



Agence
universitaire
de la
Francophonie

Biotechnologies végétales

Techniques de laboratoire

Robert Haicour, coordonnateur



Editions
TEC
& **DOC**

Table des matières

Avant-propos	V
Préface.....	VII

Chapitre 1

Multiplication de plantes herbacées <i>in vitro</i>	1
1. Aspects fondamentaux	1
2. Partie expérimentale	4
2.1. Équipement nécessaire à l'expérimentation	4
2.2. Matériel biologique	5
2.3. Matériels nécessaires	6
2.4. Confection et condition de stockage des solutions et milieux de culture.....	8
3. Protocole expérimental	10
4. Références bibliographiques.....	12
5. Liste des fournisseurs	14
6. Annexes techniques et notes pratiques	14

Chapitre 2

Multiplication <i>in vitro</i> d'espèces ligneuses – Cas du <i>Sequoiadendron giganteum</i> Buchholz	17
1. Aspects fondamentaux	17
2. Partie expérimentale	20
2.1. Matériel végétal	20
2.2. Équipements et matériels de laboratoire requis	20
2.2.1. Agencement intérieur	20
2.2.2. Matériels et équipements de laboratoire	21
2.2.3. Milieux de culture	23
3. Protocole expérimental	25
3.1. Microgreffage	25

3.2. Culture de méristèmes	26
3.3. Microbouturage	26
3.4. Mise en œuvre pour l'analyse de la réactivité <i>in vitro</i> du matériel végétal	29
4. Références bibliographiques.....	29
5. Liste des fournisseurs	30

Chapitre 3

Établissement et entretien de cultures <i>in vitro</i> axéniques de plantes « inférieures » aquatiques	31
1. Aspects fondamentaux	31
1.1. Intérêts des plantes aquatiques	31
1.1.1. Intérêt théorique pour la mise en place d'un enseignement de travaux dirigés / travaux pratiques	31
1.1.2. Intérêt fondamental et appliqué.....	34
1.2. Historique des méthodes et milieux de culture	36
2. Partie expérimentale	37
2.1. Inventaire du matériel nécessaire à l'expérimentation.....	37
2.2. Matériel biologique	37
2.2.1. Classification	38
2.2.2. Récolte du matériel végétal et transport.....	41
2.3. Équipement et matériels nécessaires	43
2.3.1. Contenants	43
2.3.2. Bouchons	43
2.3.3. Autoclave.....	44
2.3.4. Chambre de culture	44
2.3.5. Agitation des cultures	45
2.4. Préparations et conditions de stockage des milieux de culture.....	46
2.4.1. Principaux types de milieux de culture : milieux enrichis et milieux artificiels.....	46
2.4.2. Préparation des milieux de culture.....	47
2.4.3. Composition de milieux de culture	48
2.4.3.1. Milieu enrichi de culture LC pour les algues d'eau douce (sauf euglènes)	48
2.4.3.2. Milieu de culture B.B. pour les algues d'eau douce	49
2.4.3.3. Milieu de culture SSI pour les algues marines	49
2.4.3.4. Milieu de Forsberg pour les Charophycées	50
3. Protocole expérimental	51
3.1. Isolement et axénisation	51
3.1.1. Algues d'eau douce	51
3.1.2. Algues d'eau de mer.....	51
3.1.3. Characées.....	52
3.1.4. Axénisation.....	53
3.2. Protocole général de repiquage	55
3.2.1. Particularité des micro-algues d'eau douce.....	55
3.2.2. Particularités de l'algue marine <i>Sphacelaria</i> sp.....	56
3.2.3. Particularité des Characées.....	56

3.3.	Préparation, obtention et culture de protoplastes	57
3.3.1.	Préparation du matériel	57
3.3.2.	Obtention des protoplastes	57
3.3.2.1.	Traitement enzymatique	57
3.3.2.2.	Purification des protoplastes	58
3.3.2.3.	Rendement en protoplastes	58
3.3.2.4.	Mise en culture des protoplastes	58
3.3.2.5.	Mesure de la taille des protoplastes	59
3.3.2.6.	Formation de la paroi	59
3.3.2.7.	Suivi de développement	59
4.	Références bibliographiques.....	60
5.	Listes des fournisseurs.....	64
5.1.	Fournisseurs de souches.....	64
5.2.	Fournisseur d'eau de mer et d'algues marines pour l'enseignement.....	64
5.3.	Fournisseurs de matériel de laboratoire et de produits chimiques	64
6.	Annexes techniques et notes pratiques	65
6.1.	Annexe 1 : Solutions pour la digestion pariétale et l'isolement des protoplastes.....	65
6.1.1.	Solution enzymatique.....	65
6.1.2.	Solutions de rinçages.....	65
6.1.2.1.	Solution de rinçage selon les travaux de Mejjad	65
6.1.2.2.	Solution de rinçage modifiée	65
6.1.3.	Solution de culture	66
6.2.	Annexe 2.....	66
6.2.1.	Formule appliquée pour calculer le rendement en protoplastes	66
6.2.2.	Taux de survie et de division.....	66

