



HAL
open science

Effects of cold hardening on cryopreservation of axillary pear (*Pyrus communis* L., cv Beurré Hardy) shoot tips of in vitro plantlets

Michel Duron, Jean Dereuddre, Cécile Scottez, Yolande Arnaud

► To cite this version:

Michel Duron, Jean Dereuddre, Cécile Scottez, Yolande Arnaud. Effects of cold hardening on cryopreservation of axillary pear (*Pyrus communis* L., cv Beurré Hardy) shoot tips of in vitro plantlets. Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie, 1990, pp.265-272. hal-02713596

HAL Id: hal-02713596

<https://hal.inrae.fr/hal-02713596v1>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Effets d'un durcissement au froid des vitroplants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy) sur la résistance des apex axillaires à une congélation dans l'azote liquide

Jean DEREUDDRE, Cécile SCOTTEZ, Yolande ARNAUD et Michel DURON

Résumé – Un durcissement à 0°C des vitroplants non enracinés de Poirier (cv Beurré Hardy) pendant 3 à 8 semaines est nécessaire pour obtenir un taux de reprise important des apex congelés dans l'azote liquide. Le protocole utilisé comporte une préculture sur 0,75 M de saccharose, une imprégnation avec 15 % de diméthylsulfoxyde, un prérefroidissement progressif jusqu'à -30 ou -40°C, une congélation dans l'azote liquide et un réchauffement rapide. Les taux de reprise obtenus après un prérefroidissement à -30°C sont supérieurs à ceux obtenus après un prérefroidissement à -40°C. L'acquisition de la résistance est progressive.

Effects of cold hardening on cryopreservation of axillary pear (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy) shoot tips of *in vitro* plantlets

Abstract – Pear axillary shoot tips obtained from *in vitro* plantlets survived after freezing in liquid nitrogen. The resistance of shoot tips was strongly enhanced by cold treatment of *in vitro* plantlets at 0°C for 3 to 8 weeks. After preculture on medium containing 0.75 M sucrose and incubation with 15% dimethylsulfoxide, the apices were cooled progressively (0.5°C.min⁻¹) to -30 or -40°C before being immersed in liquid nitrogen. After rapid rewarming, the percentage of surviving apices was higher after prefreezing at -30°C than at -40°C. Resistance to liquid nitrogen increased with the duration of cold hardening.

Abridged English Version – Germplasm of cultivars of pear and apple trees can be preserved by relatively costly field collection of material which may be exposed to several pathogens such as *Erwinia amylovora* (B.) W. *In vitro* methods [1] can also be used, but only storage at ultra-low temperature (in liquid nitrogen) can ensure long-term preservation of material under conditions of good genetic and physiological stability. In the storage of genotypes of pear and apple trees, cryopreservation of meristems appears to be a useful tool if regrowth occurs by reactivation of the apical dome, and avoids adventitious organogenesis from callus.

This paper describes cryopreservation of axillary shoot tips from *in vitro* propagated pear plantlets.

In vitro culture of *Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy plantlets was initiated in 1985. For *in vitro* propagation, cuttings were taken from 4-week-old *in vitro* plantlets. Explants were cultured on medium containing the macroelements of Lepoivre, the composition of which is given by Quoirin *et al.* [2], the micronutrients of Murashige and Skoog [3], 6 g.l⁻¹ Difco Bacto agar, vitamins (0.55 mM meso-inositol, 1.2 mM thiamine HCl, 1.2 mM), 2.22 µM 6-benzylaminopurine and sucrose (0.088 M). The pH was adjusted to 5.6 before addition of agar. Cultures were kept in a chamber at a temperature of 23°C and relative

Note présentée par Alexis MOYSE.

humidity of about 65%, with a photoperiod of 16 h.day⁻¹ and an irradiance of 25-30 $\mu\text{moles PAR} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Hardening treatment was performed at 0°C, with the same conditions of illumination, for 1, 3, 6 or 8 weeks.

