

ORGANOGENESE ET MULTIPLICATION VEGETATIVE

IN VITRO CHEZ CASUARINA OBESA ET

CASUARINA EQUISETIFOLIA

B. SOUGOUPARA^x, E. DUHOUX^{xx} et Y. DOMMERGUES^{xxx}

-
- x Laboratoire de Microbiologie des Sols, ORSTOM, Dakar, Sénégal.
 - xx Département de Biologie Végétale, Faculté des Sciences Dakar, Sénégal.
 - xxx BSSFT (CNRS/CTPT/ORSTOM), 45 Bis Avenue de la Belle Gabrielle 94736 Nogent sur Marne France.
-

Les plantes actinorhiziennes de la famille des Casuarinacées sont largement utilisées dans les zones tropicales ou subtropicales comme producteurs de biomasse, fixateurs de dunes, brise vent et également comme régénérateurs de sols agricoles ou forestiers (National Academy of Sciences, 1984). Grâce à leur association symbiotique avec un actinomycète (Frankia) et aussi avec des champignons ecto ou endomycorhiziens, les Casuarinacées peuvent croître dans des sols marginaux carencés en azote et très pauvres en phosphore.

Casuarina obesa et Casuarina equisetifolia ont retenu notre attention dans le cadre de la recherche d'une meilleure compréhension de la symbiose fixatrice d'azote entre la plante hôte et Frankia (SOUGOUFARA, 1983). La possibilité d'obtenir des cultures pures de Frankia (DIEM et al, 1982) permet désormais un strict contrôle de la partie microbiologique de la symbiose. De plus, les nouvelles applications des techniques de culture in vitro chez les arbres (BONGA et al, 1982 ; DUHOUX, 1986) permettent d'améliorer la maîtrise de la symbiose en contrôlant le génotype des plantes hôtes. Ce contrôle peut se réaliser soit, sur la reproduction conforme de génotypes sélectionnés, par la voie de la multiplication végétative, soit encore, en augmentant la variabilité génotypique naturelle, par la voie de l'organogénèse in vitro à partir de cals.

Matériel et Méthodes

Matériel végétal

Les explants du Casuarina equisetifolia proviennent d'un même arbre, âgé de 10 à 15 ans, cultivé à la station de recherche ORSTOM-Bel Air, Dakar, Sénégal. Les explants sont constitués par des inflorescences femelles (IFI), immatures, récoltées 3 semaines avant leur floraison. Une IFI comprend deux régions : la partie supérieure ovoïde, de 1 mm de largeur, composée de nombreuses bractées, chacune ayant à l'aiselle un méristème floral (FLORES et MOSELEY, 1982) et une partie basale cylindrique qui porte des méristèmes végétatifs (bourgeons axillaires) à l'aiselle de chaque bractée.

Dans les conditions climatiques de Dakar, la floraison a lieu en février, mais peut-être prolongée pendant 6 à 8 mois en arrosant régulièrement les arbres, ce qui permet une récolte des IFI pendant une longue période de l'année. Après leur récolte, les IFI sont lavées à l'eau courante et immergées pendant 30 minutes dans une solution aqueuse de SDS (dodécyl sodium sulfate, SIGMA 5750) à 0,01% ; ce détergent facilite ultérieurement la désinfection qui est effectuée par trempage des explants pendant 1 minute dans une solution aqueuse de $Hg Cl_2$ 0,1%.

Les graines de Casuarina obesa⁽¹⁾ sont d'abord immergées pendant 3 mn dans l'acide sulfurique concentré puis lavées abondamment à l'eau stérile. 10 jours après l'ensemencement des graines dans de l'eau gélosée à 8 g L⁻¹, on prélève sur les plantules, des explants constitués par des fragments de 3 mm d'hypocotyle.

Milieux de culture et incubation

3 milieux de culture sont utilisés :

- milieu (A) d'induction de la caulogénèse : la solution minérale de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionnée de vitamines (NITSCH et NITSCH, 1965), 30 g L⁻¹ de saccharose, 0,01 mg L⁻¹ d'acide naphthalène acétique (ANA), benzylaminopurine (BAP) de 0 à 3 mg L⁻¹

(1) Nous tenons à remercier le Dr. J. TURNBULL pour les graines qu'il nous a aimablement fournies.

- milieu (B) d'élongation : c'est le milieu A additionné de charbon actif à 20 g L⁻¹ (Merck 2186).

- milieu (C) d'enracinement : c'est le milieu A dépourvu de BAP et de charbon actif. Les essais de rhizogénèse ont été tentés avec l'ANA aux concentrations suivantes : 0,01 ; 0,03 ; 0,05 ; 0,10 ; 0,20 mg L⁻¹ .

Tous les milieux ont été ajustés à pH 5,5. L'agar (Bacto-agar Difco) est ensuite introduite à raison de 8 g L⁻¹ . Les milieux sont enfin stérilisés à l'autoclave à 110°C pendant 30 mn.

A la suite de la désinfection, les IFI et les hypocotyles sont disposés aseptiquement dans des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre contenant 20 ml du milieu A. Après 4-5 semaines de culture, les explants sont transférés dans des tubes de culture de 23 x 15 mm contenant 25 ml de milieu B.

40 à 80 explants, pour chaque condition ont été soumis à l'expérimentation. L'ensemble des cultures est placé dans une salle climatisée à une température de 28 ± 1° C et à une photopériode de 17h/j (4000 lux).

RESULTATS

Selon les explants utilisés on obtient, soit des cals organogènes, soit des rameaux provenant du développement des bourgeons axillaires des IFI.