Chapitre 4

Microtubérisation	67	
1.	Aspects fondamentaux.....	67
2.	Partie expérimentale	68
2.1.	Inventaire détaillé de l'équipement nécessaire à l'expérimentation	68
2.2.	Matériel biologique	68
2.3.	Matériel nécessaire à l'expérimentation.....	69
2.4.	Confection et condition de stockage des milieux de culture	70
2.4.1.	Composition et préparation des solutions et des milieux de culture ..	71
2.4.2.	Préparation des solutions mères.....	71
2.4.3.	Composition pour 1 litre de milieu	71
2.4.4.	Préparation des divers milieux	72
2.4.5.	Stockage des milieux.....	74
3.	Protocole expérimental	74
3.1.	Méthode A	74
3.2.	Méthode B	76
3.3.	Méthode C	76
4.	Références bibliographiques.....	77

5. Liste des fournisseurs	79
6. Annexes techniques et notes pratiques	81

Chapitre 5

Établissement de suspensions cellulaires embryogènes de riz <i>Oryza sativa L. japonica</i>	83
1. Aspects fondamentaux	83
2. Matériel et méthodes	89
2.1. Matériel nécessaire à l'expérimentation.....	89
2.2. Matériel végétal.....	90
2.3. Confection et stockage des solutions et des milieux de culture.....	90
2.3.1. Solutions-mères	90
2.3.2. Préparation des milieux	91
3. Protocole expérimental	91
3.1. Induction de cals à partir d'embryons matures	91
3.2. Établissement de suspensions cellulaires	92
4. Références bibliographiques.....	95
5. Liste des fournisseurs	98
6. Annexes techniques et notes pratiques	100
6.1. Annexes techniques	100
6.2. Notes pratiques	104

Chapitre 6

Cryoconservation	105
1. Aspects fondamentaux	105
1.1. Définition et domaines d'utilisation.....	105
1.2. Principes	106
1.3. Techniques	106
2. Partie expérimentale	107
2.1. Matériel végétal.....	107
2.2. Équipements et consommables	107
2.2.1. Équipement de laboratoire et de paillasse.....	107
2.2.2. Verrerie	107
2.2.3. Outils de dissection	108
2.2.4. Produits chimiques	108
2.2.5. Matériel stérile (ou à autoclaver)	109
2.2.6. Matériel de cryogénie.....	109
2.3. Milieu de culture et solutions	109
2.3.1. Préparation du milieu de culture des embryons de caféiers	109
2.3.2. Préparation des solutions saturées.....	110
3. Protocole expérimental	110
3.1. Déshydratation.....	111
3.2. Mesure de la teneur en eau.....	112
3.3. Mesure de la viabilité des semences et des embryons déshydratés (témoins)...	112

3.3.1. Germination des semences de blé et de caféier	113
3.3.2. Germination <i>in vitro</i> des embryons zygotiques de caféier.....	113
3.4. Congélation.....	114
3.5. Réchauffement.....	114
3.6. Mesure de la viabilité des semences et des embryons cryoconservés.....	114
3.7. Interprétation statistique des résultats	114
4. Références bibliographiques.....	117
5. Annexes techniques et notes pratiques	118

