



# PRODUCTION PAR CULTURE *IN VITRO*

## L'EUCALYPTUS : DE L'INTRODUCTION A L'ENRACINEMENT

### EUCALYPTUS : PRODUCTION HISTORY

Les plantes ont la capacité de se multiplier naturellement par clonage sous la forme du bouturage. Ce clonage permet d'obtenir des individus identiques génétiquement à l'individu de départ. Le clone désigne l'ensemble des individus qui possèdent le même patrimoine génétique, et en même temps chaque individu qui constitue l'ensemble. Comme exemple, dans nos jardins, on trouve les tubercules de pomme de terre, qui peuvent redonner une plante entière, les fraisiers par les bourgeons sur leurs stolons, les oignons qui ont aussi des bourgeons dans leur bulbe... Ainsi, la nature utilise le clonage chez beaucoup d'espèces végétales afin d'assurer une propagation rapide en dehors du système de reproduction sexuée.

Les jardiniers, les agriculteurs copient depuis longtemps la nature: déjà dans l'Antiquité les cépages utilisés par les Grecs et les Romains étaient des clones. Et chaque fois qu'une personne fait des boutures avec ses plantes, ou qu'un jardinier fait du marcottage ou du greffage, c'est du clonage.

Le clonage se fait classiquement à l'extérieur mais également dans des conditions entièrement contrôlées, en laboratoire et on parle alors de clonage par culture *in vitro*. Cette technique de culture *in vitro* permet facilement d'étudier les plantes et leur développement, d'éliminer des virus de certaines plantes (la pomme de terre « Belle de Fontenay » a été sauvée de cette façon en 1954), de produire des plantes qui ne se bouturent pas facilement (comme les orchidées), ou produire de très grandes quantités d'une plante très rapidement.

C'est cette technique de FCBA a développé pour produire des variétés FCBA d'eucalyptus résistantes au froid.

FCBA is breeding frost-tolerant eucalyptus adapted to continental French conditions for industrial biomass production, particularly for bioenergy and paper pulp production. The basis is the hybridization of special provenances selected from our own seed harvests in wild populations which are now mostly extinct. Only clonal propagation is able to deliver enough performance and suitable plant quantity, particularly because very specific genetic combinations are required while our varieties are poorly producing seeds. Efficient propagation of eucalyptus clones is optimized through the production of *in vitro* propagated plants which allow the recurrent renewal of stock plant used by commercial nurseries. This *in vitro* propagation proceeds through exponential multiplication under sterile conditions in the lab (tissue culture) then a rooting treatment provide just before the acclimatization of the plant material in a greenhouse just in time for the establishment of new stock plants ready for the optimal cutting production.

## MATÉRIEL

Pour se développer au laboratoire de culture *in vitro*, les plantes ont besoin d'un système complexe mis en œuvre par un technicien spécialisé. Ce système est composé d'une succession de milieux de culture, d'un système de repiquage, permettant de miniaturiser et d'accélérer la croissance des plantes, et d'un environnement de culture contrôlé.

## MILIEUX DE CULTURE

Les milieux de culture constituent le support physique et la base nutritive des plantes. Ils contiennent :

- ✓ De l'eau.
- ✓ Des éléments minéraux : potassium, azote, magnésium, manganèse, phosphore, bore, iode, zinc, etc...
- ✓ Du Fer : il forme le noyau de la molécule de chlorophylle.
- ✓ Des vitamines.

- ✓ Du sucre : la culture confinée et la lumière artificielle ne permettent pas une photosynthèse suffisante, ce qui conduit à un manque de production de sucre par la plante. Il doit alors être compensé par un apport artificiel.
- ✓ Des hormones : il s'agit de substances chimiques organiques qui régulent la croissance végétale. Elles sont naturellement fabriquées par la plante selon ses besoins. En laboratoire, on agit sur les plantes par les hormones pour les faire s'allonger, bourgeonner ou s'enraciner.
- ✓ Un support pour les plantes : souvent un géliant, parfois un support cellulosique.

Une fois complet, le milieu est ajusté à un pH correspondant aux préférences des plantes (généralement proche de 5,7), puis stérilisé à l'autoclave. En effet, en raison du fort pouvoir nutritionnel de ces milieux, les bactéries et les moisissures s'y développent facilement si les conditions d'asepsie ne sont pas respectées.

