



NO 904.661

CLASSIF. INTERNAT.: A016

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

MIS EN LECTURE LE: 18 Aout 1986

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention

Vu le procès-verbal dressé le 23 Avril 1986 A 15h 00

à l' Office de la Propriété Industrielle

ARRETE :

ARTICLE 1.- Il est délivré à : PERSONNALITE JURIDIQUE DE LA STATION DES CULTURES
FRUITIERES ET MARAICHIERES
234 Chaussée de Charleroi, B 5800 Gembloux(BELGIQUE)

REPR. PAR Office Hanssens S.P.R.L. à 1040 Bruxelles
un brevet d'invention pour METHODE ET COMPOSITION DE LUTTE CONTRE LE PHENOMENE DE
VITRIFICATION AU COURS DE LA MICROPROPAGATION IN VITRO DES PLANTES.

ARTICLE 2.- Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls,
sans garantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de
l'exactitude de la description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention (mémoire
descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de sa
demande de brevet.

Bruxelles, le 15 Mai 1986

PAR DELEGATION SPECIALE

Le Directeur

L. WUYTS

904551

B 20 291

B R E V E T D' I N V E N T I O N

=====

Méthode et composition de lutte contre le phénomène de
vitrification au cours de la micropropagation in vitro des
plantes

Personnalité Juridique de la Station des Cultures
Fruitières et Maraîchères

5

L'invention se rapporte à la multiplication de plantes in vitro, et en particulier à la lutte contre des troubles de croissance des explants au cours de ce processus de multiplication.

5 Les plantes multipliées in vitro ont tendance à présenter des troubles de croissance qui peuvent perturber la production industrielle par micropropagation.

Les explants atteints portent des feuilles anormales plus ou moins enroulées, translucides, 10 présentant souvent une couleur vert foncé; ils perdent leur capacité à proliférer, se nécrosent et meurent plus ou moins rapidement. Ce trouble est le plus souvent appelé "vitrification", "vitrescence" ou "hyperhydrie", et sera désigné ci-après par "vitrification". Il est d'autant plus 15 fréquent ou intense que les plantes sont soumises à une multiplication plus intense.

L'emploi de milieux liquides augmente aussi les risques de vitrification.

NAVATEL (Fruits, vol. 37, n° 5, 331-336, 1982) a 20 décrit le trouble comme suit:
"Ce symptôme qui apparaît généralement pendant la phase de multiplication a été signalé par de nombreux laboratoires. Les plants prennent un aspect "vitreux". Les 25 feuilles, de couleur vert foncé et luisantes, se recourbent, deviennent cassantes et translucides.
L'importance des dégâts semble augmenter avec le nombre de cultures sur le milieu prolifération, plus ou moins riche en cytokinine. Dans la majorité des cas, les plants présentant ces symptômes se bloquent et ne sont 30 pratiquement plus utilisables pour la suite de la multiplication. On observe quelquefois un certain rétablissement du végétal lorsque celui-ci est placé dans un milieu sans auxine et sans cytokinine. Ce type d'accident a été observé sur le GF 677 mais également sur 35 différents porte-greffe du cerisier et du pommier."

"De nombreuses hypothèses ont été émises quant à l'origine

de ces symptômes: milieu trop riche, toxicité de l'ion NH_4 , densité trop importante dans le bocal, production d'éthylène, mauvaise adaptation des bocal de culture, toxicité par accumulation dans le végétal de certaines substances de croissance (cytokinine). Des travaux récents
5 montrent que l'apparition de ce type de symptôme serait lié au potentiel hydrique du milieu (DEBERGH et al. 1981), alors que d'autres auteurs confirment le rôle prépondérant que jouerait l'ion NH_4 , peut-être en
10 corrélation avec d'autres éléments, dans l'apparition de ce phénomène (BEAUCHESNE, 1981)."

"D'autres observations ont été faites par différents auteurs sur des techniques permettant sinon d'éliminer du moins de réduire la gravité de ces symptômes.
15 ZUCCHERELLI (1979) montre que l'adjonction de pectine alimentaire au milieu de culture réduirait l'importance des plants "vitreux". DRUART (1980) signale que le passage du matériel végétal en chambre froide à plus ou moins 2°C pendant un mois environ limiterait l'apparition de tels
20 symptômes."

"Toutefois, ces résultats ne permettent pas d'expliquer en totalité ce phénomène, probablement très complexe du fait du nombre de facteurs pouvant interférer entre eux."

L'agar est actuellement utilisé dans les milieux
25 de culture, généralement en quantité de 7 à 12 g/l, pour les solidifier. Ceci facilite la mise en place des plantes et réduit dans une certaine mesure les risques de vitrification. Toutefois, le taux de multiplication est toujours plus élevé en milieu liquide qu'en milieu solide,
30 et ce d'autant plus que la quantité d'agar est supérieure à environ 7 g/l.

Les solutions proposées n'ont apporté qu'une solution très limitée à la vitrification, les symptômes réapparaissant après 2 ou 3 multiplications sur le milieu
35 amélioré proposé.