For cryopreservation, the basic technique was that described by Dereuddre *et al.* [4]. The media used throughout the cryopreservation process differed from standard cutting culture medium by the presence of nicotinic acid (4.06 mM), pyridoxine chlorhydrate (2.43 mM), glycine (5.33 mM) and cryoprotectants. Axillary apices consisting of the apical dome with a pair of leaf primordia, and measuring about 0.5 mm in length, were kept overnight on a solid preculture medium supplemented with sucrose (0.75 M) and were incubated for 2 hrs. in a medium containing 0.75 M sucrose and 15% dimethylsulfoxide. The tips were transferred into cryobiological ampoules, each containing 1 ml of cryoprotectant solution.

Samples were gradually cooled (0.5°C.min⁻¹) to -30 or -40°C and directly immersed in liquid nitrogen where they were stored for up to 3 days. After rapid thawing in a water bath at 40°C, the shoot tips were transferred onto the preculture medium and subcultured daily (3 days) on decreasing concentration of sucrose, until the concentration of 0.088 M was reached. Survival was defined as the presence in shoot tips of green tissues, 2 weeks after thawing. Regrowth was defined as recovery of normal shoot tip growth 8 weeks after thawing.

All control shoot tips subcultured on standard culture medium remained green and resumed growth in a few days by direct development of the apical dome. The proportion of surviving apices was 100%, and regrowth occurred in 82 to 95% of apices, whatever the experiment.

When apices were excised from unhardened *in vitro* plantlets, survival and regrowth rates after freezing in liquid nitrogen were very low (0 to 2.5%), whatever the prefreezing temperature (-30 or -40°C).

When the shoot tips were excised from hardened plantlets, survival increased progressively with the duration of the treatment at low temperature (*Pl. I*, 1). From 2.5% with unhardened shoot tips, survival increased to 71% after 8 weeks of hardening when the prefreezing temperature was -30°C, and from 0 to 58% when apices were prefrozen at -40°C.

After freezing in liquid nitrogen, leaf primordia turned brown. Within the fifteen first days after thawing, reactivation of the meristematic dome led to differentiation of new primordia (*Pl. II*, 1 and 2) and subsequent formation of a shoot tip (*Pl. II*, 3). Further stages of development were elongation of the shoot axis (*Pl. II*, 4) and subsequent ramification (*Pl. II*, 5).

Regrowth (*Pl. II*, 2) increased progressively as a function of the duration of hardening whatever the prefreezing temperature (-30 or -40°C). With shoot tips prefrozen to -30°C and cooled in liquid nitrogen, regrowth increased from 2.5 to 13% after one week of hardening, and to 60% after 8 weeks. This increase was smaller when the shoot tips were prefrozen at -40°C: from 0% for unhardened shoot tips to 33% after 8 weeks of hardening.

In conclusion, survival and regrowth of axillary shoot tips after freezing in liquid nitrogen were improved by cold treatment of *in vitro* plantlets. This treatment can also preserve effectively plantlets through subcultures [5]. Cold treatment has been used for cryopreservation of shoot tips of several species such as carnation [6], raspberry [11], pear [12] and apple [13] and can be replaced by preculture in the presence of high concentrations of sucrose [4]. It would be interesting to know if, after hardening of vitroplants, sucrose or other cryoprotective compounds remain necessary for the resistance of pear shoot tips to liquid nitrogen, as in the case for shoot tips excised from buds in the rest period ([7]-[11]). Until

now, cryopreservation of shoot tips from hardened *in vitro* plantlets of apple trees has led to callus formation without regeneration [13].—The combination of hardening and high sucrose concentration allows direct regrowth of apical shoot tips.

INTRODUCTION. — La conservation des collections de pommiers et de poiriers est principalement réalisée en vergers. Ces collections sont périodiquement menacées par diverses maladies dont la plus dangereuse, « le feu bactérien », est causée par *Erwinia amylovora* (B.) W.

Pour ces espèces, la conservation des cultivars peut-être facilitée par l'introduction des souches en culture *in vitro* [1]. Cependant, seule une conservation des apex dans l'azote liquide (-196°C) peut permettre une stabilisation des souches pendant plusieurs dizaines d'années, donc le maintien des caractères phénotypiques et génétiques.