Avant ou après stérilisation, le milieu de culture est coulé dans les conteneurs où vivront les plantes pendant plusieurs semaines : tubes à essais, bocaux en verre, boîtes de Petri stériles, boîtes plastiques stériles.



Photo 1 : équipement de coulage automatique de milieu de culture en boîtes de Petri, de l'autoclave (à droite) au distributeur (à gauche) (photo ©FCBA)

## MATÉRIEL DE REPIQUAGE

Afin de travailler dans les meilleures conditions possibles stérilement, il est nécessaire de s'équiper de :

- ✓ une hotte à flux laminaire.
- ✓ de pinces et scalpels (instruments).
- ✓ un stérilisateur à instruments.

La hotte à flux laminaire induit un espace de travail stérile en envoyant de l'air à travers un filtre absolu, qui débarrassera l'air de toutes les particules, entre autres bactéries et spores de moisissures.

Les pinces et les scalpels permettent le découpage des plantes. Le matériel de chirurgie permet une découpe très nette des plantules en limitant les déchirures.

De plus, il se stérilise facilement à l'aide d'un stérilisateur à billes de verre chauffées à 250°C.



Photo 2 : plan de travail sous hotte à flux laminaire (photo ©FCBA)



Photo 3 : gros plan sur les instruments de dissection et le stérilisateur (photo ©FCBA)

## CHAMBRES DE CULTURE

Les plantules vont se développer dans des pièces équipées d'étagères aux conditions contrôlées pour la lumière (qualité, quantité et durée) et la température : ce sont les chambres de culture. Elles doivent permettre d'adapter ces conditions aux exigences de chacune des phases de la production des plants *in vitro*. Ces exigences peuvent varier selon les espèces et les variétés (cf. photos 10 et 11).

Pour le type de plantes travaillées à FCBA, nous maintenons la température de ces pièces à 23-24°C. Dans le cas des chambres lumineuses, la durée est de 16 heures de jour pour 8 heures de nuit.

## MISE EN PLACE D'UNE CULTURE *IN VITRO*

Un moment essentiel et très délicat est le transfert des plantes de l'extérieur vers la culture *in vitro*. Il est délicat pour plusieurs raisons :

- ✓ Le milieu extérieur contient de nombreux germes dont il faudra nécessairement se débarrasser car sinon ils accapareraient tous les nutriments prévus pour la plante.
- ✓ La plante vivant à l'air libre sous le soleil, le vent et la pluie, en étant bien enracinée dans le sol ne supportera pas forcément de vivre « les pieds » dans la gélose, en atmosphère très confinée et stable, et sous une lumière artificielle (néons).

## TRANSFERT *IN VITRO*

### • Préparation des plantes initiales

Il faut commencer par tailler l'arbre initial (cultivé en forêt ou en pépinière) pour produire des jeunes pousses vigoureuses qui garantiront une réactivité suffisante. Ces pousses sont ensuite prélevées et transportées au laboratoire.

### • En laboratoire : désinfection

La désinfection permet de débarrasser les pousses initiales des insectes, acariens, bactéries et champignons avant le transfert en conditions stériles :

- ✓ Les boutures passent dans un 1<sup>er</sup> bain (eau et quelques gouttes de détergent), dans lequel elles sont agitées

vigoureusement pour détacher les impuretés et insectes divers.

- ✓ Elles subissent ensuite un passage de quelques secondes dans de l'alcool à 70°.
- ✓ Un 3<sup>e</sup> bain d'une dizaine de minutes sous agitation, dans de l'eau et de la Javel à 1% de chlore actif.
- ✓ . A l'issue de chacun de ces traitements, les pousses sont rincées à l'eau stérile afin d'éliminer les résidus nocifs des désinfectants.

## PRÉLÈVEMENT DES EXPLANTS

L'explant est un fragment d'organe ou de tissu prélevé sur une plante sélectionnée et conservé *in vitro* en vue de multiplications végétatives ultérieures.

La partie de la plante qui nous intéresse est le méristème. Il s'agit d'un tissu spécialisé dans la production de nouvelles cellules qui constitueront les nouvelles parties de la plante mises en place lors de sa croissance en longueur au niveau de la tige, des feuilles et des racines. Chez les végétaux, les méristèmes permettent une croissance infinie. On le trouve à l'extrémité de chaque tige (apex : photos 4 et 5) et dans tous les bourgeons (nœuds : photo 6).