Chapitre 7

Transfert de gènes chez les végétaux <i>via Agrobacterium tumefaciens</i> et <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	121
1. Aspects fondamentaux	121
2. Partie expérimentale	124
2.1. Transformation et régénération du lotier japonais <i>via Agrobacterium tumefaciens</i>	124
2.1.1. Matériel biologique	124
2.1.2. Équipement et matériel nécessaires	124
2.1.2.1. Contenants	124
2.1.2.2. Outils	124
2.1.2.3. Produits chimiques	125
2.1.2.4. Matériels stériles	126
2.1.2.5. Équipement du laboratoire	127
2.1.3. Préparation des solutions.....	127
2.2. Transformation et régénération de la morelle <i>via Agrobacterium rhizogenes</i> ...	131
2.2.1. Matériel biologique	131
2.2.2. Équipement et matériel nécessaires	132
2.2.3. Préparation des solutions.....	132
3. Protocole expérimental	132
3.1. Transformation et régénération du lotier japonais <i>via Agrobacterium tumefaciens</i>	132
3.1.1. Stérilisation, germination et mise en culture des plantules de lotiers....	132
3.1.2. Transformation des plantules de lotiers	133
3.1.3. Sélection des transformants.....	134
3.1.4. Transfert en serre.....	134
3.1.5. Vérification de l'état transformé des plantes	135
3.1.5.1. Mise en évidence d'opines dans les plantes régénérées en culture	135
3.1.5.2. Mise en évidence des transgènes par PCR	135
3.1.5.3. Mise en évidence des transgènes par hybridation ADN-ADN (Southern blot)	137
3.2. Transformation et régénération de la morelle <i>via Agrobacterium rhizogenes</i>	145
3.2.1. Stérilisation, germination et mise en culture des morelles	145
3.2.2. Transformation des morelles issues de bouturage	146

3.2.3.	Obtention des transformants.....	146
3.2.4.	Transfert en serre.....	147
3.2.5.	Vérification de l'état transformé des plantes	147
3.3.	Schéma récapitulatif des procédures.....	148
4.	Références bibliographiques.....	149
5.	Annexes techniques et notes pratiques	151

Chapitre 8

La biolistique chez le bananier et le blé	155
1. Aspects fondamentaux.....	155
2. Partie expérimentale	158
2.1. Matériel biologique	158
2.1.1. Embryons androgénétiques de blé (méthode laboratoire MVE Orsay)..	158
2.1.2. Embryons somatiques d'origine zygotique (scutellum) de blé (méthode Montana, États-Unis).....	158
2.1.3. Suspensions cellulaires de bananier (méthode laboratoire MVE Orsay).....	159
2.2. Équipements et produits de laboratoire.....	159
2.2.1. Équipements de laboratoire.....	159
2.2.2. Matériel stérile.....	160
2.2.3. Produits.....	162
2.2.4. Composition des milieux de culture.....	162
2.2.5. Confection et stockage des solutions et milieux de culture.....	162
3. Protocole expérimental	164
3.1. Tirs sur embryons androgénétiques de blé (méthode laboratoire MVE Orsay) ..	164
3.1.1. Préparation du matériel	164
3.1.2. Préparation du matériel végétal.....	164
3.1.3. Préparation du canon.....	164
3.1.4. Préparation des microprojectiles pour les tirs	165
3.1.4.1. Préparation et stérilisation des billes	165
3.1.4.2. Enrobage des microparticules avec de l'ADN	166
3.1.5. Tirs sur embryons androgénétiques de blé.....	166
3.2. Tirs sur embryons somatiques d'origine zygotique (scutellum) de blé (méthode Montana, États-Unis)	167
3.2.1. Prétraitement des caryopses	167
3.2.2. Tirs.....	167
3.2.2.1. Préparation et stérilisation des microparticules d'or	167
3.2.2.2. Enrobages des particules pour 6 tirs	168
3.3. Tirs sur suspensions cellulaires de bananiers (méthode laboratoire MVE Orsay)	168
3.4. Tests d'expression transitoire et sélection des transformants	169
3.4.1. Test GUS	169
3.4.2. Sélection des plantes transformées.....	169
3.4.2.1. Pour les embryons de blé	169
3.4.2.2. Sélection des plantes obtenues à partir de scutellum (Montana)	169
3.4.2.3. Pour les cellules de bananier	170
3.5. Confirmation des plantes transformées	170

4. Références bibliographiques.....	170
5. Liste des fournisseurs	172
6. Annexes techniques et notes pratiques	173
6.1. Basta® mode d'action	173
6.2. Test de sélection avec Basta®	174
6.3. « Test GUS »	174
6.4. Milieu de régénération des proembryons et embryons A 0,4 B 0,5 pour les suspensions cellulaires de bananier.....	174
6.5. Milieux pour l'obtention de souches embryogènes de blé (méthode Montana) .	175
6.6. Idées-TP/TD	176

