effectuées à la *Katholieke Universiteit Leuven*, en Belgique (KULeuven) et les techniques développées sont maintenant utilisées en routine pour la cryoconservation d'accessions détenues par Bioversity. La conservation à long terme en toute sécurité dans l'azote liquide concerne actuellement presque la moitié de la collection. Cette collection cryoconservée est complémentaire à la collection *in vitro* et sert de collection de secours en cas de perte d'accessions pour raisons de contamination, variation somaclonale ou erreurs humaines lors du processus de repiquage.

Les techniques de cryoconservation sont, en principe, applicables à n'importe quel type de tissu végétal doté d'un potentiel de régénération. De telles techniques ont maintenant été développées pour plus de 200 espèces végétales cultivées sous des formes diverses, y compris des suspensions cellulaires, des cals, des apex, des embryons somatiques et zygotiques (Reed 2008).

Deux types de tissus méristématiques à fort potentiel de régénération peuvent être obtenus *in vitro* à partir du bananier :

- (i) des méristèmes individuels isolés à partir de cultures de méristèmes apicaux et
- (ii) des cultures de méristèmes en prolifération active contenant des massifs de méristèmes de type 'chou-fleur'. Les méthodes de cryoconservation ont été développées pour ces deux types de tissu.

En outre, les suspensions cellulaires embryogènes de plusieurs cultivars appartenant à différents groupes génomiques sont désormais stockées dans l'azote liquide (Panis et al. 1990, Panis 1995, Panis et al. 2005b). L'objectif principal de la conservation à long terme de suspensions cellulaires embryogènes de bananier n'est pas le maintien de la diversité du bananier. Certaines accessions de bananier sont récalcitrantes à l'établissement de suspensions cellulaires embryogènes et ce processus est extrêmement chronophage (jusqu'à 15 mois). C'est pourquoi, la cryoconservation est, dans ce cas, considérée comme une aide aux applications biotechnologiques telles le génie génétique (Strosse et al. 2003).

Cet ouvrage décrit les différentes méthodes actuellement utilisées à KULeuven pour la cryoconservation des *Musa*. Les avantages et les inconvénients de chaque méthode sont exposés et les domaines requérant davantage de recherche en vue d'optimiser les protocoles sont identifiés.

L'objectif de cette publication est de donner des informations et des conseils sur les méthodologies de cryoconservation appropriées au matériel génétique de *Musa*. Nous espérons que ces descriptions détaillées faciliteront leur adoption et la standardisation des méthodes dans les différents laboratoires.

La disponibilité et le type de matériel de départ, les génotypes à cryoconserver et la disponibilité des ressources devront être pris en compte pour déterminer les méthodes les mieux adaptées pour leur utilisation dans d'autres laboratoires.

1. Protocoles de cryoconservation des méristèmes du bananier

1.1 INTRODUCTION

Jusqu'à il y a 20 ans, les protocoles de cryoconservation pour les tissus végétaux étaient principalement fondés sur la congélation lente en présence de mélanges cryoprotecteurs contenant du DMSO (diméthyl sulfoxyde), des sucres, du glycérol et/ou de la proline. Cette congélation lente provoquait une déshydratation laissant dans les cellules trop peu d'eau pour former des cristaux de glace létaux lorsqu'elles étaient exposées à des températures très basses.

Au cours des 20 dernières années, plusieurs nouvelles procédures de cryoconservation comme la vitrification, l'encapsulation-déshydratation, la préculture-déshydratation et l'encapsulation/vitrification ont été établies. Toutes sont fondées sur la vitrification, définie comme la transition directe d'eau de la phase liquide à une phase amorphe ou vitreuse, ce qui évite la formation de cristaux de glace. Des protocoles de cryoconservation basés sur des techniques de vitrification ont été développés pour différentes espèces à propagation végétative, y compris le bananier (Sakai et Engelmann 2007).

Les recherches entreprises à KULeuven et soutenues par Bioersity ont abouti au développement de trois protocoles de cryoconservation adaptés au stockage à long terme des cultures de méristèmes de bananier. La première méthode repose sur la congélation rapide de cultures de méristèmes en prolifération active précultivés pendant 2 semaines sur un milieu contenant 0,4 M (136,8 g/L) de saccharose. La seconde utilise également les cultures de méristèmes en prolifération active précultivés sur saccharose mais recevant un traitement complémentaire de vitrification. La troisième, et la plus communément applicable, est la vitrification de méristèmes apicaux excisés de vitroplants enracinés. Les conditions de la cryoconservation des accessions, ainsi que les pourcentages de régénération après décongélation, dépendent de la variété cultivée et de la méthode utilisée (Panis *et al.* 2007). L'application des protocoles mentionnés ci-dessus a permis à ce jour le stockage en toute sécurité dans l'azote liquide de 655 accessions (situation fin 2008) appartenant à différents groupes génomiques du genre *Musa*.

1.1.1 Détection de bactéries endophytes

Pendant la culture normale des méristèmes et le stockage en conditions de croissance limitée, la présence de bactéries endogènes est rarement observée. Si elles sont présentes, de telles bactéries n'interfèrent pas, la plupart du temps, avec la croissance des cultures de méristèmes. Toutefois, dès que les méristèmes

sont soumis à la cryoconservation, la croissance de bactéries endogènes devient un problème. A la reprise de croissance après la cryoconservation, les bactéries endogènes présentes peuvent se développer en colonies jaunes ou blanches, et envahir le méristème. C'est pourquoi, la présence de bactéries endophytes doit être toujours déterminée avant la cryoconservation, par utilisation d'un milieu de croissance bactérien (milieu BACT) contenant de 23 g/L de Difco® Bacto, 10 g/L de glucose et 5 g/L d'extrait de levure (van den Houwe et Swennen 2000). Ces boîtes sont incubées pendant 3 semaines à la lumière à 28°C. Les accessions répondant positivement sont éliminées (Hamill et al. 2005, Thomas et al. 2008, van den Houwe et Swennen 2000).

1.2 CRYOCONSERVATION DE MÉRISTÈMES APICAUX DE BANANIER

La cryoconservation des méristèmes apicaux cultivés *in vitro* par vitrification a été à l'origine rapportée par Thinh et ses collaborateurs (Thinh et al. 1999). Par cette méthode, les pourcentages de régénération étaient souvent faibles et imprévisibles. C'est pourquoi, la technique a été améliorée et adaptée à KULeuven afin de pouvoir l'appliquer sur une large gamme de cultivars (Panis et al. 2005a).

Cette méthode, illustrée dans la Figure 1, est détaillée ci-dessous.

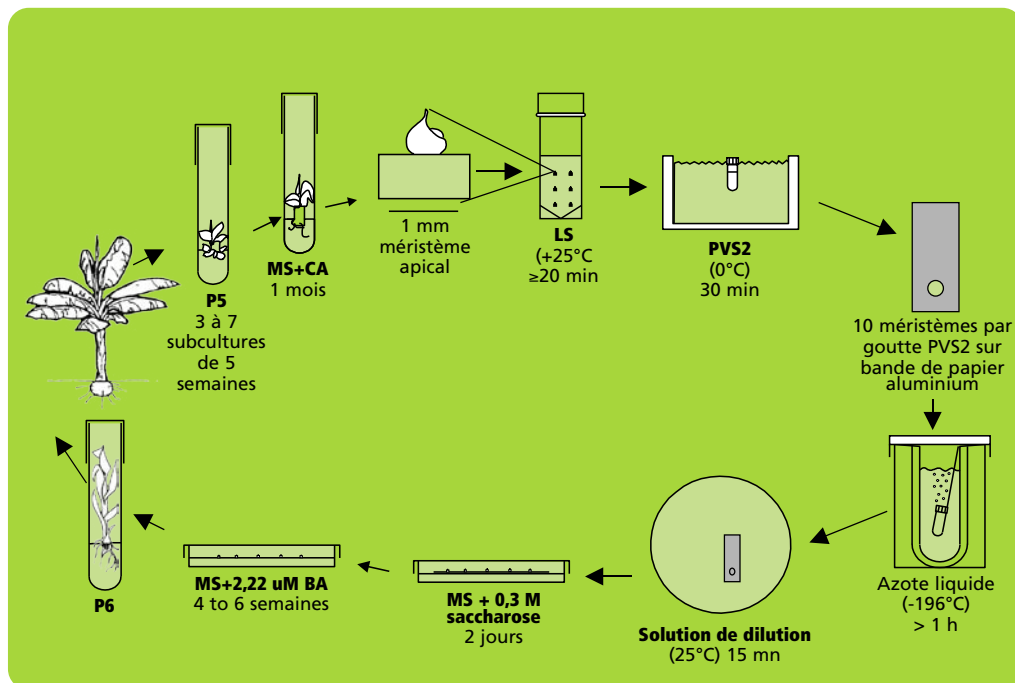


Figure 1. Cryoconservation de méristèmes individuels.

1.2.1 Matériel végétal

Préparation des vitroplants

Toutes les accessions proviennent de la collection *in vitro* de matériel génétique de *Musa* de Bioersivity (KULeuven, Belgique). Cette collection comprend des cultivars de bananier comestibles ainsi que des apparentés sauvages. Les cultures de tige se font dans des tubes 25 x 150 ml contenant 25 ml de milieu P5. Le milieu P5 est un milieu semi solide de Murashige et Skoog (MS) supplémenté avec 30 g/L de saccharose, 10 μM de BAP et 1 μM d'AIA et solidifié avec 2 g/L de gelrite (Banerjee et de Langhe 1985). Les tubes sont placés à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ sous éclairage continu à $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fourni par des tubes fluorescents 36 W Osram produisant une lumière blanche froide. Le pH est ajusté à 5,8 avant autoclavage. Des tiges de 3-5 cm de longueur sont prélevées à partir des cultures en multiplication et transférées en milieu d'enracinement en tubes. Le milieu d'enracinement a la même composition que le milieu P5 mais sans hormones de croissance et est supplémenté avec 0,5 g/L de charbon actif. Après un mois, des vitroplants vigoureux et bien enracinés sont obtenus, leur corne a un diamètre de 5 à 8 mm. Ce matériel forme une bonne source pour l'excision de méristèmes apicaux (Figure 2).

Dissection et sélection de méristèmes apicaux

Comme beaucoup d'autres monocotylédones, les méristèmes apicaux de bananier sont recouverts de plusieurs couches serrées de feuilles immatures blanchâtres et tubulaires. Les méristèmes apicaux individuels sont excisés sous microscope binoculaire. Les feuilles sont ôtées une à une jusqu'à ce que le dôme apical soit visible, mais encore partiellement recouvert par un à deux primordia foliaires (Figures 3



Figure 2. Production de vitroplants de bananier cv. 'Williams' vigoureux et enracinés.

et 4). La base foliaire (corme) mesure un millimètre de diamètre. Pour faciliter l'excision précise de ce corme, un papier millimétré est placé sous la boîte de Petri en plastique stérile transparente dans laquelle les méristèmes sont excisés. Les méristèmes disséqués sont transférés dans la solution de prétraitement (à l'obscurité et à température ambiante). Les extrémités légèrement endommagées ou à un stade peu propice (par exemple un méristème trop ou trop peu couvert par les primordia) sont éliminées. Un technicien habile et formé peut isoler un maximum de 10 méristèmes par heure (environ un méristème isolé en 6 minutes).

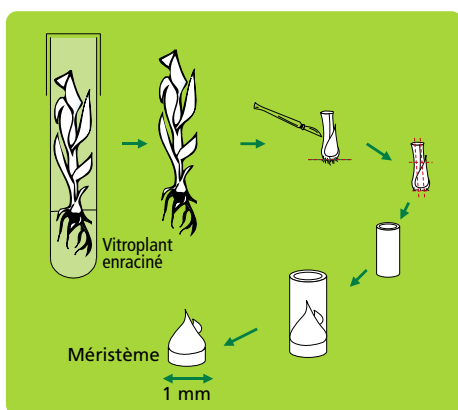


Figure 3. Schéma de l'isolement d'un méristème. Les feuilles sont ôtées une à une jusqu'à l'apparition du dôme apical encore partiellement recouvert par 1 ou 2 primordia.

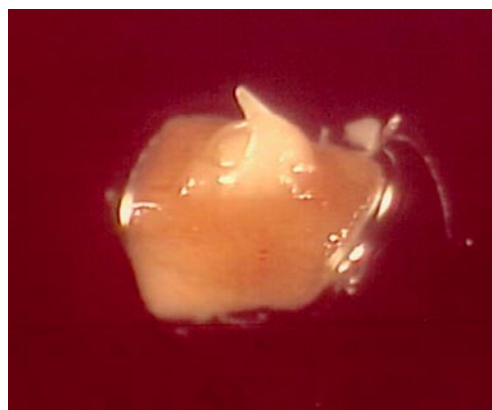


Figure 4. Méristème apical de bananier cv. 'Williams' partiellement recouvert.