Les explants sont prélevés après avoir éliminé les parties comme les tiges et les feuilles et déposés sur la gélose. Ces parties se nécroseront inutilement, et peuvent être un réservoir de contaminants. Les apex étant très délicats à prélever, la méthode par les nœuds est privilégiée au labo.



Photos 4 et 5 : apex d'eucalyptus (longueur 0,5 mm) avant et après prélèvement au scalpel (photo ©FCBA 2007).

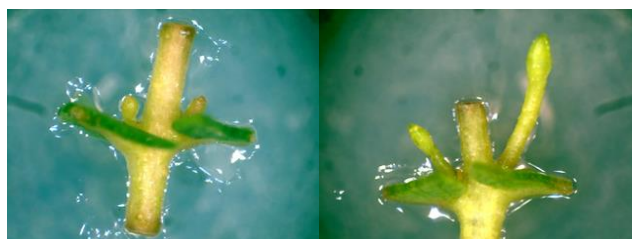


Photo 6 : Exemple de nœuds prélevés, avec développement plus ou moins important des bourgeons à l'aisselle des feuilles (photo ©FCBA)

## RÉACTIVATION

Les contaminations microbiennes éventuelles (moisissures et bactéries) sont surveillées très attentivement afin de récupérer les explants sains en les transférant sur du milieu neuf.

Cette phase de réactivation dure de 2 à 4 mois selon la capacité du clone à réagir aux techniques de culture *in vitro*.

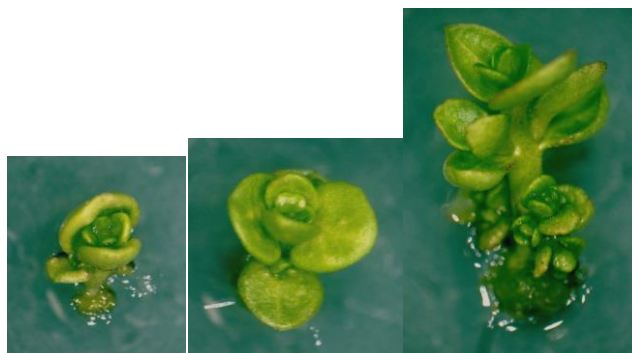


Photo 7 : Évolution morphologique des explants en début de croissance et bourgeonnement après 1,5 mois de culture, de 5 à 15 mm (photo ©FCBA, 2017)

## REPIQUAGE *IN VITRO*

Le repiquage consiste à transférer la plantule sur un milieu de culture neuf, identique au précédent. La plantule est coupée afin de réduire sa masse, ce qui induit dans les jours suivants une multiplication accrue.

La plantule se présente sous la forme d'un explant ramifié regroupant plusieurs tigelles et de nombreux bourgeons actifs, qui démarrent tous d'un cal basal. La séparation se fait en coupant transversalement pour obtenir deux moitiés de la touffe de départ.

Le développement est très rapide, les plantules peuvent de nouveau être repiquées après 2 semaines de culture.

Le nombre de boîtes obtenues après repiquage nous donne le taux de multiplication, correspondant ainsi à la quantité de matière produite par la plante en une sous-culture. Chaque clone a son propre taux de multiplication. Nous avons pu ainsi relever des taux allant de 1,1 à 2,5.

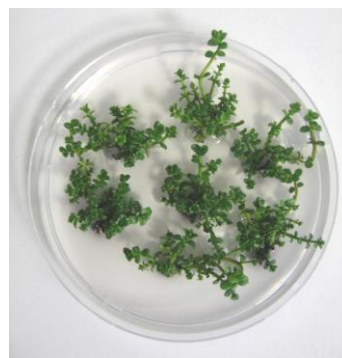


Photo 8 : Une boîte de culture d'eucalyptus (diamètre 9 cm) à la fin d'un cycle de multiplication (photo ©FCBA 2017)



Photo 9 : Boîtes d'eucalyptus issues du repiquage de la boîte présentée en photo 8 (photo ©FCBA 2017)



Hors production de l'Eucalyptus pendant laquelle le nombre de boîtes est augmenté, le stock est conservé à l'identique, soit 2 boîtes par clone afin de pouvoir répondre rapidement à tout besoin de plantes.