Quant à la solution proposée par DEBERGH et al

(Physiol. Plant 59.270-276, 1981) d'augmenter la quantité d'agar du milieu solide, elle peut protéger les plants de la vitrification, mais entraîne une très forte réduction du taux de multiplication. L'effet de l'agar est dans ce cas simplement d'augmenter le potentiel matriciel du milieu, et est tout à fait différent de celui qu'il a dans l'invention, où l'on travaille en milieu liquide, c'est-à-dire avec un potentiel matriciel nul. De plus, l'augmentation de la quantité d'agar augmente le caractère solide du milieu de culture, et réduit le contact entre les plants et le milieu de culture, ce qui réduit d'autant le taux de multiplication. La relative "protection" contre la vitrification est donc obtenue en fait par passage à des conditions de multiplication moins intense.

Un but de l'invention est donc d'apporter une solution à la lutte contre le trouble de vitrification, sans perte du taux de multiplication.

Une caractéristique de l'invention concerne une méthode de lutte contre les troubles de croissance, désignés par vitrification, vitrescence ou hyperhydrie, dans la micropropagation de plantes multipliées in vitro, qui consiste à incorporer dans le milieu de culture une quantité efficace d'un hydrolysate d'agar.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la quantité d'hydrolysate d'agar dans le milieu de culture est d'au moins 0,1 g/l (calculée sur l'agar avant hydrolyse) de milieu nutritif.

Une autre caractéristique de l'invention concerne une composition pour la lutte contre la vitrification de plantes multipliées par micropropagation in vitro, qui contient un hydrolysate d'agar à titre de principe actif.

L'invention concerne encore un procédé de préparation d'une composition selon la revendication comme ci-dessus, qui consiste à hydrolyser l'agar en milieu acide, à une température située entre 20 et 200°C, pendant 10 minutes à 7 jours. De préférence, l'hydrolyse est

effectuée à une température située entre 100 et 120°C, pendant 30 à 60 minutes, à pH 3 - 4.

Enfin, selon l'invention, le milieu acide peut être de l'eau acidifiée ou le milieu de culture
5 acidifié, selon que l'on souhaite obtenir l'hydrolysate d'agar pur, à ajouter à un milieu de culture, ou préparer directement le milieu de culture contenant l'hydrolysate d'agar en quantité voulue.

La solution proposée par l'invention consiste donc
10 à introduire dans le milieu nutritif un hydrolysate d'agar en quantité efficace. D'après les essais menés par les inventeurs, la quantité d'hydrolysate d'agar n'est pas critique, pour autant qu'elle soit supérieure à 0,1 g/l (calculée sur l'agar avant hydrolyse) de milieu nutritif,
15 seuil en dessous duquel aucune activité n'a été observée.

L'invention s'applique à l'ensemble des espèces végétales, et plus particulièrement aux espèces ligneuses, dont notamment les Prunus et Malus parmi les fruitiers, pour lesquelles les inventeurs disposent d'une méthode
20 d'induction de la vitrification, et sur lesquelles ont particulièrement portés les essais.

Elle semble efficace également pour les espèces non ligneuses, bien que les inventeurs ne disposent pas jusqu'à présent, pour ces espèces, d'une méthode
25 d'induction de la vitrification permettant d'effectuer des essais comparatifs strictement reproductibles.

L'hydrolysate d'agar est liquide, et ne solidifie donc plus le milieu de culture, la multiplication se faisant dès lors en milieu liquide, soit dans les
30 conditions les plus favorables du point de vue du taux de multiplication, mais offrant plus de risque d'apparition d'une vitrification des plantes.

L'agar est hydrolysé, soit seul dans de l'eau, soit avec le milieu de culture liquide.

35 Le milieu de culture utilisé par les inventeurs est le milieu proposé par DRUART (Colloque International

sur la culture in vitro des essences forestières, pp 101-108, 1981, IUFRO Fontainebleau, France).

Le modèle d'induction de la vitrification proposé par PAQUES (Arch. Int. Phys. et Bioch. 1984, 92, 20), qui
5 fait appel à l'emploi d'un milieu liquide dans lequel sont plongées les bases des tiges des microplantes, sert de contrôle d'efficacité d'action de l'hydrolysate d'agar.

Une méthode de mise en oeuvre de l'invention consiste à introduire l'agar dans le milieu de culture
10 choisi, comme s'il s'agissait de préparer un milieu de culture solide classique, en quantité de 0,1 à 100 g/l.

L'ensemble est alors hydrolysé en milieu acide, pH 0 - 7, de préférence pH 0 - 4, mieux pH 3 - 4, à une température comprise entre 20 - 200°C, de préférence 50 -
15 150°C, mieux 75 - 120°C, pendant des temps variables selon la température et le pH, de 10 minutes à 7 jours. L'acide utilisé pour l'acidification n'est pas un paramètre de l'invention, et est généralement quelconque pour autant qu'il n'interfère pas avec le processus de multiplication.
20 Ce peut être par exemple l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, les acides phosphoriques, les acides carboxyliques et analogues.

Un mode de réalisation préféré de l'hydrolyse selon l'invention consiste à effectuer l'hydrolyse à pH 3
25 - 4, à une température de 75 à 120°C. L'hydrolyse dure alors de 30 à 40 minutes.