1.2.2 Cryoconservation par vitrification en gouttes

Prétraitement, déshydratation et congélation rapide

La solution filtrée stérile de prétraitement contient 2 M de glycérol et 0,4 M (=136,8 g/L) de saccharose dissouts dans le milieu MME (pH 5,8). Les méristèmes excisés sont maintenus immergés dans la solution de prétraitement dans un tube en plastique de 20 ml jusqu'à ce que tous soient disséqués. Le temps d'exposition varie ainsi entre 20 min et 5 h. Des travaux antérieurs ont montré que la reprise des méristèmes de bananier n'était pas influencée par le temps d'exposition à la solution de prétraitement (Panis et al. 2005a). Bien que le mécanisme précis du prétraitement (ou *loading*) ne soit pas encore entièrement compris, il a été prouvé avec différentes espèces végétales qu'il peut très fortement augmenter la tolérance à la déshydratation par vitrification de méristèmes isolés (Matsumoto et al. 1994, Takagi et al. 1997).

Après le prétraitement, la solution est remplacée par une solution PVS2 préalablement refroidie dans de la glace. La solution PVS2 consiste en 30% (p/v) (3,26 M) de glycérol, 15% (p/v) (2,42 M) d'éthylène glycol (EG), 15% (p/v) (1,9 M) de DMSO et 0,4 M (= 136,8 g/L) de saccharose (Sakai et al. 1990). Tous ces composés sont dissous dans du milieu MS, le pH est ajusté à 5,8 et la solution est stérilisée par filtration. Les méristèmes sont immergés dans la solution PVS2 pendant 30 à 40 minutes à 0°C. Cinq minutes avant la fin du traitement, 10 méristèmes sont transférés individuellement dans une gouttelette de solution PVS2 (d'environ 15 μ l) sur une bande de papier d'aluminium (5x20 mm) à l'aide d'une pipette Pasteur en plastique de 2 ml (Figure 5). Pour maintenir la température de la bande d'aluminium aux alentours de 0°C pendant la manipulation, celle-ci est placée dans une boîte de Petri en plastique placée sur un pain de refroidissement congelé. Après le traitement PVS2, la bande d'aluminium est plongée dans l'azote liquide à l'aide de fines pinces. Pour une conservation au froid permanente, la feuille de métal gelée est rapidement transférée dans un cryotube de 2 ml rempli d'azote liquide et scellé.



Figure 5. Transfert de méristèmes dans une goutte de solution de PVS2 (d'environ 15 μ l) sur une bande de papier d'aluminium (5x20 mm) à l'aide d'une pipette Pasteur en plastique de 2 ml.

Stockage, décongélation et post-traitement

Les méristèmes sont maintenus dans l'azote liquide pendant au moins 20 min. Pour la décongélation, les bandes de papier aluminium sont rincées dans 10 ml de solution de dilution dans une petite boîte de Petri à température ambiante. Après quelques secondes, les méristèmes sont enlevés de la bande de papier aluminium et immergés pendant 15 autres minutes dans la solution de dilution. Ainsi, la solution PVS2 toxique est éliminée pendant la décongélation et remplacée par une solution de dilution moins toxique. La solution de dilution contient 1,2 M (= 410,4 g/L) de saccharose dissout dans du milieu MME (pH 5,8).

Reprise

Les méristèmes décongelés sont placés sur deux papiers filtres stériles à la surface d'un milieu MS semi solide sans hormone contenant 0,3 M (=102,6 g/L) de saccharose. Après deux jours, les méristèmes sont transférés sur milieu de régénération sans papier filtre. La première semaine de culture a toujours lieu à l'obscurité. Dans les quatre à six semaines suivant la cryoconservation, quatre types de réactions peuvent être distingués :

- (i) un blanchiment des méristèmes, conséquence d'une mort immédiate des tissus sans noircissement ;
- (ii) un noircissement complet ou partiel des méristèmes, indiquant qu'il y a eu réaction enzymatique après la cryoconservation (production et oxydation de polyphénols) ;
- (iii) une croissance inorganisée de cals, résultat de la croissance de petits secteurs isolés du dôme apical et/ou des primordia ; et
- (iv) une régénération des méristèmes résultant de la survie d'une partie substantielle du dôme apical (Figures 6a-d).

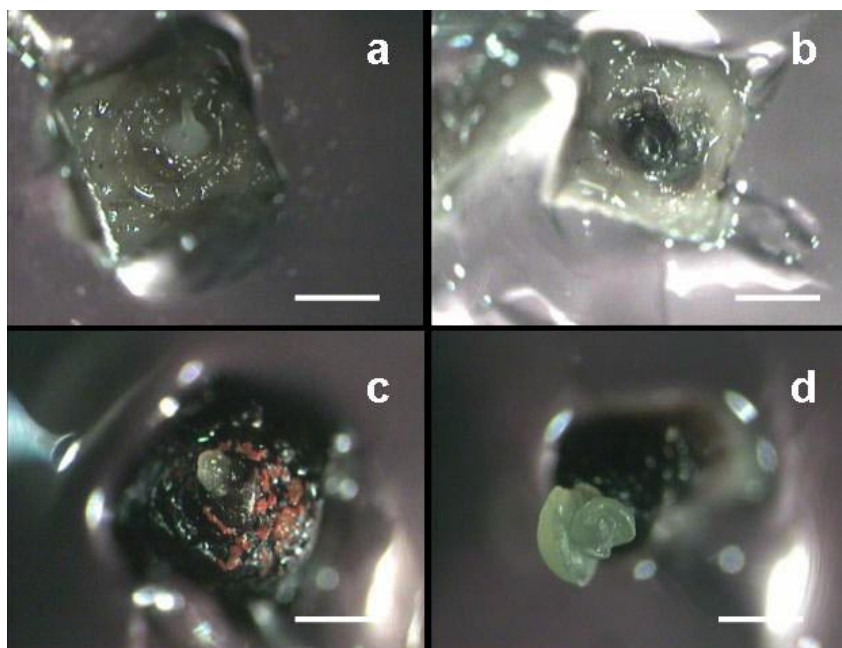


Figure 6. Réaction de méristèmes apicaux face à la cryoconservation 30 jours après leur décongélation (a) Aucune croissance; le méristème reste blanc; (b) Noircissement sans croissance ultérieure; le dôme apical réagit par la formation de composés polyphénoliques et s'oxyde; (c) Formation de cal; cal aqueux non morphogène; et (d) Régénération de pousse (échelle = 600 μ m).

Un mois après la décongélation, une pousse de 0,5 cm de long peut être observée (Figure 7). Les cals ne produisent jamais de pousse.



Figure 7. Pousse régénérée à partir de méristème apical cryoconservé de bananier cv. 'Williams' un mois après décongélation.

1.3 CRYOCONSERVATION DE MASSIFS DE MÉRISTÈMES (STRUCTURES EN CHOU-FLEUR)

Chez le bananier, des tissus méristématiques à fort potentiel de régénération d'un second type ont été cryoconservés avec succès : les massifs de méristèmes à fort potentiel de prolifération (parfois appelés structures en chou-fleur). A l'origine, ces tissus avaient été produits comme matériel de départ pour initier des suspensions cellulaires embryogènes chez le bananier (Dhed'a et al. 1991, Schoofs 1997, Strosse et al. 2006).

Deux techniques de cryoconservation appliquées aux massifs de méristèmes en chou-fleur en prolifération active sont décrites ci-dessous :

- la méthode de congélation simple (qui comprend une préculture avec du saccharose) (Panis et al. 1996, Panis et al. 2002),
- la vitrification en gouttes des massifs de méristèmes en chou-fleur (combinant une préculture et la vitrification en gouttes) (Panis et al. 2000b, Agrawal et al. 2004).

1.3.1 Matériel végétal

Production des massifs de méristèmes en chou-fleur

Des essais préliminaires ont révélé que la reprise de croissance de massifs de méristèmes après cryoconservation ne peut réussir qu'avec des massifs

de méristèmes en chou-fleur. Pour produire ce type de matériel chez toutes les accessions de bananier, les cultures de méristèmes sont transférées sur un milieu contenant une concentration élevée de BAP (milieu P4, voir Annexe 1). Tous les un à deux mois, le matériel est repiqué et de petits massifs de méristèmes en chou-fleur sont sélectionnés et transférés sur un milieu neuf (Strosse et al. 2006). La forte concentration en BAP du milieu P4 (plus de 100 μM) empêche le développement des méristèmes, favorisant ainsi la formation de nombreux dômes apicaux blancs (Figure 8). Des repiquages successifs sont nécessaires et peuvent prendre de 4 à 12 mois.

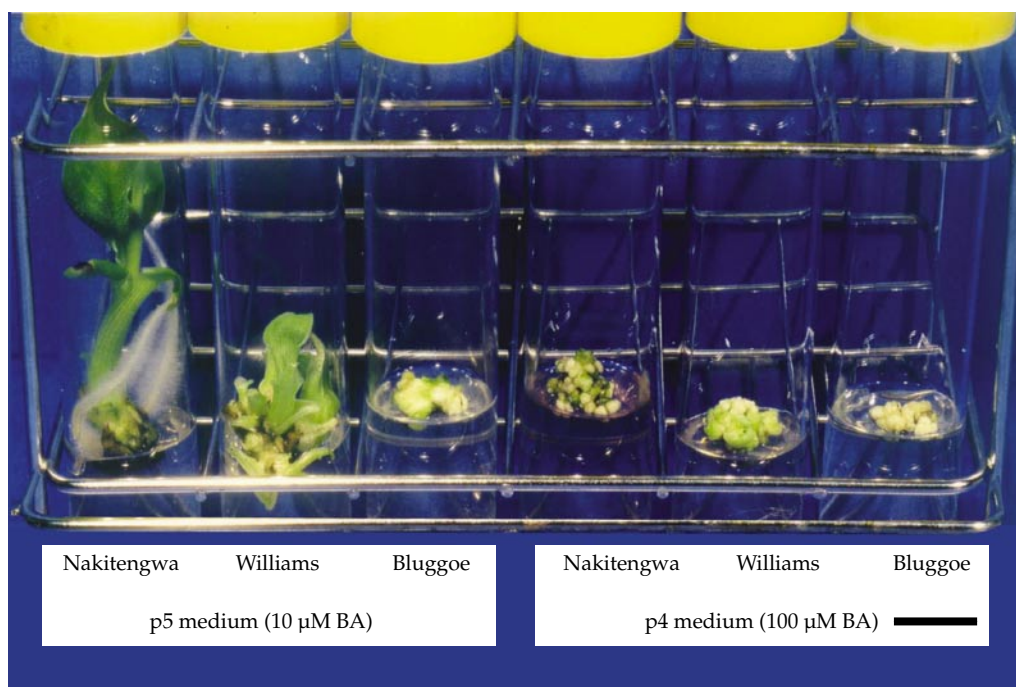


Figure 8. Cultures de méristèmes de cultivars de bananier Nakitengwa (bananier d'altitude AAA), Williams (groupe AAA) et Bluggoe (groupe ABB) sur (à gauche) milieu P5 (contenant 10 μM BAP) et (à droite) milieu P4 (contenant 100 μM BAP) (échelle = 2 cm).

Préculture des massifs de méristèmes

Après l'apparition des massifs de méristèmes en chou-fleur, et quatre semaines après le dernier repiquage, des massifs de méristèmes d'environ 4 mm de diamètre, contenant chacun au moins quatre dômes apicaux, sont excisés et placés sur milieu de préculture (P5 + 0,4 M (=136,8 g/L) de saccharose) pendant quatre semaines. Ils sont cultivés à 25 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité.

1.3.2 Méthode de congélation simple

Cette méthode est illustrée dans la Figure 9.

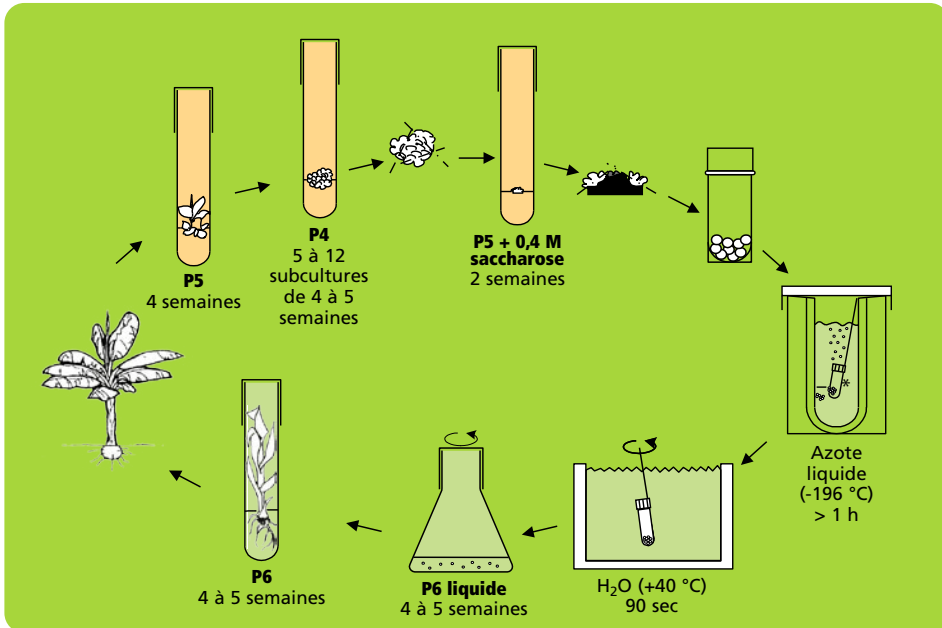


Figure 9. Protocole de congélation simple.