Cette Note présente les premiers résultats concernant la cryoconservation d'apex de vitroplants de Poirier cultivés *in vitro* suivie d'une reprise directe du fonctionnement apical.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — 1. *Culture*. — Les vitroplants de Poirier (*Pyrus communis* L. cv Beurré Hardy), ont été obtenus de la façon suivante : à la fin de janvier 1985, des bourgeons prélevés en verger ont été greffés sur des francs âgés de 1 an. 2 mois plus tard, des microboutures apicales de 1 à 2 cm ont été introduites *in vitro* sur le milieu contenant les macroéléments de Lepoivre dont la composition est donnée par Quoirin et coll. [2], les microéléments de Murashige et Skoog [3], de la gélose Difco Bacto agar (6 g.l^{-1}), des vitamines : méso-inositol (0,55 mM) et thiamine HCl (1,2 mM), de la 6-benzylaminopurine (2,22 μM) et du saccharose (0,088 M). Le pH est ajusté à 5,6 avant l'addition de la gélose. Pour la culture des apex, le milieu « apex » comporte en plus de l'acide nicotinique (4,06 mM), du chlorhydrate de pyridoxine (2,43 mM) et de la glycine (5,33 mM).

Les cultures, repiquées chaque mois, sont maintenues à 23°C en 16 h d'éclairage quotidien (25 à $30\ \mu\text{moles PAR.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). L'endurcissement des vitroplants est réalisé à 0°C , sous un éclairage similaire à celui des chambres de culture.

2. *Cryoconservation*. — Pour les expériences de cryoconservation, les apex sont prélevés sur des vitroplants non enracinés repiqués depuis 5 semaines (cas des apex non endurcis) ou sur des vitroplants repiqués depuis 4 semaines puis placés à 0°C pendant 1, 3, 6 ou 8 semaines (apex endurcis).

Les apex utilisés mesurent environ 0,5 mm; ils sont constitués du dôme apical et de deux ou trois ébauches foliaires. Le protocole utilisé est celui décrit pour les apex d'Éillet [4]. Il comporte une préculture (18 à 24 h, compte tenu du temps nécessaire au prélèvement des apex) sur le milieu « apex » enrichi en saccharose (0,75 M), une incubation de 2 h en milieu liquide, en présence de la même concentration en saccharose et de 15 % (v/v) de diméthylsulfoxyde. Les échantillons sont ensuite transférés dans les ampoules cryobiologiques contenant 1 ml de mélange cryoprotecteur puis refroidis progressivement de $0,5^{\circ}\text{C.mn}^{-1}$ jusqu'à -30 ou -40°C , avant d'être plongés dans l'azote liquide où ils sont conservés pendant 1 à 3 j. Ils sont ensuite réchauffés rapidement dans un bain-marie à 40°C et repiqués quotidiennement pendant 3 jours sur des milieux « apex » dont la concentration en saccharose est réduite progressivement jusqu'à la concentration standard de 0,088 M [4].

Deux paramètres ont été définis : le taux de survie et le taux de reprise; ils sont calculés par rapport au nombre d'apex mis en culture (26 à 80 selon les échantillons). Le taux de survie est le pourcentage d'apex verts obtenus 15 jours après le réchauffement; le taux de reprise est le pourcentage d'apex qui, après un repiquage supplémentaire 1 mois après le réchauffement, présentent un allongement de l'axe caulinaire.

RÉSULTATS. — Dans toutes les expériences, le taux de survie des apex témoins prélevés sur des vitroplants puis placés directement sur le milieu « apex » standard est de 100 % et le taux de reprise reste compris entre 82 et 95 %.

Après congélation dans l'azote liquide, lorsque les apex ont été prélevés sur des vitroplants non endurcis, les taux de survie et de reprise sont faibles (2,5 %) ou nuls, que la température de prérefroidissement soit de -30 ou de -40°C .