Chapitre 9

Protoplastes	177
1. Aspects fondamentaux	177
1.1. Protoplastes.....	177
1.1.1. Isolement de protoplaste.....	178
1.1.1.1. Plasmolyse	178
1.1.1.2. Dégradation de la paroi	178
1.1.2. Purification	178
1.1.3. Culture	179
1.1.4. Régénération des plantes.....	180
1.2. Hybridation somatique	181
1.2.1. Méthodes de fusion chimique	182
1.2.1.1. Fusion spontanée	182
1.2.1.2. Fusion au nitrate de sodium (NaNO ₃)	182
1.2.1.3. Fusion induite par une forte concentration en ions Ca ²⁺ , associée au pH élevé	182
1.2.1.4. Fusion au dextran ou au sulfate de dextran	182
1.2.1.5. Fusion au polyvinyl alcool (PVA)	182
1.2.1.6. Fusion au polyéthylène glycol (PEG)	183
1.2.2. Méthode de fusion électrique	183
1.2.3. Diversité des produits de fusion.....	184
1.2.4. Sélection de produits de fusion	184
1.2.5. Vérification de la nature hybride.....	185
2. Partie expérimentale	185
2.1. Matériel végétal.....	186
2.2. Matériel.....	186
3. Protocole expérimental	186
3.1. Isolement des protoplastes.....	187
3.1.1. Digestion enzymatique	187
3.1.2. Rinçage et purification	187
3.1.3. Estimation de la quantité de protoplastes obtenus	187
3.1.4. Contrôle de l'absence de la paroi par le Calcofluor White (concentration finale = 5 mg/mL)	189
3.1.5. Contrôle de la viabilité des protoplastes par la FDA (concentration finale = 5-10 mg/mL).....	189

3.1.6.	Contrôle de la présence des noyaux par le DAPI (4,6-diamo-2-phénylindole) (concentration finale = 5 mg/mL).....	189
3.2.	Fusion de protoplastes au polyéthylène glycol (50 % m/v) et leur culture	189
3.2.1.	Préparation de solution de PEG à 50 % m/v	189
3.2.2.	Procédure de fusion.....	190
3.2.3.	Culture des protoplastes après fusion.....	190
4.	Références bibliographiques.....	191
5.	Liste des fournisseurs	192
6.	Annexes techniques et notes pratiques	192
6.1.	Milieus et solutions utilisés.....	192
6.1.1.	MS (Murashige et Skoog) standard (stérilisation par autoclavage : 115 °C, 30 min)	192
6.1.2.	VKM modifié (stérilisation par filtration : 0,22 µm)	193
6.1.3.	Saccharose 21 % (stérilisation par autoclavage : 115 °C, 30 min)	193
6.1.4.	Mannitol 0,5 M + Ca ²⁺ (solution de fusion et de rinçage, stérilisation par autoclavage 115 °C, 30 min).....	193
6.1.5.	Solution de polyéthylène glycol (PEG) 50 %	194
6.1.6.	Solution mère de fluorescéine diacétate (FDA) (1 mg/mL).....	194
6.1.7.	Solution mère de calcofluor white (1 mg/mL)	194
6.1.8.	Solution mère de DAPI (4,6-diamo-2-phénylindole) (1 mg/mL).....	194
6.1.9.	Enzyme E 9.1 (stérilisation par filtration : 0,22 mm) (pomme de terre) .	194
6.1.10.	Murashige et Skoog (1962) (milieu de base).....	195
6.1.11.	Milieu de base (macroéléments de VKM)	195
6.1.12.	Vitamines de Morel et Wetmore	195
6.1.13.	CPW (Cell and protoplast washing solution) solution mère	196
6.1.14.	Vitamines et composés organiques KM (solution mère)	196
6.1.15.	Idée-TP/TD	197

Chapitre 10

Électroporation de protoplastes et de bactéries	201
1. Aspects fondamentaux	201
2. Partie expérimentale	203
2.1. Culture et obtention de plasmides d' <i>E. coli</i>	203
2.2. Obtention de protoplastes	204
2.3. Équipement spécifique à l'électroporation.....	205
2.3.1. Électroporateur à décharge de condensateur.....	205
2.3.2. Cuvettes ou cuves à électroporation.....	205
3. Protocole expérimental	206
3.1. Préparation de l'ADN.....	206
3.2. Isolement des protoplastes.....	206
3.3. Électroporation des protoplastes	207
3.4. Test de l'activité transitoire	209
4. Références bibliographiques.....	209
5. Liste des fournisseurs	210
6. Annexes techniques et notes pratiques	211
6.1. Isolement de protoplastes de cotylédons de lin (<i>Linum usitatissimum</i>).....	211