Cryoconservation

De petits massifs de méristèmes de 5-15 mg (2-3 mm de diamètre), contenant trois à six dômes méristématiques, sont excisés des massifs après leur préculture (Figure 10). Les tissus bruns sont éliminés et seuls les tissus les plus sains, de couleur blanc jaunâtre, sont conservés. Les massifs sont introduits à sec dans des cryotubes stériles (2 ml), et plongés directement

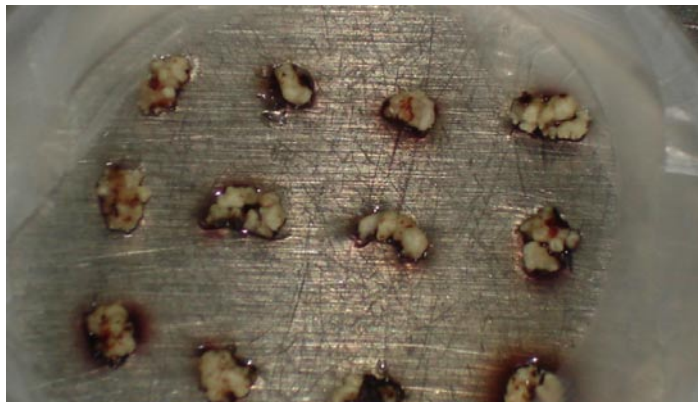


Figure 10. Massifs méristématiques prétraités de *Musa schizocarpa*.

dans un vase Dewar contenant de l'azote liquide. Chaque tube contient 7 à 10 massifs. A ce stade, les échantillons peuvent être conservés à long terme en transférant les cryotubes dans le conteneur de stockage dans l'azote liquide, en faisant en sorte que le transfert soit effectué rapidement (en quelques secondes), pour éviter le réchauffement létal des échantillons.

Décongélation et reprise

Après le stockage, une décongélation rapide est effectuée en immergeant et en agitant les cryotubes congelés dans un bain-marie ou un Becher rempli d'eau à 40°C pendant 90 secondes.

La régénération des méristèmes congelés peut être réalisée de deux manières différentes :

- les méristèmes sont transférés dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre contenant du milieu de régénération (P6) semi solide, scellées avec du parafilm,
- la régénération peut également être effectuée en milieu liquide. Après décongélation, les massifs de méristèmes sont transférés dans des Erlenmeyers de 100 ml contenant 30 ml de milieu de régénération liquide (P6 sans agent solidifiant) et placés sur un agitateur orbital à 70 rpm.

Après une semaine de culture à l'obscurité, les boîtes de Petri et les fioles sont placées sous un éclairage continu de $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Les cultures sont maintenues en permanence à $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Trois semaines après leur transfert sur milieu de régénération, la reprise de croissance des méristèmes est déterminée à la loupe binoculaire. Deux types de tissus vivants sont distingués, des pousses et des cals non régénérants. Tous les cals sont systématiquement éliminés et seules les pousses ayant repris leur croissance (Figure 11) sont transférées dans des tubes contenant du milieu de régénération afin de favoriser le développement des pousses

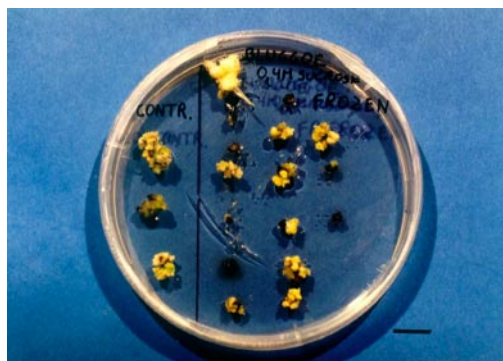


Figure 11. Boîte de Petri contenant les massifs de méristèmes témoins (à gauche) et congelés (à droite) du cv. Bluggoe (groupe ABB), huit semaines après la cryoconservation (échelle = 1 cm).

en plantes entières. Dès que les vitroplants enracinés ont atteint une taille suffisante, ils sont plantés en terre.

1.3.3 Vitrification en gouttes de massifs de méristèmes en 'chou-fleur'

Cette méthode est illustrée dans la Figure 12. Le prétraitement, la déshydratation, la congélation rapide, le stockage, la décongélation et la dilution sont quasi identiques à la vitrification en gouttes décrite dans le paragraphe 1.2. Donc, seules les étapes essentielles (et différentes) sont indiquées en détail ci-dessous.

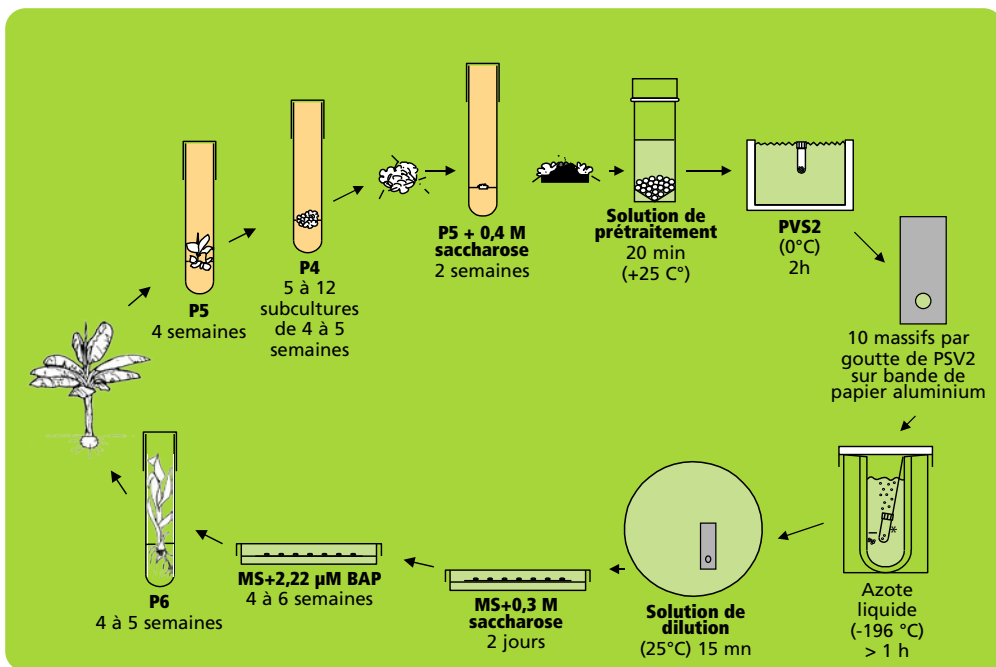


Figure 12. Protocole de vitrification en gouttes des massifs de méristèmes en chou-fleur.

Prétraitement, déshydratation et congélation rapide

Les massifs de méristèmes excisés sont maintenus immergés dans la solution de prétraitement (annexe 1) dans une fiole en plastique de 20 ml jusqu'à ce que tous soient disséqués. Le temps d'exposition varie ainsi entre 20 minutes et 3 heures.

La solution de prétraitement est remplacée par la solution PVS2 préalablement refroidie dans la glace (annexe 1). Les méristèmes sont maintenus immergés dans la solution PVS2 à 0°C pendant 2 heures. Cinq minutes avant la fin du traitement, environ 10 massifs de méristèmes sont transférés dans une goutte de solution PVS2 sur une bande de papier d'aluminium (5x20 mm) à l'aide d'une pince et d'une pipette Pasteur en plastique de 2 ml (Figure 13). Pour maintenir

la température de la bande d'aluminium aux alentours de 0°C pendant la manipulation, celle-ci est placée dans une boîte de Petri en plastique placée sur un pain de refroidissement congelé. Après le traitement PVS2, la bande d'aluminium est plongée dans l'azote liquide à l'aide de fines pinces. Pour une conservation au froid permanente, la feuille de métal gelée est rapidement transférée dans un cryotube de 2 ml rempli d'azote liquide et scellé.



Figure 13. Massifs de méristèmes dans une goutte de solution PVS2 (environ 15 μ l) sur une bande de papier d'aluminium (5x20 mm).

Stockage, décongélation et dilution

Les massifs de méristèmes sont maintenus dans l'azote liquide pendant au moins 20 min. Pour la décongélation, les bandes de papier aluminium sont plongées dans 10 ml de solution de dilution (annexe 1) dans une petite boîte de Petri à température ambiante. Après quelques secondes, les massifs de méristèmes se détachent du papier d'aluminium et sont immergés pendant 15 minutes supplémentaires dans la solution de dilution. Ainsi, la solution toxique PVS2 est éliminée pendant la décongélation et remplacée par la solution de dilution moins toxique.

Régénération

Les méristèmes décongelés sont sortis de la solution de dilution et placés sur deux épaisseurs de papier filtre stérile dans une boîte de Petri en plastique de 90 mm de diamètre contenant environ 25 ml de milieu MS semi solide sans hormones de croissance et contenant 0,3 M (= 102,6 g/L) de saccharose.

Au bout de deux jours, les filtres sont enlevés et les amas de méristèmes sont transférés dans des boîtes de Petri sur un milieu MS contenant 2,22 μ M de BAP. La première semaine de culture est toujours réalisée à l'obscurité.

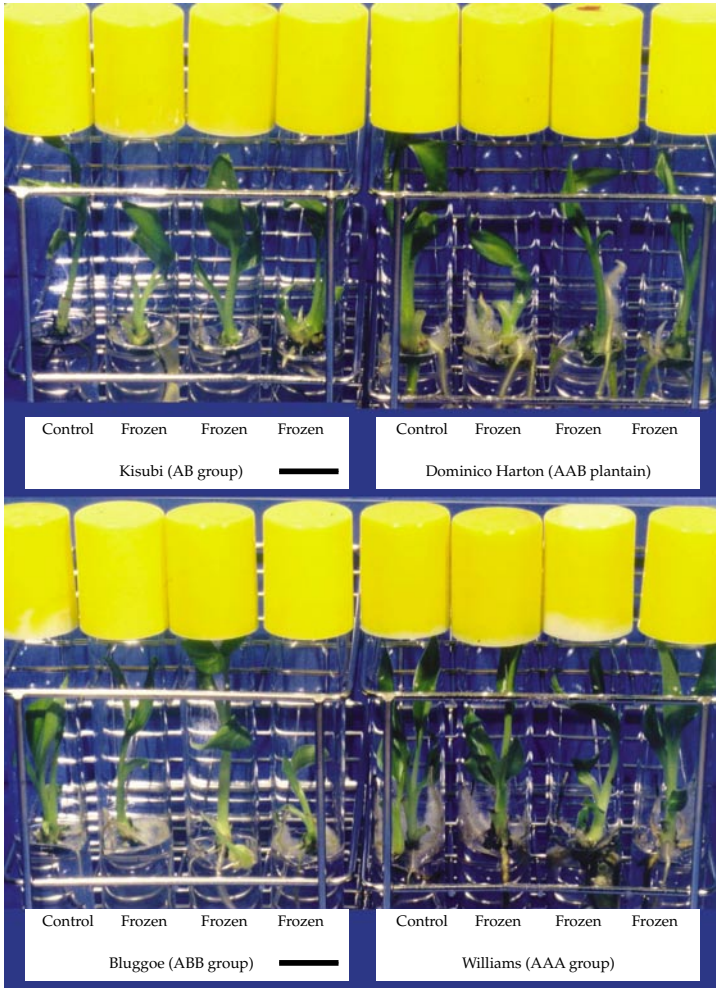


Figure 14. Régénération de vitroplants à partir d'un méristème témoin et de trois méristèmes décongelés en prolifération active des cultivars 'Kisubi' (groupe AB), 'Dominico Harton' (plantain AAB), 'Bluggoe' (groupe ABB) et 'Williams' (groupe AAA) trois mois après la cryoconservation.

Après un maximum de six semaines, les massifs de méristèmes sont transférés dans des tubes contenant du milieu P6 pour leur développement en plante entière (Figure 14).