Le taux de survie augmente progressivement avec la durée de l'endurcissement des vitroplants (*pl. I*, 1). Après un prérefroidissement à -30°C , il est de 2,5 % pour les témoins non endurcis; il augmente d'abord rapidement et atteint 58 % après 3 semaines de traitement au froid, puis plus lentement : après 8 semaines de traitement au froid des vitroplants, le taux de survie atteint 71 %. Une évolution similaire est observée avec les apex prérefroidis jusqu'à -40°C : nul pour les apex non endurcis, le taux de survie atteint respectivement 53 et 58 % après 3 et 8 semaines d'endurcissement.

Après congélation dans l'azote liquide, les ébauches foliaires et la base de l'apex brunissent. Entre 7 et 15 jours après le réchauffement, la réactivation du dôme apical se caractérise par la différenciation de nouveaux primordiums et l'absence de cal (*pl. II*, 1 et 2), la formation d'une rosette de feuilles (*pl. II*, 3), puis l'allongement et la ramification des explants (*pl. II*, 4 et 5).

Le taux de reprise (*pl. I*, 2) augmente régulièrement en fonction de la durée de l'endurcissement, quelle que soit la température de prérefroidissement (-30 ou -40°C). Égal à 2,5 %, pour les apex non endurcis congelés à -196°C après un prérefroidissement à -30°C , il atteint 13 % après la première semaine d'endurcissement et 60 % après la 8^e semaine. Cette progression est plus faible pour les apex prérefroidis à -40°C : nul pour les apex non endurcis, le taux de reprise atteint 9 % après 1 semaine et 33 % après 8 semaines d'endurcissement.

EXPLICATIONS DES PLANCHES

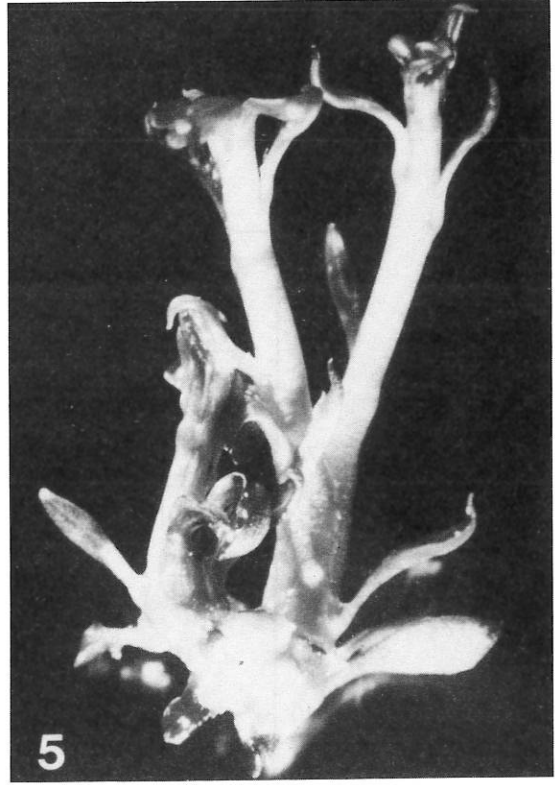
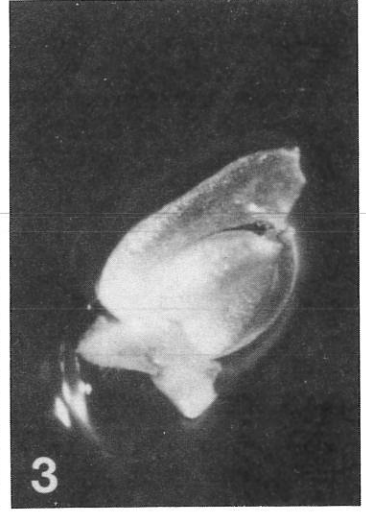
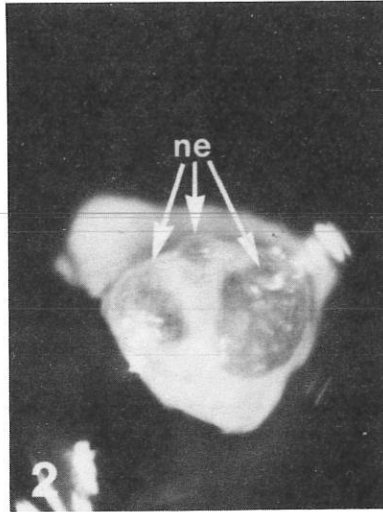
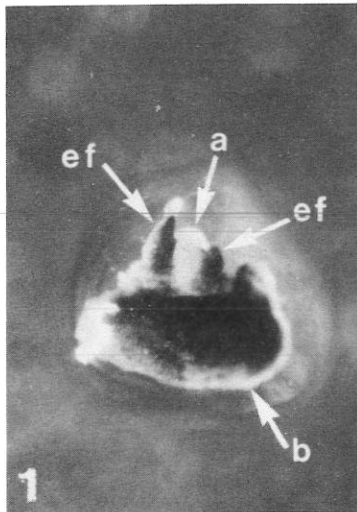
Planche I