6.2. Introduction de colorant fluorescent non perméant	212
6.3. Transformation de bactéries (<i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i>)	213
6.3.1. <i>E. coli</i>	213
6.3.2. <i>A. tumefaciens</i>	214
6.4. Compositions	215
6.5. Idée-TP/TD	216

Chapitre 11

Recherche d'une séquence par PCR pour la confirmation de la transgénèse

Recherche d'une séquence par PCR pour la confirmation de la transgénèse	217
1. Aspects fondamentaux	217
2. Partie expérimentale	218
2.1. Matériel végétal : <i>Arabidopsis thaliana</i>	218
2.2. Matériel de laboratoire	220
3. Protocole expérimental	220
3.1. Extraction de l'ADN végétal.....	220
3.1.1. Extraction simple de l'ADN du matériel végétal (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	221
3.1.1.1. Matériel pour l'extraction par la méthode d'Edwards	221
3.1.1.2. Protocole	221
3.1.2. Extraction par la méthode utilisant le CTAB	222
3.1.2.1. Matériel pour l'extraction par la méthode de Doyle et Doyle	222
3.1.2.2. Protocole	222
3.1.3. Dosage de l'ADN obtenu à l'aide du fluorochrome Hoechst 33258 (étape facultative, réalisable si l'on dispose d'un fluorimètre).....	223
3.2. PCR.....	224
3.2.1. Préparation du matériel pour la séance suivante.....	224
3.2.2. Préparation de tableaux mentionnant les quantités de produits qui constitueront les échantillons de PCR	225
3.2.3. Préparation des échantillons de la PCR	225
3.2.4. PCR	227
3.3. Électrophorèse en gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium.....	228
3.3.1. Matériel pour l'électrophorèse	228
3.3.2. Préparation du gel.....	228
3.3.3. Coulage du gel.....	229
3.3.4. Dépôt des échantillons dans le gel et électrophorèse.....	229
3.3.5. Observation des gels.....	230
4. Références bibliographiques.....	231
5. Liste des fournisseurs	231
6. Annexes techniques et notes pratiques	232
6.1. Les programmes informatiques utiles pour la PCR	232
6.2. Amorces	233
6.3. Idée-TP/TD	233

Chapitre 12

Test de l'activité β-glucuronidase suite à une transgénèse utilisant le gène marqueur gus (uid)	237
1. Aspects fondamentaux	237
2. Partie expérimentale	239
2.1. Matériel végétal	239
2.2. Appareils et solutions	239
3. Protocole expérimental	239
3.1. Méthode fluorimétrique	239
3.1.1. Matériel	239
3.1.2. Protocole	240
3.1.2.1. Extraction des protéines, confection des échantillons, incubation	240
3.1.2.2. Mesure de l'activité par fluorimétrie	240
3.2. Test histochimique utilisant la X-GLUC	240
3.2.1. Matériel	241
3.2.2. Protocole	241
4. Références bibliographiques	241
5. Liste des fournisseurs	242

Chapitre 13

Haplodiploïdisation par culture d'anthères en milieu liquide chez le blé	243
1. Aspects fondamentaux	243
2. Partie expérimentale	245
2.1. Matériel biologique pour les cultures d'anthères de blé tendre et techniques culturales des plantes-mères	245
2.1.1. Germination des grains	246
2.1.2. Repiquage des germinations en terrines	246
2.1.3. Vernalisation	247
2.1.4. Culture des plantes-mères	247
2.1.5. Repérage du stade des plantes	247
2.2. Équipements et produits de laboratoire nécessaires pour les cultures d'anthères	248
2.2.1. Gros équipement	248
2.2.2. Petit matériel	248
2.3. Confection des milieux de culture et des stocks pour les cultures d'anthères de blé tendre	249
3. Protocole expérimental	249
3.1. Prélèvement des épis	249
3.2. Choc thermique appliqué aux épis	250
3.3. Androgenèse <i>in vitro</i>	250
3.3.1. Désinfection des épis	250
3.3.2. Mise en culture des anthères	251