2. Cryoconservation de suspensions embryogènes de bananier

2.1 INTRODUCTION

La plupart des variétés de bananier étant fortement stériles, les programmes classiques d'amélioration progressent très lentement et demandent une main d'œuvre importante. De plus, il n'existe pas de sources de résistance dans le pool génique des bananiers à certains pathogènes, tels que les virus du bananier. Le génie génétique offre donc une alternative bienvenue pour l'amélioration génétique du bananier. Souvent chez les monocotylédones, les suspensions cellulaires embryogènes représentent un matériel de choix pour la transformation, particulièrement chez les plantes stériles telles que le bananier, chez lequel des embryons zygotiques ne sont pas disponibles. Les suspensions cellulaires embryogènes sont à l'heure actuelle la seule source de protoplastes régénérants chez le bananier (Panis et al. 1993). Lorsqu'ils sont soumis à l'électroporation, les protoplastes dérivés des suspensions cellulaires embryogènes donnent souvent une fréquence élevée d'expression transitoire de gènes marqueurs introduits (Sagi et al. 1994). Des suspensions embryogènes de cellules ayant leur paroi peuvent être transformées avec succès par bombardement de particules (Sagi et al. 1995) et par *Agrobacterium* (Hernandez et al. 1998, Remy et al. 2005). De cette manière, des gènes codant pour des nouveaux types de protéines anti-fongiques ainsi que pour la résistance à des virus ont été introduits chez le bananier.

La principale difficulté de la transformation reste l'initiation de suspensions cellulaires de bonne qualité, c'est-à-dire des suspensions cellulaires embryogènes homogènes à haute fréquence de régénération. L'initiation de ces suspensions cellulaires est difficile et requiert beaucoup de temps, quel que soit le matériel de départ utilisé (fleurs mâles immatures, embryons zygotiques immatures ou méristèmes en prolifération active *in vitro*). Une fois établies, ces précieuses suspensions cellulaires sont sujettes à la variation somaclonale et aux contaminations microbiennes. De plus, une durée de culture prolongée peut résulter en une diminution, voire la perte totale, des capacités morphogénétiques des suspensions (Strosse et al. 2006, Strosse et al. 2003).

En 1990, une technique de cryoconservation pour des suspensions cellulaires "idéales" a été mise au point, comprenant un traitement cryoprotecteur avec 7,5% (v/v) de DMSO (diméthyl sulfoxyde) pendant 1 heure à 0°C, suivi d'un refroidissement lent (1°C/min jusqu'à atteindre -40°C) puis de l'immersion dans l'azote liquide. Une suspension cellulaire "idéale" contient une proportion élevée de cellules isodiamétriques, caractérisées par un noyau relativement grand, de multiples petites vacuoles et de petits granules protéiques et amylicés (Figure 15). Récemment, ce protocole de cryoconservation a été optimisé pour

permettre son application à des suspensions moins “idéales” mais également à fort pouvoir de régénération (Panis et al. 2000a). De telles suspensions sont plus hétérogènes et contiennent, en plus des massifs embryogènes, des cellules très vacuolisées et allongées, ou des cellules à cytoplasme très dense mais granuleux ou des cellules avec de gros grains d’amidon et des globules organisés.

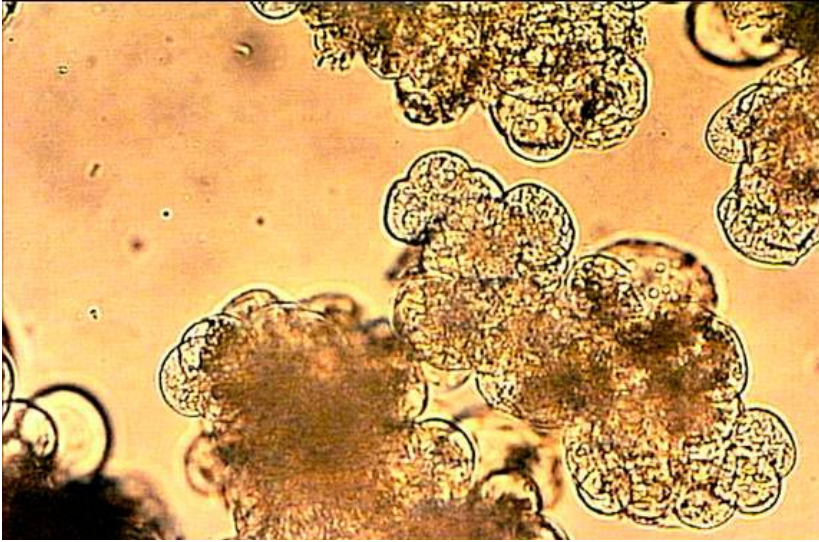


Figure 15. Suspensions cellulaires embryogènes du cultivar Bluggoe (groupe ABB).

Récemment, des suspensions cellulaires de bananier ont été régénérées après 15 ans de stockage dans l’azote liquide (résultats non publiés). Leur potentiel à produire des embryons somatiques était resté intact. De plus, des suspensions cellulaires embryogènes ont pu être ré-initiées à partir du matériel congelé. Ces suspensions ont montré qu’elles avaient gardé un pouvoir de transformation comparable à celui des témoins non congelés (Panis et al. 2005b).

2.2 MATÉRIEL VÉGÉTAL

2.2.1 Matériel de départ

Les études publiées sur la cryoconservation des suspensions cellulaires de bananier ont montré que les procédures de congélation devaient différer en fonction des tissus utilisés comme matériel de départ pour initier les suspensions. Dans ce document, deux types de tissus différents ont été considérés : i) des suspensions dérivées de fleurs mâles (Côte et al. 1996) et ii) des suspensions dérivées de cultures de méristèmes en prolifération active (Schoofs 1997, Strosse et al. 2006, Strosse et al. 2003).

Suspensions cellulaires dérivées de cultures de méristèmes en prolifération

Les suspensions cellulaires sont maintenues en milieu liquide ZZ (annexe 1) sur un agitateur orbital à 70 rpm, à 25±2°C.

Suspensions cellulaires dérivées de fleurs mâles

Les suspensions cellulaires sont maintenues en milieu liquide MA2 (annexe 1).

2.3 CRYOCONSERVATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES

2.3.1 Préculture

Cette étape est recommandée seulement pour les suspensions cellulaires dérivées de fleurs mâles. Les cellules sont cultivées 24 heures dans du milieu MA2 liquide additionné de 180 g/L de saccharose.

2.3.2 Cryoprotection

Les suspensions cellulaires sont toujours cryoconservées quand elles sont dans leur phase de croissance exponentielle. La phase exponentielle de croissance démarre environ 7 à 10 jours après le dernier repiquage.

On laisse les cellules sédimenter dans un tube à centrifuger gradué et l'ancien milieu est éliminé.

Du milieu liquide neuf ZZ¹ contenant 180 g/L de saccharose est ajouté jusqu'à obtention d'un volume final de cellules de 30% (v/v).

Un volume égal de milieu liquide ZZ +180 g/L de saccharose contenant 15% (v/v) de diméthyl sulfoxyde (DMSO) est progressivement ajouté à la suspension cellulaire sur une durée d'une heure à température ambiante.

La solution cryoprotectrice finale, dans les suspensions dérivées de fleur mâle et de cultures méristématiques, contient donc 7,5% (v/v) de DMSO et 180 g/L de saccharose.

2.3.3 Congélation et stockage

Pour la congélation lente, certains laboratoires utiliseraient des congélateurs programmables électroniques pour lesquels le liquide de refroidissement est l'azote liquide. L'auteur n'étant pas informé des laboratoires qui ont appliqué cet équipement aux cellules de bananier, seule l'utilisation du bain de méthanol et du Nalgene™ cryo 1°C Freezing Container est présentée ci-après.

¹ Le milieu ZZ est remplacé par le milieu MA2 dans le cas de cellules issues de fleurs mâles.

Congélation lente dans un bain de méthanol

Des échantillons de 1,5 ml de suspension cellulaire dans le milieu cryoprotecteur sont transférés dans des cryotubes de 2 ml, puis placés dans un bain de méthanol agité (Cryocool CC-60, Exatrol et agitateur Neslab, Portsmouth, New Hampshire, USA). Ce bain de méthanol refroidit à 1°C/min à partir de la température ambiante jusqu'à -40°C.

Dès que la température de -7,5°C est atteinte, les cryotubes sont immergés pendant 3 secondes dans l'azote liquide pour initier la cristallisation du milieu cryoprotecteur. Ils sont ensuite refroidis jusqu'à -40°C. Après 30 minutes à -40°C, les cryotubes sont plongés dans l'azote liquide (-196°C) pour un stockage ultérieur.

Congélation lente avec le Nalgene™ cryo 1°C Freezing Container

Les cryotubes contenant 2 ml de suspension cellulaire sont placés dans un Nalgene™ cryo 1°C Freezing Container. Cet appareil de congélation simple consiste en une boîte en plastique contenant 250 ml d'iso-propanol (Figure 16). Lorsque cette boîte est placée dans un congélateur (-80°C), elle permet d'obtenir un refroidissement d'environ 1°C/min.

Dans les deux cas, la descente en température dans les cryotubes dans le Freezing Container est suivie grâce à une sonde de température placée dans un cryotube témoin contenant 1,5 ml de milieu cryoprotecteur.



Figure 16. Congélation lente par Nalgene™ cryo 1°C Freezing Container avec sonde de température.

2.3.4 Décongélation et reprise

Après stockage, les cryotubes sont décongelés rapidement dans un Bêcher rempli d'eau à 40°C pendant environ 1,5 à 2 minutes, jusqu'à fonte complète de la glace.

Suspensions dérivées de cultures de méristèmes en prolifération active

Les cellules décongelées sont étalées sur du milieu semi solide ZZ ou RD1 (annexe 1) dans des boîtes de Petri de 90 mm. Le milieu RD1 est employé quand on veut régénérer des plantules à partir du matériel cryoconservé. Le milieu ZZ est employé quand on veut rétablir une suspension cellulaire embryogène. Pendant la première semaine suivant la décongélation, les boîtes de Petri sont toujours placées à l'obscurité (Figures 17 A, B, C).

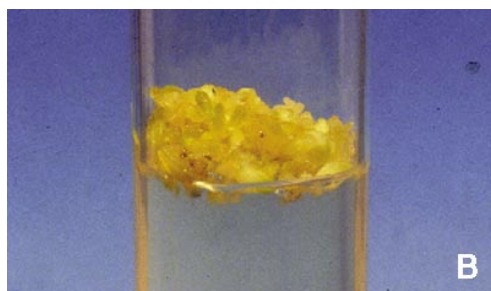


Figure 17. (A) Reprise de croissance après quatre semaines sur milieu semi solide de suspensions cellulaires embryogènes non congelées (à gauche) et congelées (à droite) de 'Bluggoe' (groupe ABB); (B) Amas d'embryons somatiques provenant d'une culture de cellules congelées; (C) Plants en serre issus de suspension cellulaire congelée.

Suspensions cellulaires dérivées de fleurs mâles

Les cellules décongelées sont étalées sur du milieu semi solide MA2 dans des boîtes de Petri de 90 mm. Au bout de 24 heures, elles sont transférées sur milieu MA3 pour le développement ultérieur d'embryons somatiques régénérés à partir de suspension cellulaire, ou sur milieu MA2 quand une suspension cellulaire embryogène doit être ré-initiée.

2.3.5 Test de viabilité des suspensions cellulaires

La viabilité des cellules est déterminée par le test à la fluorescéine de diacétate (FDA, Widholm 1972) avec lequel les cellules vivantes deviennent fortement fluorescentes sous illumination par des rayons ultraviolets (Figure 18).

Si aucun microscope à fluorescence n'est disponible, le test de réduction du chlorure de 2, 3, 4-triphényl tétrazolium (TTC, Dixon 1985) peut être appliqué. Les cellules survivantes convertissent le TTC incolore en cristaux rouges de formazan, qui peuvent être observés avec un microscope classique.