Fig. 1. — Effet de la durée d'endurcissement des vitroplants sur le taux de survie des apex congelés dans l'azote liquide après un prérefroidissement à -30°C (●) ou -40°C (○). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance et les chiffres en italique, le nombre d'apex traités. (Δ), apex témoins.

Fig. 1. — Percentage survival rates of shoot tips prefrozen to -30 (●) or -40°C (○) and stored in liquid nitrogen as a function of the duration of cold treatment of in vitro plantlets. Vertical bars represent the confidence interval and italicised numbers indicate sample size. (Δ), control shoot tips.

Fig. 2. — Effet de la durée d'endurcissement des vitroplants sur le taux de reprise des apex congelés dans l'azote liquide après un prérefroidissement à -30°C (●) ou -40°C (○). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance et les chiffres en italique, le nombre d'apex traités. (Δ), apex témoins.

Fig. 2. — Percentage regrowth rates of shoot tips prefrozen to -30 (●) or -40°C (○) and stored in liquid nitrogen as a function of the duration of cold treatment of in vitro plantlets. Vertical bars represent the confidence interval and italicised numbers indicate sample size. (Δ), control shoot tips.



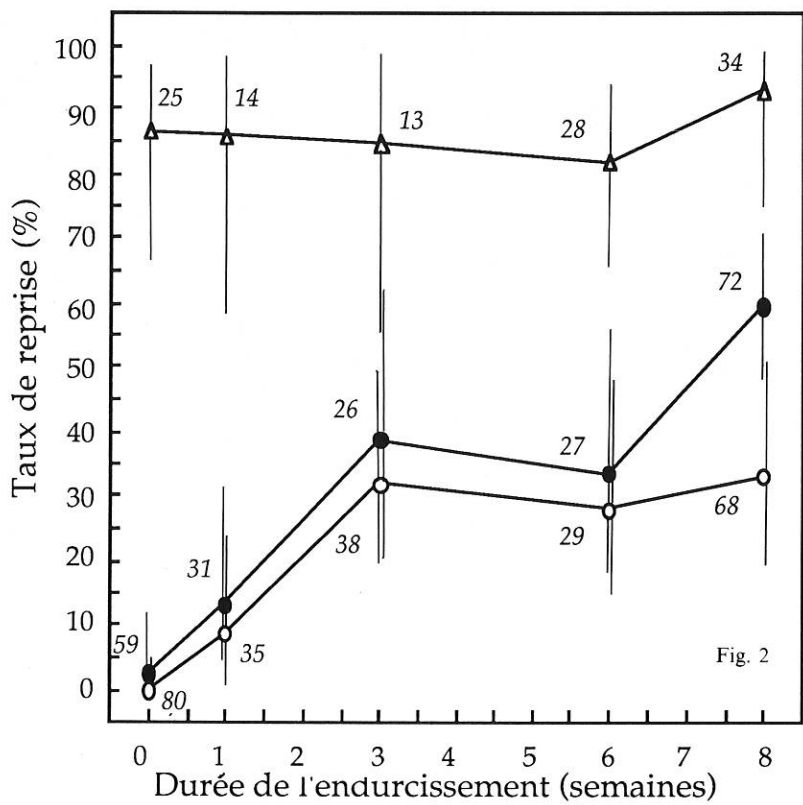
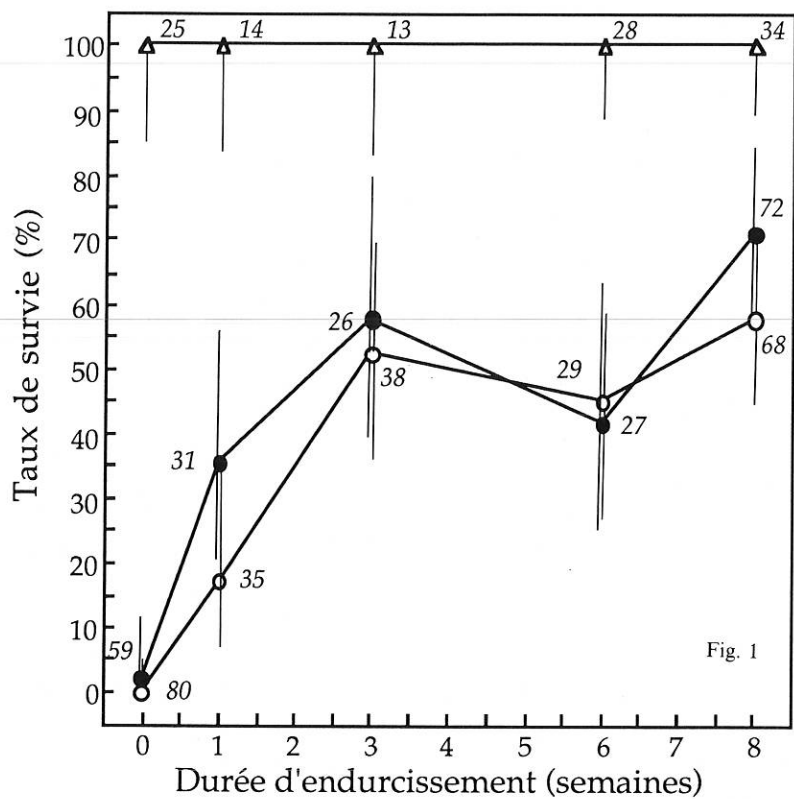


Planche II