Cals organogènes

15 à 20 jours après le début de la culture, des cals blanchâtres apparaissent sur les fragments d'hypocotyles aux concentrations d'ANA (1 mg L^{-1}) et de BAP ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$). Ces cals deviennent, après 3 à 4 semaines, pourvus de nombreux bourgeons (Fig.1). Une étude histologique de ces cals a pu montrer qu'il s'agissait bien d'une néoformation et non d'une embryogénèse somatique. Après deux mois de culture, les bourgeons ont donné naissance à des rameaux de 3 à 4 mm de longueur. On compte environ 10 à 20 rameaux régénérés dans chaque cal.

Développement des bourgeons axillaires des IFI

Après 2 semaines de culture, la partie basale du pédoncule gonfle. 4 semaines plus tard, des bourgeons apparaissent à la base de l'IFI (Fig. 2). Le nombre de ces bourgeons varie en fonction de la concentration en BAP (DUHOUX, SOUGOUFARA et DOMMARGUES, 1986). En présence de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ d'ANA et de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ de BAP, on en compte en moyenne 5 à 6.

Ces bourgeons ne peuvent évoluer que si le cal est transféré sur le milieu B comprenant du charbon actif. 5 semaines après ce transfert, les bourgeons axillaires se développent en de pousses vertes, vigoureuses, de 5 à 6 cm de longueur.

DISCUSSION - CONCLUSION

Les techniques de cultures cellulaires (cals ou cellules libres) sont considérées comme un instrument de choix pour l'obtention de divers mutants. En effet, l'instabilité génétique des cultures de cals a été rapportée de nombreuses fois (BAYLISS, 1980 ; D'AMATO, 1977 ; CONSTANTIN, 1971) et la culture des tissus par la voie de cals constitue depuis quelques années une nouvelle source de variabilité génétique (LARKIN et SCOWCROFT, 1981). Chez Casuarina obesa nous avons montré qu'une régénération par voie de cal est possible ; les cals obtenus manifestent abondamment et sans aucun transfert, leurs potentialités organogènes. Ces résultats, qui constituent à notre connaissance, les premiers succès de régénération à partir de cals chez un arbre fixateur d'azote, vont donc nous permettre de tenter de sélectionner, comme chez plusieurs plantes herbacées, Nicotiana NABORS et al 1980), Citrus (KOCHBA et al 1982), des lignées cellulaires, puis des plantes tolérantes à la salinité.

Par ailleurs, la méthode de microprogration du C. equisetifolia que nous avons mise au point, à partir d'IFI est simple, et performante. Elle évite de surcroît d'utiliser une technique de rajeunissement des arbres (DUHOUX, 1986) et permet donc de propager efficacement des génotypes adultes sélectionnés.

Ces premiers résultats devront être précisés par des travaux concernant l'amélioration de la rhizogénèse qui reste faible, ainsi que sur les techniques de transfert et d'acclimatation des plantes au champ.

BIBLIOGRAPHIE

BAYLISS M.W. 1980 : Chromosomal variation in plant tissues in culture : In I.K. VASIL (Ed) : Perspectives in plant cell and tissue culture, Int Rev Cytol Suppl 2 A, 113-144. Academy Press, New York.

BONGA J.M. et DURZAN D.J. Eds 1982. Tissue culture in forestry. NIJHOFF/JUNK, The Hague, 420 p.

CONSTANTIN M.J. 1981. Chromosome instability in cell and tissue culture and regenerated plants. Environ Exp. Bot. 21, 359-369.

D'AMATO F. 1977 : Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures In J. REINERT and Y.P.S. BAJAJ (Eds) : Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and organ Culture 343-357, Springer-Verlag.

DIEM H.G., D. GAUTIER D.J. et Y.R. DOMMERGUES 1982. Isolation of Frankia from nodules of Casuarina equisetifolia. Can. J. Microbiol. 28, 526-530.

DUHOUX E. 1986. Organogenèse et multiplication végétative in vitro chez les arbres. In cultures in vitro chez les végétaux : méthodes et applications (Ed. J.P. ZRYD). Presses Polytechniques Romandes, Lausanne (sous presse).

DUHOUX E, SOUGOUFARA B et Y. DOMMERGUES 1986. Propagation of Casuarina equisetifolia through axillary buds of immature female inflorescences in culture in vitro. Plant Cell Rep. (sous presse).

FLORES et MOSELEY 1982. The anatomy of the pistillate inflorescence and flower of Casuarina vecticillata Lamarch (Casuarinaceae) Amer. J. Bot 10, 1673-1684.

KOCHBA J., G. BEN-HAYYIM, P. SPIEGEL-ROY ; S. SAAD and H. NEUMANN 1982 : Selection of stable salt tolerant callus cell lines and embryos in Citrus sinensis and C. aurantium. Z. Pflanzenphysiol 106, 111-118.

LARKIN P.J. et W.R. SCOWCROFT 1981 : Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60, 197-214.

MURASHIGE T. et F. SKOOG 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15, 473-497.

NABORS M.W. ; GIBBS S.E. ; BERNSTEIN C.S. and M. MEIS 1980. NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. Z. Pflanzenphysiol. 97, 13-17.

National Academy of Sciences 1984. Casuarina : Nitrogen-fixing trees for adverse sites, National Acad. Sci., Washington 118 p.

NITSCH J.P. et NITSCH C., 1965. Néof ormation de fleurs in vitro chez une espèce de jours courts : Plumbago indica. Ann. physiol. veg. 7, 251-256.

SOUGOUFARA B. 1983 : Méthodologies impliquées dans l'étude de la symbiose d'une non-légumineuse forestière tropicale (Casuarina) avec Frankia. DEA, Université de Nancy.