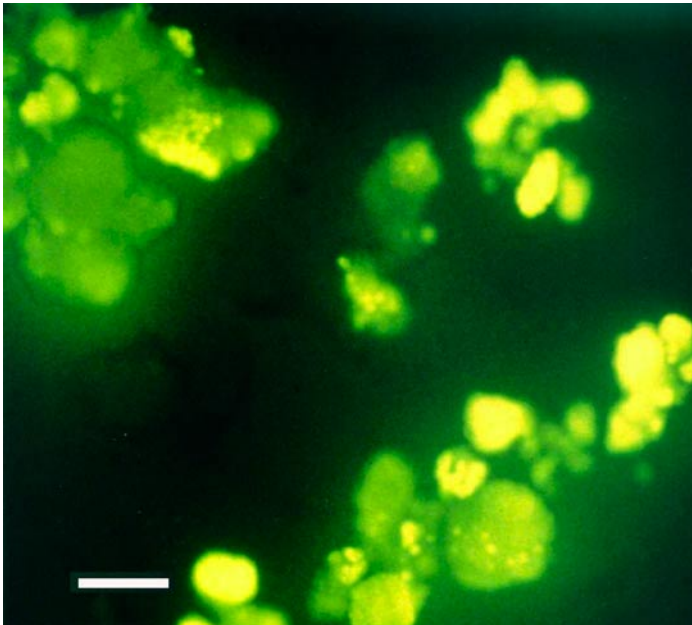


Figure 18. Suspension cellulaire embryogène du cv. 'Bluggoe' (groupe ABB), cryoprotégée avec 5% (v/v) de DMSO, congelée dans l'azote liquide, colorée au FDA et observée sous lumière ultraviolette. Les petites cellules embryogènes survivantes deviennent très fluorescentes alors que les structures plus larges montrent une fluorescence plus diffuse (échelle = 100 µm).

3. Cryoconservation d'embryons zygotiques

3.1 MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette méthode de cryoconservation nécessite des embryons zygotiques bien développés, excisés de graines matures de *Musa*. Le fruit est brossé et lavé avec de l'eau et du savon liquide. Il est ensuite stérilisé avec de l'eau de javel à 20% (v/v) pendant cinq minutes et rincé trois fois avec de l'eau stérile.

La banane est pelée en conditions stériles sous hotte à flux laminaire. Les graines sont extraites et les embryons zygotiques sont isolés sous loupe binoculaire. Comme l'embryon est localisé juste sous l'opercule, il est important de faire des incisions longitudinales avec un scalpel tout autour du bouchon micropylaire (Figure 19) :

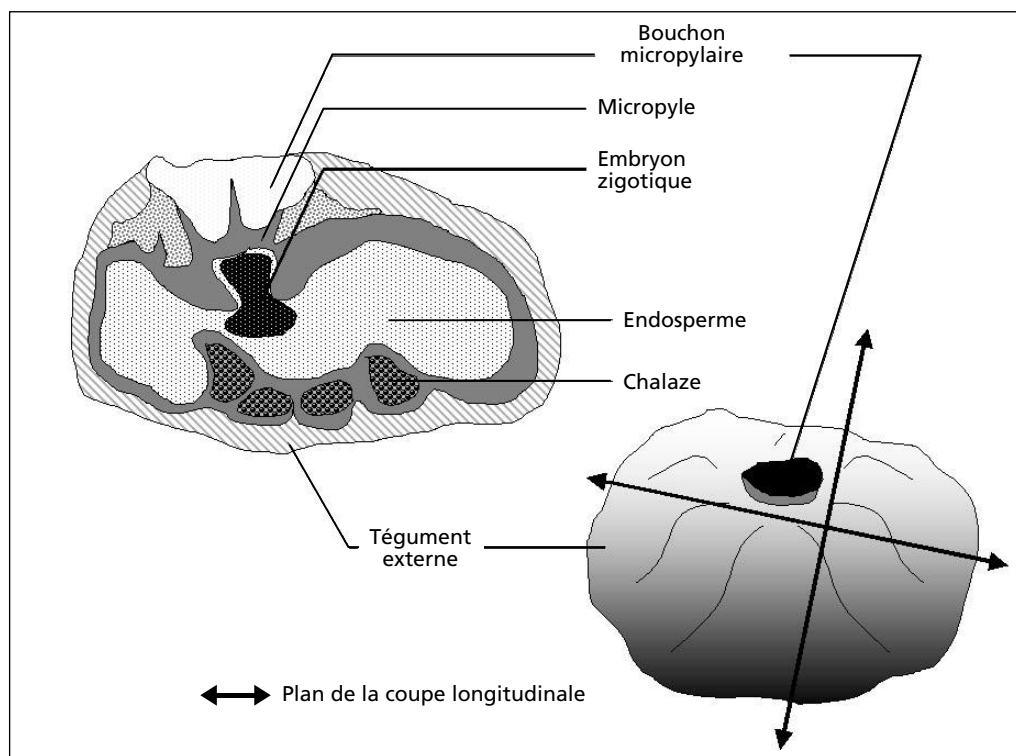


Figure 19. Représentation graphique d'une coupe longitudinale de graine de bananier.

3.1.1 Préculture

Les embryons sont placés pendant 5 heures sur le milieu décrit par Escalant et Teisson (1987) avec les macro-éléments du milieu Murashige et Skoog dilués de moitié, les vitamines de Morel, 60 g/L de saccharose et 2 mg/L de gelrite. Le pH est ajusté à 5,8 avant autoclavage.

3.1.2 Déshydratation

Les embryons sont déshydratés dans le courant d'air de la hotte à flux laminaire. Cependant, en fonction à la fois des conditions de laboratoire et de l'espèce de bananier, la durée de dessiccation peut devoir être ajustée (Tableau 1). Il est donc recommandé d'estimer la durée nécessaire pour obtenir une teneur en eau d'environ 14% (en% du poids frais) des embryons, qui est la valeur permettant d'obtenir une survie maximale après cryoconservation (Abdelnour-Esquivel et al. 1992). Chez *M. acuminata* et *M. balbisiana*, cette teneur en eau est respectivement atteinte au bout de une heure et demie et deux heures.

3.1.3 Congélation

La congélation des embryons est réalisée dans des cryotubes de 2 ml par immersion directe dans l'azote liquide.

Tableau 1. Evolution de la teneur en eau d'embryons excisés de *Musa acuminata* et *M. balbisiana* en fonction de la durée de déshydratation.

Durée (h)	Teneur en eau (% de poids frais)*	
	<i>M. acuminata</i>	<i>M. balbisiana</i>
0	64	79
0.5	26	37
1.0	20	28
1.5	15	19
2.0	11	14
2.5	8	11
3.0	6	9

(*) Moyenne de 3 essais sur 3 échantillons de 12 embryons chacun.

3.1.4 Décongélation et reprise

Les embryons sont décongelés rapidement en immergeant les échantillons dans un bain-marie à 40 °C pendant environ 2 minutes. Pour la régénération, les embryons sont placés sur le milieu décrit ci-dessus (Escalant et Teisson 1987) additionné de 0,5 mg/L de BAP. Les cultures sont maintenues à l'obscurité pendant quatre semaines environ. Les embryons germés sont ensuite transférés sur le milieu de développement et d'enracinement (milieu MS sans hormones).

Eu égard à son efficacité et sa simplicité, la technique de cryoconservation établie pour des embryons de *M. acuminata* et *M. balbisiana* pourrait être utilement appliquée dans l'avenir pour le stockage de matériel génétique à long terme des diploïdes fertiles de *Musa*.

4. Discussion et perspectives

4.1 CRYOCONSERVATION DE MÉRISTÈMES DE BANANIER

4.1.1 Vitrification en gouttes des méristèmes apicaux de bananier

Différents génotypes de *Musa* ont été cryoconservés en utilisant ce protocole (Thinh et al. 1999, Panis et al. 2005a). Les pourcentages de régénération après décongélation varient de 20 à 85% (avec une moyenne de 53%). Ces pourcentages de régénération sont relativement indépendants du génotype. Cependant, il a été observé que les génotypes dotés de davantage de génome B survivent significativement mieux que ceux dotés seulement du génome A (Panis et al. 2005a). L'observation microscopique de la reprise des méristèmes cryoconservés (Helliot et al. 2003) a révélé que :

- (i) le dôme entier du méristème isolé survit à l'exposition à l'azote liquide ; et
- (ii) aucun cal régénérable n'est formé après la cryoconservation. Il semble donc peu probable que des variations somaclonales puissent se produire.

Les principales limitations de cette procédure sont les suivantes :

- Les taux de viabilité/régénération après cryoconservation varient avec l'opérateur. Une expérience considérable dans la dissection des méristèmes apicaux de bananier, fragiles et de petite taille, est nécessaire avant de pouvoir utiliser ce protocole de cryoconservation (par cette méthode, seulement 60 méristèmes peuvent être excisés et cryoconservés en un jour).
 - De nombreux méristèmes survivent mais se nécrosent et sont incapables de régénérer des tiges. Les conditions de régénération pourraient donc être encore optimisées.
 - La faible reprise peut être imputable à des méristèmes de médiocre qualité (les extrémités sont légèrement endommagées ou ne sont pas à un stade adéquat ou sont trop ou trop peu couvertes par les primordia foliaires). La qualité des plants donneurs (plus de lumière, moins de plantules dans les conteneurs) pourrait donc être améliorée.
 - En utilisant la méthode de vitrification en gouttes, certains chercheurs ont rencontré un problème lié au contact direct de l'azote liquide avec le matériel végétal. Cependant, des problèmes éventuels comme la contamination et la perte de matériel n'ont jamais été rencontrés dans le laboratoire de l'auteur.
-

Ce protocole de vitrification en gouttes a été récemment appliqué avec succès à un grand choix d'espèces végétales telles la pomme de terre, l'ulluque, la patate douce, la chicorée, la fraise, le taro, le pélagonium, le palmier dattier, le thym, l'olivier et le houblon. Il pourrait ainsi être considéré comme le premier protocole d'application générale (Gallard et al. 2008, Sanchez-Romero et Panis 2008, Sant et al. 2008, Marco et al. 2007, Panta et al. 2006).

4.1.2 Cryoconservation de massifs de méristèmes

Pour la cryoconservation de ce type de matériel, la partie nécessitant le plus de main d'œuvre est la production de cultures hautement proliférantes. La qualité des massifs méristématiques en chou-fleur peut être trop médiocre pour leur emploi dans des expériences de cryoconservation (trop faible obtention de tissus méristématiques par rapport aux tissus de corne et/ou trop de nécrose des explants). Ceci peut être dû au fait que le cultivar appartient à un groupe génomique difficile (comme celui des bananiers d'altitude d'Afrique de l'Est et de nombreux bananiers plantain). Auparavant, la prolifération ne pouvait être obtenue qu'en utilisant de la BAP à une concentration extrêmement élevée (100 μM), proche de la toxicité. Une culture prolongée sur un tel milieu (100 μM de BAP) entraîne souvent une diminution de la qualité des cultures (perte de leur structure caractéristique en chou-fleur). Récemment, d'autres cytokinines comme le thidiazuron (TDZ) à faible concentration (1 μM) se sont révélées capable d'augmenter les taux de prolifération (Strosse et al. sous presse).

4.1.3 Méthode de congélation simple

Le protocole de congélation simple a été appliqué à 36 cultivars de bananier appartenant à 8 groupes génomiques (Panis et al. 2002). Les résultats se sont révélés extrêmement dépendants du génotype. Les meilleurs résultats (jusqu'à 70% de reprise) ont été obtenus avec des cultivars ABB tels que Bluggoe, Cachaco et Monthan. Des résultats intermédiaires (autour de 25% de reprise) ont été atteints avec les bananiers dessert AAA et des bananiers AAB. Les bananiers plantain AAB et les diploïdes répondent généralement mal. Pour tous les cultivars étudiés appartenant à ces groupes génomiques, les plantes ont été régénérées et cultivées en serre. Cependant, aucun des bananiers d'altitude AAA n'a survécu à la congélation simple.

Dans cette méthode de congélation simple, une nécrose, due à l'oxydation des polyphénols est souvent observée quand les méristèmes décongelés sont placés sur milieu semi solide. Ce processus peut induire des effets cytotoxiques et aussi aboutir à des amas régénérants entourés d'une couche imperméable, interdisant toute assimilation des nutriments nécessaires à

la reprise de la croissance. Ce problème peut être surmonté en utilisant des milieux de régénération liquides pour diluer les polyphénols libérés, ce qui permet d'obtenir des pourcentages de régénération de 20% plus élevés.

4.1.4 Vitrification en gouttes des massifs de méristèmes en chou-fleur

Il a été montré que les taux de reprise de croissance des méristèmes ayant subi une préculture avec du saccharose étaient supérieurs à ceux cultivés sur le milieu P4 normal. Une préculture avec du saccharose semble augmenter la tolérance des méristèmes non seulement à la solution PVS2 mais également aux dégâts susceptibles de survenir lors de la congélation. Si l'on compare les résultats obtenus par la méthode de vitrification en gouttes à ceux obtenus par la méthode de congélation simple, on observe, pour presque tous les cultivars, une augmentation des taux de survie. L'augmentation du taux de régénération des bananiers ABB reste limitée. La reprise après congélation est comprise entre 50 et 70%. Les taux de régénération atteignent 30-50% pour les bananiers desserts AAA et les bananiers AAB et 20-30% pour les bananiers plantain. Les bananiers d'altitude AAA, qui s'étaient avérés récalcitrants à la cryoconservation par la congélation simple, atteignent des taux de survie de 0-20% avec la méthode de vitrification en gouttes.