Développement d'apex prélevés sur des vitroplants endurcis par 8 semaines à 0°C, prérefroidis à -30°C et congelés à -196°C. 1 et 2 : Développement de la partie apicale (*a*), 15 jours après le réchauffement, alors que les ébauches foliaires préexistantes (*ef*) ainsi que la base tissulaire (*b*) meurent. (1 : G × 35). De nouvelles ébauches foliaires (*ne*) apparaissent (2 : G × 45). 3 : formation d'une rosette de feuilles 20 jours après le réchauffement (G × 20). 4 et 5 : début d'allongement (4 : G × 15) et ramification de l'axe caulinaire (5 : G × 10), 35 jours après le réchauffement.

Development of shoot tips excised from 8 week-hardened in vitro plantlets, prefrozen to -30°C and stored in liquid nitrogen. 1 and 2: 15 days after thawing, the apex (a) resumed growth, whereas primordial leaves (ef) and the base (b) of the explant were killed (1: M × 35). New primordial leaves (ne) differentiated (2: M × 45). 3: Bud formation 20 days after thawing, just before the start of elongation (M × 20). 4 and 5: Beginning of elongation (4: M × 15) and ramification (5: M × 10), 35 days after thawing.

DISCUSSION. — Il est bien connu que le développement des pommiers et des poiriers *in situ* est fortement perturbé en l'absence de froid. En outre, des séjours au froid peuvent être bénéfiques pour conserver la vigueur des vitroplants [5]. Un tel traitement a un effet favorable sur les apex axillaires de poirier qui acquièrent ainsi une résistance à la congélation dans l'azote liquide.