L'hydrolysate obtenu, ou le surnageant issu de la centrifugation, est alors utilisé comme milieu de culture. Des essais ont en effet montré que le culot de la
30 centrifugation était inerte, et ne jouait aucun rôle dans le processus de lutte contre la vitrification selon l'invention. Il peut donc être éliminé si on le souhaite, pour une question de commodité.

L'hydrolyse du milieu de culture n'est cependant
35 pas utile selon l'invention et on peut également préparer un hydrolysate d'agar "pur", c'est-à-dire sans milieu de

culture. On peut ainsi préparer un hydrolysât concentré, par exemple en ajoutant à l'agar la quantité d'eau strictement nécessaire pour réaliser l'hydrolyse. Cet hydrolysât concentré peut alors être ajouté tel quel au milieu de culture choisi, pour protéger les plantes contre le risque de vitrification.

Dans la présente description, les quantités d'hydrolysât d'agar sont exprimées en grammes/litre de milieu de culture, et se rapportent au poids d'agar avant hydrolyse.

Comme on l'a indiqué plus haut, les inventeurs ont trouvé que la quantité d'hydrolysât d'agar n'était pas un paramètre significatif de l'invention, pour autant qu'elle soit égale ou supérieure à la quantité efficace, soit de l'ordre de 0,1 g/l. Des quantités préférées sont de 1 à 100 g/l, mieux de 7 à 12 g/l, soit des quantités équivalentes à celles utilisées actuellement pour solidifier les milieux de culture.

De même, l'origine de l'agar ne semble pas avoir d'influence sur les propriétés de lutte contre la vitrification. L'agar utilisé par les inventeurs est l'agar de qualité "Bacto" de DIFCO.

APPLICATION DU PROCEDE

Des microboutures du sujet porte-greffe de pommier M 26 sont cultivées soit sur un milieu de prolifération liquide contenant un hydrolysât d'agar, soit sur le même milieu sans cet hydrolysât.

Les milieux de culture sont préparés comme suit:

- milieu avec hydrolysât d'agar: la solution est constituée des macroéléments, des microéléments, des vitamines, des substances de croissance et de sucre aux concentrations proposées par Druart (1981). L'agar "Bacto" de DIFCO est ajouté à la concentration de 7g/l.
- milieu sans hydrolysât d'agar: ce milieu contient tous les éléments précités excepté l'agar.

Le pH des milieux réalisés est ajusté à 3,5 avec

l'acide chlorhydrique, à la température du laboratoire.
Les solutions sont alors soit portées à ébullition,
distribuées dans les flacons de culture puis autoclavées
40 minutes à 110°C, soit autoclavées directement dans les
5 conditions précitées puis distribuées stérilement dans les
flacons de culture.

Les milieux ainsi obtenus sont liquides,
toutefois, le milieu contenant l'agar hydrolysé floccule
légèrement.

10 Le milieu sans agar (milieu A) est utilisé tel
quel; le milieu contenant l'hydrolysate d'agar étant soit
utilisé tel quel (milieu B₁), soit centrifugé à 300g
pendant 10 minutes. Le surnageant obtenu constitue le
milieu de culture B₂. Le culot remis en suspension
15 dans le milieu sans agar est le milieu B₃.

Repiquage des explants:
20 microboutures de M 26, de 2 cm de long, sont repiquées
sur les quatre milieux nutritifs décrits ci-dessus. Les
observations réalisées, après trente jours de culture
20 figurent dans le tableau suivant:

OBSERVATIONS	MILIEUX			
	A	B ₁	B ₂	B ₃
25 Taux de Vitri- fication	20/20	0/20	0/20	19/20
30 Nombre de bour- geons/plante	4-7	5-7	6-7	5-6

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée aux
modes de réalisation décrits, qui n'ont été choisis qu'à
titre d'exemple.

REVENDEICATIONS

1. Méthode de lutte contre les troubles de croissance , désignés par vitrification, vitrescence ou hyperhydrie, dans la micropropagation de plantes multipliées in vitro, caractérisée en ce qu'elle consiste à incorporer dans le milieu de culture une quantité efficace d'un hydrolysate d'agar.
2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'hydrolysate d'agar est incorporé en quantité d'au moins 0,1 g/l (calculée sur l'agar avant hydrolyse) de milieu de culture.
3. Composition pour la lutte contre la vitrification de plantes multipliées par micropropagation in vitro, caractérisée en ce qu'elle contient un hydrolysate d'agar à titre de principe actif.
4. Procédé de préparation d'une composition selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il consiste à hydrolyser l'agar en milieu acide, à une température située entre 20 et 200°C, pendant 10 minutes à 7 jours.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'hydrolyse est effectuée à une température située entre 100 et 120°C, pendant 30 à 60 minutes, à pH 3 - 4.
6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le milieu acide est de l'eau acidifiée
7. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le milieu acide est le milieu de culture acidifié.

Bruxelles, le 23 avril 1986

P. PON. Personnalité Juridique de la
Station des Cultures Fruitières et
Maraîchères