Pour la plupart des espèces végétales, la déshydratation optimale des tissus méristématiques avec la solution PVS2 est obtenue au bout de 10 à 30 minutes à température ambiante (Takagi 2000). Parmi les exceptions, on trouve les apex de patate douce et d'ananas qui doivent être traités avec PVS2 pendant 100 minutes et 7 heures, respectivement (Plessis et Steponkus 1996, Gonzalez-Arno et al. 1998). La durée de ce traitement doit être optimisée au cas par cas puisque la déshydratation doit être suffisante pour éviter la formation de cristaux de glace létaux pendant la congélation. En même temps, il faut éviter que le traitement avec cette solution potentiellement toxique ne provoque des dégâts irréversibles dans les tissus. Pour des cultivars de bananier, on a observé pour des méristèmes en prolifération active, et pré-cultivés sur du saccharose, que les taux de régénération optimaux sont généralement obtenus après un traitement avec PVS2 de 2 à 2,5 heures. Avec la plupart des cultivars, les taux de survie après trois heures de traitement sont considérablement plus faibles, probablement à cause de la toxicité de cette solution fortement concentrée.

4.1.5 Optimisation des protocoles

Pour perfectionner les protocoles de cryoconservation, une meilleure connaissance du contexte physicochimique de la cryoconservation est nécessaire. Cela ne pourra se faire qu'au travers d'études fondamentales qui impliquent tant l'analyse thermique qu'un examen minutieux des

divers paramètres qui peuvent influencer le cryo-comportement, comme les sucres endogènes, la composition de la membrane, le stress oxydatif et les protéines protectrices. Ces paramètres sont examinés pour diverses espèces végétales dont le bananier dans le cadre du Projet de recherches européen (CRYMCEPT, voir <http://www.agr.kuleuven.ac.be/dtp/tro/CRYMCEPT/>) et de l'Action COST de l'Union européenne (<http://www.agr.kuleuven.ac.be/dtp/tro/cost871/Home.htm>).

Nous avons montré qu'une phase de préculture sur un milieu contenant une concentration de saccharose élevée est essentielle pour rendre les cultures de méristèmes de bananier tolérantes à la congélation simple. Les modes d'action possibles de la préculture au saccharose pour augmenter la résistance à la congélation sont nombreux. Du fait de son effet osmotique et de l'absorption du saccharose par les tissus, la préculture au saccharose entraîne une réduction lente de la teneur en eau des explants (Uragami 1991, Engelmann et Duval 1986, Zhu et al. 2006), abaissant ainsi la température de cristallisation et la quantité d'eau cristallisable. Les sucres peuvent également maintenir l'état cristallin liquide des bicouches membranaires et stabiliser les protéines à l'état congelé (Kendall et al. 1993). Un effet indirect du saccharose, qui exerce un léger stress osmotique sur les tissus, pourrait être l'accumulation de composés protecteurs des stress hydriques tels que la proline (Delvallée et al. 1989). Chez le bananier, nous avons déterminé que la préculture sur saccharose induisait des modifications des protéines (Carpentier et al. 2005, 2007), des composants membranaires, des sucres et des polyamines (Zhu et al. 2006) et ce pour des cultivars dotés de capacité de réaction différentes à la cryoconservation. Ces analyses révèlent l'extrême complexité du processus de cryoprotection induit par la préculture sur saccharose : outre des modifications des stérols, des acides gras, des polyamines et la production de protéines protectrices spécifiques, il pourrait y avoir d'autres paramètres ou facteurs limitants impliqués tels la capacité à éliminer les radicaux libres. Nous sommes convaincus que lorsque le mode d'action exact de la préculture au saccharose pour ce qui concerne la cryoprotection pourra être déterminé, les différents protocoles de cryoconservation seront grandement optimisés.

Le manque de reproductibilité est un facteur qui limite souvent l'application en routine de la cryoconservation (Benson et al. 1996, Reed et al. 2001, 2004). Cependant, des chercheurs de l'INIFAT (*Instituto Nacional de Investigación Fundamental en Agricultura Tropical*, Cuba) et du FONAIAP (*Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias*, Venezuela) ont appliqué avec succès la méthode de congélation simple (Surga et al. 1999). A l'INIFAT, un taux de survie de 34% a été obtenu après cryoconservation pour le cultivar local Burro Criollo (IPGRI 1996). Le protocole de vitrification en gouttes a aussi

été appliqué avec succès chez le bananier au NBPGR (*National Bureau for Plant Genetic Resources*), New Delhi, en Inde (Agrawal et al. 2004).

4.1.6 Cryoconservation de la collection de bananier

Actuellement, la vitrification en gouttes des méristèmes apicaux et celle de groupes de méristèmes de type 'chou-fleur' sont appliquées à la collection de *Musa*. La méthode de congélation simple n'est plus appliquée dans ce but à cause de la faiblesse des pourcentages de régénération après décongélation pour la plupart des groupes génomiques. Le tableau 2 compare les besoins en quantité de travail pour les deux méthodes qui sont appliquées aujourd'hui.

Tableau 2. Comparaison des besoins en quantité de travail des deux protocoles de cryoconservation.

Méthode de congélation	Temps de travail (heures) ¹	cvs/personne (personne/année) ²	Durée nécessaire (mois) ³	Cultivars
Vitrification de massifs en prolifération	30 à 40	59 à 44	12 à 13	ABB AAB certains bananiers plantain AAB, ...
Vitrification de méristèmes individuels	60 à 70	29 à 25	8 à 9	Bananiers AAAh <i>Musa acuminata</i> certains bananiers plantain AAB, ...

¹ Durée estimée pour préparer les milieux de culture et les cultures de méristèmes, suivie de la cryoconservation. Pour chaque cultivar, 3 répétitions ont été effectuées avec au moins 6 cryotubes contenant 10 (vitrification de méristèmes individuels) à 20 (vitrification de massifs en prolifération) explants. Pour chaque répétition, au moins 3 essais représentatifs (tubes) ont été décongelés et criblés pour la reprise.

² 1 an = 220 jours de travail (8 h/jour).

³ Débutant par 2 tubes jusqu'à ce que l'accession soit stockée en sûreté dans l'azote liquide (3 répétitions).

La méthode la plus exigeante en main-d'œuvre (vitrification de méristèmes apicaux excisés à partir de vitroplants enracinés) sera seulement appliquée aux cultivars réticents à la cryoconservation par l'autre méthode (comme les bananiers d'altitude AAA). Pour des accessions de bananier appartenant au groupe ABB et AAB (hors bananiers plantain), la vitrification en gouttes de massifs en prolifération est toujours appliquée, tandis que la méthode préférée reste la vitrification en gouttes de méristèmes apicaux pour *Musa acuminata* et les bananiers d'altitude d'Afrique de l'Est. Pour toutes les autres accessions, la méthode choisie est basée sur (i) le degré de prolifération des massifs de méristèmes après trois cycles de repiquage sur un milieu contenant des concentrations élevées de cytokinine et (ii) la survie des massifs de méristèmes en prolifération après un premier essai de cryoconservation.

Pour décider si une expérience de cryoconservation est réussie ou non, nous utilisons le mode de calcul développé par Dussert et ses collaborateurs

(2003). Ces calculs ont été appliqués à toutes nos données. On considère une expérience comme réussie si la probabilité de régénérer une plante à partir du matériel stocké est supérieure à 95%. Cette probabilité dépend :

- (i) du nombre d'explants stockés dans l'azote liquide (allant de 30 à 50),
- (ii) du nombre d'explants décongelés (allant de 16 à 50), et
- (iii) du pourcentage de régénération après décongélation.

Une expérience donnant un taux de probabilité inférieur ne sera pas considérée comme réussie, quel que soit son pourcentage de régénération. Dans de tels cas, une nouvelle répétition sera effectuée.

Nous considérons une accession de bananier comme conservée «en sûreté» si trois expériences indépendantes (et réussies) ont été obtenues. Selon ces critères, nous stockons actuellement 655 accessions appartenant à 30 groupes génomiques de bananier différents dans l'azote liquide (situation fin 2008).

4.2 SUSPENSIONS CELLULAIRES

4.2.1 Prétraitement

Une phase de préculture est souvent incluse dans les protocoles de cryoconservation pour augmenter la tolérance des tissus à la congélation. Des composés osmotiquement actifs tels que le sorbitol ou le mannitol sont ajoutés au milieu pour réduire la teneur en eau intracellulaire avant la congélation, diminuant ainsi la quantité d'eau disponible pour la formation de cristaux de glace létaux (Withers et Street 1977). Dans le cas des cellules de bananier, on a trouvé qu'une déshydratation osmotique avec 6% de mannitol (p/v) pendant 2 ou 7 jours n'affectait pas la viabilité après cryoconservation (résultats non publiés). Cependant, pour les suspensions cellulaires embryogènes issues d'inflorescences mâles de *Musa acuminata*, une préculture avec 180 g/L de saccharose pendant 24 heures a amélioré les résultats (Côte et al. 2000).

4.2.2 Cryoprotection

En matière de cryoprotection, diverses solutions ont été testées, comprenant un milieu MS avec 30 g/L de saccharose additionné de DMSO (à 2,5, 5, 7,5, 10 et 15%), de glycérol (à 5, 10 et 15%), de proline (à 10% (v/v)) ainsi que d'un mélange de cryoprotecteurs (contenant 0,5 M de glycérol, 0,5 M de DMSO et 1 M de saccharose (=342 g/L)). Bien que, en se basant sur le test de viabilité au FDA, tous les traitements aient permis la survie des cellules congelées, seul le DMSO à 5, 7,5 et 10% (v/v) donne une reprise

de croissance satisfaisante. L'addition, à la solution cryoprotectrice, de saccharose à des concentrations plus élevées (180 g/L) a, pour la plupart des suspensions, un effet positif sur la viabilité mesurée au FDA et, ce qui est plus important, sur la reprise de croissance après cryoconservation. Ceci a également été observé chez des cals embryogènes de canne à sucre (Martinez-Montero et al. 1998).

4.2.3 Congélation

Des taux de reprise après congélation comparables sont obtenus avec le bain de méthanol et le Nalgene™ cryo 1°C Freezing Container, à condition que les cryotubes soient transférés dans l'azote liquide dès que la température de -40°C est atteinte. Si les Nalgene™ cryo 1°C Freezing Containers sont laissées pendant la nuit dans le congélateur à -80°C, aucune survie n'est observée après congélation. L'utilisation des Nalgene™ cryo 1°C Freezing Containers s'est également avérée très efficace pour la congélation de suspensions embryogènes de bananier initiées à partir de fleurs mâles (Côte et al. 2000). L'avantage principal des boîtes Nalgene est qu'aucun appareil coûteux (excepté un congélateur à -80°C) n'est nécessaire pour une congélation lente contrôlée.

4.2.4 Traitements après décongélation

L'élimination de la solution cryoprotectrice, potentiellement toxique, immédiatement après la décongélation et son remplacement par du milieu liquide sans cryoprotecteur, avant le transfert sur milieu semi solide, entraîne une perte totale de la capacité de reprise de croissance des cellules qui blanchissent. Un transfert direct des cellules en milieu liquide, qui les soumet à un stress comparable, provoque également l'échec de la reprise. La reprise de croissance n'est obtenue que quand les cellules, encore en suspension dans la solution cryoprotectrice, sont transférées directement sur milieu semi solide.

En utilisant le protocole de cryoconservation optimisé décrit précédemment, la KULeuven a aujourd'hui stocké plus de 2700 cryotubes contenant des suspensions cellulaires embryogènes appartenant à 19 cultivars de bananier différents. Des suspensions de bananier ont été récemment ré-initiées à partir de matériel stocké pendant 15 ans dans l'azote liquide. Les capacités de production d'embryons somatiques sont restées intactes et des suspensions cellulaires embryogènes ont pu être établies à partir du matériel congelé.

Le fait que certaines suspensions cellulaires de bananier soient encore inaptes à la cryoconservation pourrait être considéré comme une

raison supplémentaire de poursuivre le perfectionnement du protocole de cryoconservation. Outre la procédure traditionnelle comprenant un refroidissement lent en présence d'une solution cryoprotectrice comprenant souvent du DMSO, la cryoconservation de suspensions cellulaires a également été réussie en utilisant la vitrification (Watanabe et al. 1995, Huang et al. 1995, Nishizawa et al. 1993, Sakai et al. 1990), l'encapsulation-déshydratation (Bachiri et al. 1995, Swan et al. 1998), l'encapsulation-vitrification (Gazeau et al. 1998), l'encapsulation combinée avec la congélation lente (Gazeau et al. 1998) et la vitrification combinée avec la congélation lente (Wu et al. 1997). Toutefois, puisque les suspensions récalcitrantes au protocole de cryoconservation décrit précédemment ne sont pas régénérantes, elles ne seront pas utilisées pour le génie génétique. Leur conservation a donc une valeur plus scientifique que pratique.