3.3.3. Sélection et repiquage des embryons	251
3.3.4. Régénération des embryons	252
3.3.5. Entretien, évaluation du niveau de ploïdie et doublement à la colchicine des plantes obtenues	253
4. Références bibliographiques.....	253
5. Liste des fournisseurs	255

Chapitre 14

Haplodiploïdisation par culture de microspores isolées de blé <i>in vitro</i>	257
1. Aspects fondamentaux	257
2. Partie expérimentale	258
2.1. Matériel biologique pour les cultures de microspores de blé tendre et conditions de culture.....	258
2.2. Équipements et produits de laboratoire nécessaires pour les cultures de microspores	259
2.2.1. Gros équipement.....	259
2.2.2. Petit matériel.....	259
2.3. Confection des stocks et des milieux	260
2.3.1. Préparation du stock de macroéléments N6	261
2.3.2. Préparation du stock de microéléments de Chu	261
2.3.3. Préparation de la solution de Fe EDTA 10-2M.....	262
2.3.4. Préparation du stock de vitamines de Chu	262
2.3.5. Préparation des solutions de 2-4,D et de kinétine à 10^{-3} ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) ...	262
2.3.6. Préparation du milieu CHB3 liquide stérilisé par filtration.....	262
2.3.7. Milieu de régénération ou de clonage : milieu Murashige et Skoog sans hormones.....	263
2.3.8. Solution de colchicine pour le doublement chromosomique.....	264
3. Protocole expérimental	264
3.1. Protocole de culture de microspores de blé tendre	264
3.2. Entretien, évaluation du niveau de ploïdie et doublement à la colchicine des plantes obtenues.....	266
3.2.1. Clonage des plantes haploïdes	266
3.2.2. Évaluation du nombre chromosomique et sortie de tube des plantes haploïdes	267
3.2.3. Vernalisation	267
3.2.4. Sortie de vernalisation	267
3.2.5. Doublement à la colchicine	268
3.2.6. Repiquage des plantes en terre	268
3.2.7. Autofécondation des épis	269
3.2.8. Récolte et battage des épis	269
3.2.9. Importance du doublement spontané	269
4. Références bibliographiques	270
5. Liste des fournisseurs	271
6. Annexes techniques et notes pratiques	273

Chapitre 15

**Adaptation des techniques de culture *in vitro*
aux conditions tropicales**

Adaptation des techniques de culture <i>in vitro</i> aux conditions tropicales	275
1. Aspects fondamentaux	275
2. Partie expérimentale	277
2.1. Installation d'un laboratoire de culture <i>in vitro</i> en conditions tropicales	277
2.1.1. Choix du site	277
2.1.2. Superficie du laboratoire et agencement intérieur	278
2.1.3. Choix des équipements	280
2.2. Gestion du laboratoire	282
2.2.1. Ressources humaines – Formation et gestion du personnel	282
2.2.2. Consommables	283
2.2.3. Qualité du matériel végétal « source »	283
3. Protocole expérimental	283
3.1. Étude de cas n° 1 : culture <i>in vitro</i> du teck	283
3.1.1. Fondements	284
3.1.2. Propagation <i>in vitro</i> à partir de graines	284
3.1.2.1. Éléments de méthodologie	285
3.1.2.2. Résultats	286
3.1.3. Micropropagation de génotypes sélectionnés <i>in vivo</i>	286
3.1.3.1. À partir de portions d'axes végétatifs	287
3.1.3.2. À partir de méristèmes primaires caulinaires	288
3.1.4. Discussion – Perspectives	288
3.2. Étude de cas n° 2 : culture <i>in vitro</i> du bananier (<i>Musa</i> sp.)	289
3.2.1. Aspects fondamentaux	289
3.2.2. La multiplication <i>in vitro</i> du bananier	290
3.2.2.1. Matériel végétal	290
3.2.2.2. Équipement et matériel expérimental	290
3.2.2.3. Milieux de culture	291
3.2.3. Protocole expérimental : méthode de micropropagation	293
3.2.3.1. Étape d'initiation des cultures	293
3.2.3.2. Étape de prolifération	294
3.2.3.3. Étape d'allongement et d'enracinement des tigelles	294
3.2.3.4. Transfert et croissance des vitroplants en pépinière	295
4. Références bibliographiques	295
5. Liste et adresses de quelques fournisseurs en France	296
6. Annexes techniques et notes pratiques	298