## PRODUCTION

### MISE EN PLACE DE LA PRODUCTION

La préparation de la production s'appuie sur :

- ✓ La quantité de plantes demandées
- ✓ La date prévue pour la livraison
- ✓ Le ou les clones choisis pour la production

Ces données nous permettront d'établir automatiquement un planning, qui nous donnera en outre le nombre de personnes qui travailleront chaque semaine et la quantité de boîtes à obtenir et donc la quantité de milieux de culture à préparer.

Nous avons établi des scénarios au fil des années en fonction de l'état des clones. Les données qui varient dans ce cas seront :

- ✓ Le taux de multiplication.
- ✓ Le taux d'enracinement.
- ✓ Le taux d'acclimatation.
- ✓ Le taux de survie pendant l'élevage.

Nous pouvons établir maintenant une fourchette. C'est ainsi que pour un de nos clones phare, le scénario moyen est de 30% de plants acclimatés et élevés, le favorable de 47% et le défavorable de 17%.

### AMPLIFICATION PAR MULTIPLICATION EXPONENTIELLE

Elle permet de passer d'une boîte de plantules à plusieurs milliers. En commençant avec 1 boîte, 10 repiquages après nous en avons plus de 1 000, et donc 20 000 tigelles potentielles pour mettre en enracinement.

La multiplication se fera en fonction du coefficient de multiplication de chaque clone. En effet ce taux varie entre 1,1 et 2,5 selon le stade d'adaptation de la plante aux conditions de culture (et réciproquement).

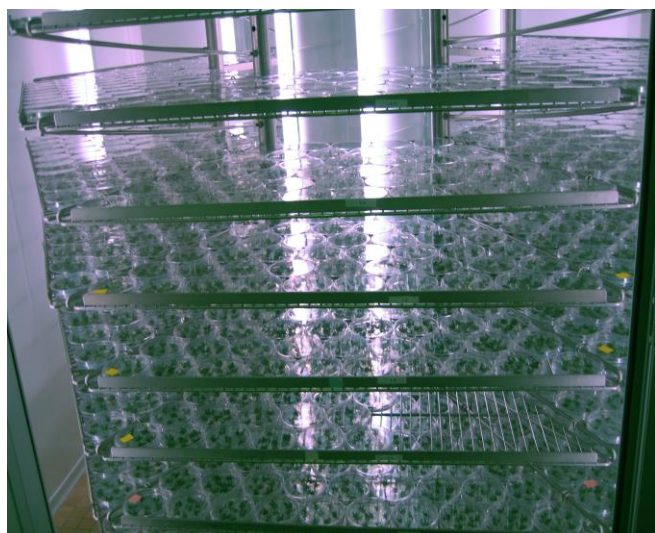


Photo 10 : chambre de culture rotative® remplie de boîtes de multiplication pour la production d'eucalyptus en 2005 (photo ©FCBA)

## RHIZOGENÈSE *IN VITRO*

L'enracinement *in vitro*, aussi appelé rhizogenèse *in vitro*, se fait en 2 phases :

- ✓ L'induction, qui est l'application à l'obscurité.
- ✓ L'expression à la lumière.

### • Induction de l'enracinement

Les tigelles obtenues sont séparées les unes des autres et sont mises dans un milieu de culture contenant une hormone de la catégorie des auxines : l'acide indole-butérique (AIB). Elle est connue des jardiniers sous le terme d'hormone de bouturage. L'AIB agit sur la multiplication des cellules et va induire la formation des racines.

L'AIB étant réputé sensible à la lumière, la culture des tigelles se passe à l'obscurité

En fonction de la réactivité des plantes, la phase d'induction dure de 7 à 9 jours.

### • Expression de l'enracinement

L'AIB génère des cals sur les feuilles même à faible dose, certains clones réagissant plus mal que d'autres. Il est donc nécessaire de le supprimer du milieu de culture, en transférant les tigelles sur un milieu neuf contenant du charbon.

Le charbon actif est un matériau constitué essentiellement de matière carbonée à structure poreuse. Il a la propriété de fixer et de retenir certaines molécules amenées à son contact par adsorption (phénomène de fixation par liaisons faibles de molécules diverses). Dans ce cas, l'AIB restant au niveau des plantules sera adsorbé par le charbon actif et ne pourra plus agir négativement sur les plantes.

Pendant la phase d'expression, les plantules vont développer leurs racines puis s'allonger.