Annexes

Annexe 1. Composition des milieux et solutions

Milieu MS (Murashige et Skoog 1962)

Constituants MS	Concentration (mg/L)
Sels minéraux	
Chlorure de calcium	332.02
Nitrate d'ammonium (NH ₄ NO ₃)	1650
Sulfate de magnésium	80.70
Acide borique (H ₃ BO ₃)	6.2
Chlorure de cobalt (CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025
Sulfate de cuivre (CuSO ₄ · 6H ₂ O)	0.025
Sulfate de manganèse (MnSO ₄ · H ₂ O)	16.90
Iodure de potassium (KI)	0.83
Nitrate de potassium (KNO ₃)	1900
Phosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	170
Molybdate de sodium (Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	0.25
Sulfate de zinc (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	8.60

Source de fer

Sodium EDTA (Na ₂ · EDTA)	37.26
Sulfate ferrique (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	27.80

Vitamines

Myo-inositol	100
Acide nicotinique	0.5
Pyridoxine HCL	0.5
Thiamine HCL	0.5
Glycine (forme libre)	2.00

Vitamines de Morel (Morel 1950)

Panthoténate de calcium	1
Myo-inositol	100
Acide nicotinique	1
Pyridoxine HCL	1
Thiamine HCL	1
Biotine	0.01

Milieu P5

Milieu MS supplémenté avec 30 g/L de saccharose, 10 μM de BAP, 1 μM d'AIA, 2 g/L de gelrite ou 5 g/L d'agar (Banerjee et De Langhe 1985) (pH 5,8).

Milieu P4

Milieu P5 avec une concentration de BAP 10 fois plus élevée (100 μM).

Milieu de préculture (PCM)

Ce milieu contient tous les éléments du milieu P5 mais la concentration en saccharose est augmentée à 0,4M (=136,8 g/L).

Milieu de régénération P6

Milieu P5 avec une concentration en BAP 10 fois inférieure (1 μM).

Solution de prétraitement

Composants du milieu MS dilués dans l'eau, additionnés de 2 M de glycérol et 0,4 M (=136,8 g/L) de saccharose, pH ajusté à 5,8. Cette solution est stérilisée par filtration (0,22 μm).

Solution PVS2

Contient 30% (p/v) (3,26 M) de glycérol, 15% (p/v) (2,42 M) d'éthylène glycol (p/v) (EG), 15% (p/v) (1,9 M) de DMSO et 0,4 M (= 136,8 g/L) de saccharose (Sakai et al. 1990). Tous ces composés sont dissouts dans du milieu MS, le pH est ajusté à 5,8 et la solution est stérilisée par filtration (0,22 μm).

Solution de dilution

La solution de dilution, stérilisée par filtration (0,22 μm), est un milieu MS contenant 1,2M (=410,4 g/L) de saccharose (pH 5,8).

Milieu ZZ

Macroéléments de MS et fer dilués de moitié, microéléments de MS, 5 μM de 2,4-D, 1 μM de zéatine, vitamines standard de MS, 10 mg/L d'acide ascorbique et 30 g/L de saccharose (pH 5,8).

Milieu RD1

Macroéléments de MS et fer, microéléments de MS, 1 μM de BAP, vitamines de MS standard, 100 mg/L de myo-inositol, 10 mg/L d'acide ascorbique, 30 g/L de saccharose et 2 g/L de gelrite (pH 5,8).

Milieu MA2

Macro- et microéléments de MS, 1 mg/L de biotine, 100 mg/L de glutamine, 100 mg/L d'extrait de malt, 1 mg/L de 2,4-D et 45 g/L de saccharose (pH 5,3).

Milieu MA3

Sels minéraux	Concentration (mg/L)
KNO ₃	2500
CaCl ₂ · 2H ₂ O	200
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	400
NH ₄ H ₂ PO ₄	300
MnSO ₄ · H ₂ O	10
H ₃ BO ₃	5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1
KI	1
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.2
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.1
CoCl ₂	0.1

Source de fer

FeSO ₄ · 7H ₂ O	15
Na ₂ DTA	20

Vitamines MS

Autres composants

ANA	0.2
Zeatine	0.05
2iP	0.2
Kinétine	0.1
Lactose	10 g/L
Saccharose	45 g/L
Agarose	7 g/L

pH 5.3

Annexe 2. Equipement de base nécessaire

Outils (pinces et scalpels)

Source d'azote liquide (AL)

Récipients de stockage

- un pour le stockage de l'azote liquide
- un pour le stockage du matériel végétal avec des portoirs ou des boîtes de rangement des cryotubes (deux récipients par sécurité)

Boîtes de polystyrène

Vases Dewar

Cryotubes stériles de 2 ml et portoir cryovial (12 x 12)

Bain de méthanol à agitation (-40°C) *ou* boîte contenant du propanol comme bain d'alcool (par exemple, Nalgene™ cryo 1°C Freezing Container.) *ou* congélateur programmable (seulement pour la recherche ou l'application à grande échelle) *ou* (congélateur -70°C ou -80°C + Mr Freeze)

Produits chimiques (DMSO, PEG, etc.)

Loupe binoculaire (dotée d'une bonne source de lumière)

Microscope à fluorescence (en option)

Equipements de sécurité : gants et lunettes (pour manipulation de l'azote liquide)

Bain-marie (ou eau chaude dans un Becher en plastique)

Thermomètre

Minuteur

Glaçons et pains de glace

Annexe 3. Liste des abréviations

2,4 D	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
AIA	Acide indole acétique
AL	Azote liquide
BA, BAP	6-benzylaminopurine
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
EG	Ethylène glycol
FDA	Diacétate de fluorescéine
Milieu MS	Milieu de Murashige et Skoog
PEG	Polyéthylène glycol
TTC	Chlorure de triphényl tétrazolium

Références bibliographiques

- Abdelnour-Esquivel A., A. Mora & V. Villalobos. 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of *Musa acuminata* (AA) and *Musa balbisiana* (BB). *CryoLetters* 13:159-164.
- Agrawal A., R. Swennen & B. Panis. 2004. A comparison of four methods for cryopreservation of meristems in banana (*Musa* spp.). *CryoLetters* 25:101-110.
- Bachiri Y., C. Gazeau, J. Hansz, C. Morisset & J. Dereuddre. 1995. Successful cryopreservation of suspension cells by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 43:241-248.
- Banerjee N. & E. De Langhe. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Report* 4:351-154.
- Benson E.E., M. Wilkinson, A. Todd, U. Ekuere & J. Lyon. 1996. Developmental competence and ploidy stability in plants regenerated from cryopreserved potato shoot-tips. *CryoLetters* 17:119-128.
- Carpentier S., E. Witters, K. Laukens, H. Van Onckelen, R. Swennen & B. Panis. 2007. Banana (*Musa* spp.) as a model to study the meristem proteome: acclimation to osmotic stress. *Proteomics* 7:92-105.
- Carpentier S., E. Witters, K. Laukens, P. Deckers, R. Swennen & B. Panis. 2005. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. *Proteomics* 5:2497-2507.
- Côte F.X., R. Domergue, S. Monmarson, J. Schwendiman, C. Teisson & J.V. Escalant. 1996. Embryogenic cell suspensions from the male flower of *Musa* AAA cv. 'Grand nain'. *Physiologia Plantarum* 97:285-290.
- Côte F.X., O. Goue, R. Domergue, B. Panis & C. Jenny. 2000. In-field behavior of banana plants (*Musa* spp.) obtained after regeneration of cryopreserved embryogenic cell suspensions. *CryoLetters* 21:19-24.
- Delvallée I., J. Guillaud, M. Beckert & C. Dumas. 1989. Cryopreservation of immature maize embryos after freeze-hardening in the ear and *in vitro*. *Plant Science* 60:129-136.
- Dhed'a D., F. Dumortier, B. Panis, D. Vuylsteke & E. De Langhe. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of the cooking banana cv. 'Bluggoe' (*Musa* spp., ABB group). *Fruits* 46(2):125-135.
- Dixon R.A. 1985. Isolation and maintenance of callus and cell suspension cultures. Pp. 1-20 *in* Plant cell culture. A practical approach (R.A. Dixon, ed.). IRL Press, Oxford.
- Dussert S., F. Engelmann & M. Noirot. 2003. Development of probalistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections. *CryoLetters* 24:149-160.
- Engelmann F. & Y. Duval. 1986. Cryopreservation of oil palm somatic embryos (*Elaeis guineensis* Jacq.): results and application prospects. *Oléagineux* 41:169-174.
- Engelmann F. 1997. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. *Plant Genetic Resources Newsletter* 112:9-18.
- Escalant J.V. & C. Teisson. 1987. Comportement *in vitro* de l'embryon isolé du bananier. *Fruits* 42(6):333-342.
- Gallard A., B. Panis, N. Dorion, R. Swennen & A. Grapin. 2008. Cryopreservation of *Pelargonium* apices by droplet-vitrification. *CryoLetters* 29: 243-251.
- Gazeau C., H. Elleuch, A. David & C. Morisset. 1998. Cryopreservation of transformed *Papaver somniferum* cells. *CryoLetters* 19(3):147-159.
- González-Arno M.T., M. Márquez, C. Urrea, M. Martínez-Montero & F. Engelmann. 1998. Cryopreservation of apices from pineapple (*Ananas comosus*) *in vitro* plantlets. *CryoLetters* 19:375-382.
- Hamill S., K. Wasmund, M. Smith, K. Eccleston & D. McKay. 2005. Endogenous bacterial isolated from banana meristems during tissue culture initiation: problems and potential. pp.101-111 *in* Contributing to a Sustainable Future. (Benett, I.J., Bunn, E., Clarke, H., and McComb, J.A., eds). Proc. Australian Branch IAPTC & B. Perth, Australie occidentale, AU.
- Helliot B., R. Swennen, Y. PouMay, E. Frison, P. Lepoivre & B. Panis. 2003. Ultrastructural changes associated with cryopreservation of banana (*Musa* spp.) highly proliferating meristems. *Plant Cell Reports* 21:690-698.
- Hernandez J.B., S. Remy, V. Galán Saúco, R. Swennen & L. Sági. 1998. Chemotactic movement and attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to single cells and tissues of banana. *Journal of Plant Physiology* 155:245-250.

- Huang C.-N., J.-H. Wang, Q.-S. Yan, X.-Q. Zhang & Q.-F. Yan. 1995. Plant regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) embryogenic cell suspension cells cryopreserved by vitrification. *Plant Cell Reports* 14:730-734.
- IPGRI. 1996. Final report of the project 'Refinement of cryopreservation techniques for the long-term conservation of sugarcane and banana in Cuba'. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
- Kendall E.J., K.K. Kartha, J.A. Qureshi & P. Chermak. 1993. Cryopreservation of immature spring wheat zygotic embryos using abscisic acid pretreatment. *Plant Cell Reports* 12:89-94.
- Marco A., J.L. Casas & B. Panis. 2007. Crioconservación de *Thymus moroderi*. VII Reunión de la Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales. Alcalá de Henares, Madrid, Espagne, 25-27 juin 2007.
- Martínez-Montero M., M.T. González-Arno, C. Borroto-Nordelo, C. Puentes-Díaz & F. Engelmann. 1998. Cryopreservation of sugarcane embryogenic callus using a simplified freezing process. *CryoLetters* 19: 171-176.
- Matsumoto T., A. Sakai & K. Yamada. 1994. Cryopreservation of *in vitro*-grown apical meristems of wasabi (*Wasabi japonica*) by vitrification and subsequent high plant regeneration. *Plant Cell Reports* 13:442-446.
- Morel G. 1950. Sur la culture des tissus de deux monocotylédones. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 230:1099-1101.
- Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nishizawa S., A. Sakai, Y. Amnao & T. Matsuzawa. 1993. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* 91:67-73.
- Panis B. 1995. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) germplasm. *Dissertationes de Agricultura* 272. Katholieke Universiteit Leuven, Belgique. 201pp.
- Panis B., I. Van den houwe, B. Piette & R. Swennen. 2007. Cryopreservation of the banana germplasm collection at the International Transit Centre - Bioversity International. *Advances in Horticultural Science* 21: 235-238.
- Panis B., B. Piette & R. Swennen. 2005a. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Science* 168:45-55.
- Panis B., B. Helliot, H. Strosse, S. Remy, P. Lepoivre & R. Swennen. 2005b. Germplasm conservation, virus eradication and safe storage of transformation competent cultures in banana: The importance of cryopreservation. *Acta Horticulturae* 692:51-59.
- Panis B., H. Strosse, S. Van den Hende & R. Swennen. 2002. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. *CryoLetters* 23:375-384.
- Panis B., H. Schoofs, S. Remy, L. Sági & R. Swennen. 2000a. Cryopreservation of banana embryogenic suspensions: an aid for genetic transformation. Pp.103-109 *in* Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application (F. Engelmann & H. Takagi, eds). Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
- Panis B., H. Schoofs, N.T. Thinh & R. Swennen. 2000b. Cryopreservation of proliferating meristem cultures of banana. Pp. 238-243 *in* Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application (F. Engelmann & H. Takagi, eds). Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
- Panis B., K. Vandenbranden, H. Schoofs & R. Swennen. 1998. Conservation of banana germplasm through cryopreservation. Pp. 515-521 *in* Proceedings of the International Symposium on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species, Brisbane, Queensland, Australie, 29 Sept.-3 Oct. 1997 (R.A. Drew, ed.). *Acta Horticulturae* 461. ISHS.
- Panis B., N. Totté, K. Van Nimmen, L.A. Withers & R. Swennen. 1996. Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. *Plant Science* 121:95-106.
- Panis B., A. Van Wauwe & R. Swennen. 1993. Plant regeneration through direct somatic embryogenesis from protoplasts of banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Report* 12:403-407.
- Panis B., L.A. Withers & E. De Langhe. 1990. Cryopreservation of *Musa* suspension cultures and subsequent regeneration of plants. *CryoLetters* 11:337-350.