Le froid non gelant a été utilisé chez l'Œillet [6] pour accroître la résistance des apex. Chez cette espèce [4], le traitement des plantes au froid peut être remplacé par une préculture des apex en présence de fortes concentrations de saccharose (0,75 M), ce qui n'est pas le cas chez le Poirier.

Chez les arbres et arbustes fruitiers résistants aux fortes gelées (Poirier, Pommier, Framboisier), les apex prélevés sur des rameaux en période de repos végétatif peuvent résister à un refroidissement jusqu'à -196°C sans utilisation de concentrations élevées de saccharose ([7]-[11]). Lorsque les plantes sont cultivées *in vitro*, un traitement préalable des vitroplants au froid (-1 à +4°C) est nécessaire ([11]-[13]). Avec le cv de Poirier Beurré Hardy, l'acquisition de la résistance à l'azote liquide est progressive. Il serait intéressant de savoir si, après endurcissement des vitroplants, le sucre demeure nécessaire à la résistance des apex à l'azote liquide, comme dans le cas des apex prélevés sur des rameaux en période hivernale.

Si, chez le Framboisier [11] et le Poirier, la reprise du fonctionnement apical a été obtenue, chez le Pommier, au contraire, les apex traités par l'azote liquide ne forment que des calcs [13]. Des recherches complémentaires sont donc nécessaires afin d'augmenter la taille de l'explant capable de résister au traitement et ainsi faciliter la cryoconservation d'espèces ou de cultivars dont la reprise des apex est difficile.

Ce travail bénéficie d'une aide du Ministère de la Recherche (aide n° 88 R 0751).

Note remise le 23 octobre 1989, acceptée après révision le 24 janvier 1990.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] K. AL MAARRI, M. DURON, Y. ARNAUD et E. MIGINIAC, *C.R. Acad. Agric., France*, 72, 1986, p. 413-421.
- [2] M. QUOIRIN, Ph. LEPOIVRE et Ph. BOXUS, *Compte rendu des Recherches*, Gembloux, Belgique, 1977, p. 93-117.
- [3] T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plantarum*, 15, 1962, p. 473-497.
- [4] J. DEREUDDRE, J. FABRE et C. BASSAGLIA, *Plant Cell Reports*, 7, 1988, p. 170-173.

-
- [5] K. AL MAARRI, *Thèse Doct.*, Univers. Pierre-et-Marie-Curie, 1986, 156 p.
[6] M. SEIBERT, *Science*, 191, 1976, p. 1178-1179.
[7] M. KATANO, A. ISHIWARA et A. SAKAI, *HortScience*, 18, 1983, p. 707-708.
[8] T. MORIGUCHI, T. AKIHAMA et I. KOSAKI, *Japan J. Breed.*, 35, 1985, p. 169-199.
[9] A. SAKAI et Y. NISHIYAMA, *HortScience*, 13, 1978, p. 225-227.
[10] N. J. TYLER et C. STUSHNOFF, *Can. J. Plant Sci.*, 68, 1988, p. 1163-1167.
[11] B. M. REED, *Cryo-Letters*, 9, 1988, p. 166-167.
[12] B. M. REED, *Plant Physiol.*, 86, 1988, p. 52.
[13] C. C. KUO et R. S. LINEBERGER, *HortScience*, 20, 1985, p. 764-767.

J. D. et C. S. : *Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux après Récolte*,
C.N.R.S., 4 ter, route des Gardes, 92190 Meudon
et *Laboratoire de Cryobiologie végétale*,
Université Pierre-et-Marie-Curie, 12, rue Cuvier, 75230 Paris Cedex 05;

C. S. et Y. A. : *Laboratoire de Physiologie du Développement des Plantes*,
Université Pierre-et-Marie-Curie, 4, place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05;

M. D. : *I.N.R.A., Station d'Amélioration des Espèces fruitières et ornementales*, 49070 Beaucoz
et *Laboratoire de Recherches de Physiologie végétale de l'Association selon la Loi de 1901*,
dépendant du Conseil général du Maine-et-Loire.