Photo 11 : chambre de culture remplie de boîtes d'enracinement pour la production d'eucalyptus en 2012-2013 (photo ©FCBA)

## TRANSFERT *EX VITRO*

Après 4 à 5 semaines de sous-culture, les plantules sont sorties de culture *in vitro* pour être mises en serre. La plante, après avoir vécu dans un milieu confiné, avec une nutrition complète sans effort, et en conditions stériles sans action des microorganismes, doit passer à l'extérieur et faire face maintenant aux conditions naturelles.



Le principe va être de mettre progressivement la plante dans des volumes de plus en plus grands :

- ✓ un compartiment de culture confinée (culture à l'étouffée).
- ✓ une serre.
- ✓ le plein air (pépinière puis plantation).

## • Acclimatation

Les boîtes sont ouvertes au fur et à mesure pour trier les tigelles présentant un système racinaire développé (minimum 1 racine) et ayant une longueur (partie aérienne) supérieure à 20 mm. Les tigelles sont trempées dans une solution fongicide pour limiter l'impact des microorganismes.

Les racines trop longues sont raccourcies à l'aide d'un scalpel ou de ciseaux. Puis les tigelles sont repiquées dans des mottes de tourbe humidifiées.

Les plateaux sont mis sous une bâche permettant de les maintenir en atmosphère confinée, à 20°C, avec une hygrométrie proche de 100% et une durée de lumière ajustée à 16 heures, grâce à un éclairage supplémentaire.



Photo 12 : Tigelles enracinées au moment de l'acclimatation (photo ©FCBA)



Photo 13 : plants en acclimatation à l'étouffée (production 2009/©FCBA)

## • Élevage

La bâche de confinement est levée progressivement dès l'apparition de nouvelles feuilles ou si les racines dépassent la motte, soit au bout de deux semaines.

Il faudra 2 mois d'élevage en serre pour obtenir des plants transférables chez le pépiniériste.

C'est la date de livraison des plants élevés qui décide principalement du planning. Ainsi, pour une campagne de bouturage se passant au printemps, il sera nécessaire de commencer la production à la fin de l'été précédent, l'enracinement en décembre, et l'acclimatation en janvier pour obtenir des plants utilisables fin mars ou début avril.

Ce qui implique que le développement des plantules à la sortie du laboratoire se fasse en hiver, avec peu de luminosité et du froid. La serre devra donc fournir ce qui est nécessaire pour assurer le bon développement des plants : une température modérée et une bonne quantité de lumière, un bon arrosage doublé de fertilisation, ainsi qu'une protection phytosanitaire.



Photo 14 : plants d'Eucalyptus après la sortie du confinement



Photo 15 : plants d'eucalyptus après 2 mois d'élevage



Photo 16 : plants d'eucalyptus arrivés chez le pépiniériste

## LIMITES

Néanmoins la production *in vitro* a ses limites:

- ✓ Elle est onéreuse, tant par la main d'œuvre que la quantité de matériel utilisé.
- ✓ Elle demande du personnel qualifié et entraîné, la manipulation étant très méticuleuse.
- ✓ La quantité de matériel végétal mise en œuvre augmente fortement au cours de la multiplication avec un impact considérable sur les besoins en main d'œuvre, en espace de culture et en fournitures.

À FCBA, elle est utilisée aujourd'hui afin de renouveler les pieds-mères à partir desquelles les pépinières produisent efficacement des boutures, la culture *in vitro* permet une multiplication saisonnière très rapide de plants de très haute qualité et vigueur destinées à une livraison au début du printemps (une bouture d'eucalyptus donnera 10 à 40 boutures en 1 an en pépinière, mais potentiellement 8 millions en culture *in vitro*).

## Pour en savoir plus

Plateforme Xylobiotech coordonnée par FCBA :  
<http://biotech.xyloforest.org/>

Etude réalisée en partenariat avec



Avec le soutien financier de

## Contacts

Isabelle REYMOND ● [isabelle.reymond@fcb.fr](mailto:isabelle.reymond@fcb.fr)  
Francis CANLET ● [francis.canlet@fcb.fr](mailto:francis.canlet@fcb.fr)  
Luc HARVENGT

Pôle Biotechnologie Sylviculture Avancée  
Équipe Génétique et Biotechnologie  
71 route d'Arcachon, Pierroton,  
33610 Cestas  
Tél. 05 56 79 95 00