- Panta A., B. Panis, C. Ynoue, B. Criel, R. Swennen & W. Roca. 2006. Improvement of potato cryopreservation for the long-term conservation of Andean landraces at CIP. 43rd Meeting of the Society for Cryobiology in association with the Society for Low Temperature Biology. Hamburg, Allemagne, 24-27 July 2006.
- Plessis P. & P.L. Steponkus. 1996. Cryopreservation of sweet potato shoot-tips by vitrification. *Cryobiology* 33:655-656.
- Reed B.M., D. Dumet, J.M. Denoma & E.E. Benson. 2001. Validation of cyopreservation potocols for pant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes L.*, *Biodiversity and Conservation* 10:939-949.
- Reed B.M., I. Kovalchuk, S. Kushnarenko, A. Meier-Dinkel, K. Schoenweiss, S. Pluta, K. Straczynska & E.E. Benson. 2004. Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories. *CryoLetters* 25:341-352.
- Reed B.M. 2008. *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*. New York, NY: Springer. 515pp.
- Remy S., E. Thiry, B. Coemans, S. Windelinckx, R. Swennen & L. Sági. 2005. Improved T-DNA vector for tagging plant promoters via high-throughput luciferase screening. *BioTechniques* 38:763-770.
- Sági L., B. Panis, S. Remy, H. Schoofs, K. De Smet, R. Swennen & B.P.A. Cammue. 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Bio/Technology* 13:481-485.
- Sági L., S. Remy, B. Panis, R. Swennen & G. Volckaert. 1994. Transient gene expression in electroporated banana protoplasts (*Musa* spp. cv. 'Bluggoe', ABB group) isolated from embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Reports* 13:262-266.
- Sakai A. & F. Engelmann. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification. *CryoLetters* 28:151-172.
- Sakai A., S. Kobayashi & I. Oiyama. 1990. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* 9:30-33.
- Sánchez-Romero C. & B. Panis. 2008. Cryopreservation of olive embryogenic cultures. Cryopreservation of crop species in Europe. CRYOPLANET - COST Action 871. Agrifood Research Working papers 153. Oulu, Finlande, 20-23 février 2008. 24-25.
- Sant R., B. Panis, M. Taylor & A. Tyagi. 2008. Cryopreservation of shoot-tips by droplet vitrification applicable to all taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) accessions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 92:107-111.
- Schoofs H. 1997. The origin of embryogenic cells in *Musa*. *Dissertationes de Agricultura* 330. Katholieke Universiteit Leuven, Belgique. 257pp.
- Strosse H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant & F. Côte. 2003. Banana and Plantain embryogenic cell suspensions (A. Vézina and C. Picq, eds). INIBAP Technical Guidelines 8. INIBAP, Montpellier, France. 31pp.
- Strosse H., H. Schoofs, B. Panis, E. André, K. Reyniers & R. Swennen. 2006. Development of embryogenic cell suspensions from shoot meristematic tissue in bananas and bananiers plantain (*Musa* spp.). *Plant Science* 170: 104-112.
- Strosse H., E. André, L. Sági, R. Swennen & B. Panis. (*in press*). Adventitious shoot formation is not inherent to micropropagation of banana as it is in maize. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*.
- Surga J., R. Swennen & B. Panis. 1999. Cryoconservation de méristèmes chez le bananier (*Musa* spp.) : optimisation de la régénération. *InfoMusa* 8(1):23-24.
- Swan T.W., E.A. Deakin, G. Hunjan, G.R. Souch, M.E. Spencer, A.M. Stafford & P.T. Lynch. 1998. Cryopreservation of cell suspensions of *Polygonum aviculare* using traditional controlled rate freezing and encapsulation/dehydration protocols, a comparison of post-thaw cell recovery. *CryoLetters* 19:237-248.
- Takagi H. 2000. Recent developments in cryopreservation of shoot apices of tropical species. Pp. 178-193 *in* Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application (F. Engelmann & H. Takagi, eds). Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- Takagi H., N.T. Thinh, O.M. Islam, T. Senboku & A. Sakai. 1997. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) by vitrification. 1. Investigation of basic conditions of the vitrification procedure. *Plant Cell Reports* 16:594-599.
-

- Thinh N.T., H. Takagi & S. Yashima. 1999. Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of banana (*Musa* spp.) by vitrification method. *CryoLetters* 20(3):163-174.
- Thomas P., G.K. Swarna, P.K. Roy & P. Patil. 2008. Identification of culturable and originally non-culturable endophytic bacteria isolated from shoot tip cultures of banana cv Grand Naine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 93:55-63.
- Uragami A. 1991. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis*) cultured *in vitro*. *Resources Bulletin of the Hokkaido National Agricultural Experimental Station* 156:1-37.
- Van den Houwe I. & R. Swennen. 2000. Characterization and control of bacterial contaminants in *in vitro* cultivars of banana (*Musa* spp.). *Acta Horticulturae* 530:69-79.
- Watanabe K. & P.L. Steponkus. 1995. Vitrification of *Oryza sativa* L. cell suspensions. *CryoLetters* 16:255-262.
- Widholm J.M. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology* 47:189-194.
- Withers L.A. & H.E. Street. 1977. Freeze-preservation of cultured plant cells III: The pregrowth phase. *Physiologia Plantarum* 39:171-178.
- Wu Y., F. Engelmann, A. Frattarelli, C. Damiano & L.A. Withers. 1997. Cryopreservation of strawberry cell suspensions. *CryoLetters* 18:317-324.
- Zhu G. Y., J. Geuns, S. Dussert, R. Swennen & B. Panis. 2006. Sugar, sterol and fatty acid composition in banana meristem cultures in relation to cryopreservation ability. *Physiologia Plantarum* 128:80-94.

Bibliographie complémentaire

- Argent G.C.G. 1976. The wild bananas of Papua New Guinea. Notes from the Royal Botanic Garden Edinburgh. 35:77-114.
- Bajaj Y.P.S. 1995. *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 32: Cryopreservation of Plant Germplasm 1. Springer, Berlin.
- CGIAR. 1992. Review of CGIAR priorities and strategies, Part 1, section 5.3.5. Consultative Group on International Agricultural Research (CGIAR), Washington DC, USA.
- Chin H.F. 1996. Germination and storage of banana seeds. Pp. 218-227 *in* Proceedings of the workshop on New Frontiers in Resistance Breeding for Nematodes, *Fusarium* and Sigatoka, 2-5 octobre 1995, Kuala Lumpur, Malaisie (E.A. Frison, J.P. Horry & D. De Waele, eds). INIBAP, Montpellier, France.
- Dereuddre J., C. Scottez, Y. Arnaud & M. Duro. 1990. Resistance of alginate-coated axillary shoot tips of pear tree (*Pyrus communis* L. cv. Beurré Hardy) *in vitro* plantlets to dehydration and subsequent freezing in liquid nitrogen: effects of previous cold hardening. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences Paris*, T. 310, Série III:317-323.
- Dumet D., F. Engelmann, N. Chabrillange & Y. Duval. 1993. Cryopreservation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos involving a desiccation step. *Plant Cell Reports* 12: 352-355.
- Engelmann F. & H. Takagi (eds). 2000. Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Tsukuba, Japan / International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italie.
- FAO. 1997. *Production Year Book 1997*. Food and Agriculture Organization of The United Nations, Rome.
- Fuller B.J., N. Lane & E.E. Benson. 2004. *Life in the Frozen State*. CRC Press, Boca Raton.
- Hahn S., D. Vuylsteke & R. Swennen. 1990. First reactions to ABB cooking bananas distributed in southeastern Nigeria. Pp. 306-315 *in* Sigatoka leaf spot diseases of banana (R.A Fullerton & R.H. Stover, eds). INIBAP, Montpellier, France.
- Humphrey J.E. 1896. The development of the seed in Scitamineae. *Annals of Botany London O.S.* 10:1-40.
- INIBAP. 1988. *Annual Report 1987*. International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France. 43pp.
- INIBAP. 1998. *Annual Report 1997*. International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Montpellier, France. 72pp.

- Jamaluddin S.H. 1986. Characterization, evaluation and utilization of the banana germplasm in Malaysia. Pp. 315-329 in *Pros. Simp. Buahbuahan Keb.* (Y.K Chan & P. Raveendranathan, eds). MARDI, Kuala Lumpur, Malaisie.
- Kiew R. 1987. Notes on the natural history of the Johore Banana, *Musa gracilis* Holtum. *Malayan Nature Journal* 41:239-248.
- Persley G.J. & E.A. De Langhe (eds). 1987. Banana and plantain breeding strategies: Proceedings of an international workshop held at Cairns, Australia, 13-17 October, 1986. ACIAR proceedings No. 21. 187pp.
- Sagi L., G.D. May, S. Remy & R. Swennen. 1998. Recent developments in biotechnological research on bananas (*Musa* spp.). *Biotechnology & Genetic Engineering Review* 15:313-327.
- Sakai A. 1997. Potentially valuable cryogenic procedures for cryopreservation of cultured plant meristems. Pp. 53-66 in *Conservation of plant genetic resources in vitro* (M.K. Razdan & E.C. Cocking, eds). Science Publishers, Inc., Enfield, New Hampshire, USA.
- Simmonds N.W. 1952. The germination of banana seeds. *Tropical Agriculture, Trin.* 29:2-16.
- Simmonds N.W. 1955. Wild bananas in Malaya. *Malayan Nature Journal*, 10:1-8.
- Swennen R. & D. Vuylsteke. 1993. Breeding black Sigatoka resistant bananiers plantain with a wild banana. *Tropical Agriculture* 70(1):74-77.
- Towill L.E. & Y.P.S. Bajaj. 2001. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 32: Cryopreservation of Plant Germplasm 2*. Springer, Berlin.
- Tribe D.E. 1994. Feeding and greening the world. The role of international agricultural research. CABI, Oxon, R.-U. 274pp.
- Uragami A., A. Sakai & M. Nagai. 1990. Cryopreservation of dried axillary buds from plantlets of *Asparagus officinalis* L. grown *in vitro*. *Plant Cell Reports* 9:328-331.
- Van den Houwe I., K. De Smet, H. Tezenas du Montcel & R. Swennen. 1995. Variability in storage potential of banana shoot cultures under medium-term storage conditions. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42:269-274.
- Vuylsteke D., R. Ortiz, R.S. Ferris & J.H. Crouch. 1997. Plantain improvement. Pp. 267-320 in *Plant Breeding Reviews*. Vol. 14 (J. Janick, ed.). John Wiley, New-York, USA.
- Wesley-Smith J., C.W. Vertucci, P. Berjak, N.W. Pammenter & J. Crane. 1992. Cryopreservation of desiccation-sensitive axes of *Camellia sinensis* in relation to dehydration, freezing rate and the thermal properties of tissue water. *Journal of Plant Physiology* 140:596-604.
- Withers L.A. 1992. *In vitro* conservation. Pp. 169-200 in *Biotechnology of perennial fruit crops* (F.A. Hammerschlag & R.E. Litz, eds). *Biotechnology in agriculture* No. 8. CAB International, Wallingford, R.-U.
-



Bioversity International
est le nom sous lequel opèrent
l'Institut international des
ressources phytogénétiques
(IPGRI) et le Réseau international
pour l'amélioration de la banane
et de la banane plantain (INIBAP)

Avec l'appui du GCRAI

ISBN 978-2-910810-87-0



partageons les connaissances au profit des communautés rurales
sharing knowledge, improving rural livelihoods