

# RECHERCHES SUR LA CULTURE DES TISSUS DE PALMIER A HUILE (*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ.)

**H. RABÉCHAULT, J. P. MARTIN et S. CAS**

Laboratoire de Physiologie Végétale  
Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM  
70, route d'Aulnay, 93-Bondy

Plusieurs tentatives ont été faites ces dernières années pour multiplier le palmier à huile au moyen de cultures d'organes et de tissus *in vitro*.

Rabéchault *et al.* [13] ont obtenu des colonies cellulaires et des embryoides à partir d'embryons excisés de palmier à huile cultivés en milieu liquide. Ces embryoides transférés sur milieu solide en présence d'auxine (acide  $\beta$  indolyl acétique) et d'acide ascorbique ont germé, certains ne donnant que des racines, d'autres à la fois des racines et des pousses [Rabéchault *et al.* non publié]. Staritsky [16] a cultivé sur milieu gélosé des apex à partir desquels se sont formées des pousses. Smith et Jones [14, 15] ont entrepris la culture de cellules en vue de provoquer l'initiation de plantules. Enfin, Martin *et al.* [6, 7] ont réussi la

production de cals à partir de racines, et ces cals ont donné à leur tour des racines mais pas de parties aériennes.

Notre laboratoire s'intéresse à une nouvelle source de tissus : des fragments d'apex et de cœur de palmier. Ces tissus semblent présenter en effet des propriétés intéressantes pour la prolifération cellulaire et nous relaterons ici une partie des résultats obtenus à l'aide de ce matériel.

La compréhension des phénomènes d'organogenèse de ces cultures bénéficie des travaux effectués sur l'organogenèse des embryons en culture *in vitro* que nous poursuivons depuis une dizaine d'années [Rabéchault 11].

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal.

Les explantats nécessaires aux expériences ont été prélevés sur de jeunes palmiers de 15 mois (*Elaeis guineensis* Jacq. var. *dura* DA 40) issus de graines qui nous ont été fournies par la Station de l'I. R. H. O. de Pobé (Dahomey). A ce stade, les bases de pétioles sont insérées autour d'un axe charnu très court (1 à 2 cm de haut) dont la partie supérieure est occupée en son centre par une dépression au fond de laquelle se trouve l'apex. L'axe charnu et la base des pétioles forment extérieurement une sorte de « bulbe », duquel partent les racines fasciculées.

Les prélèvements ont été effectués de la manière suivante : les pétioles des feuilles ont été sectionnés à 7 cm environ au-dessus du niveau où l'on pouvait localiser l'apex, et les racines coupées à leur tour. Le bulbe, ainsi isolé, a été préparé par une section à la partie inférieure et par la suppression des bases de pétioles les plus extérieures. Les tissus restant ont été désinfectés à l'aide d'une solution de chlorure mercurique à 0,1 p. 100 pendant 20 mn et rincés à l'eau distillée stérile.

Un cylindre axial de tissus de 1,2 cm de diamètre et 6 cm de long, prélevé à l'aide d'un perce-bouchon stérile, a fait l'objet d'une nouvelle désinfection au chlorure mercurique. Il était ensuite coupé transversalement en deux : la partie inférieure, renfermant l'apex, était partagée en 8 par 4 sections passant par le grand axe, et la partie supérieure, comprenant de jeunes organes et la base blanche des pétioles, en tranches de 4 mm d'épaisseur.

### Milieux nutritifs.

Au cours des diverses phases de la culture des tissus, 48 combinaisons des principaux éléments entrant dans la composition des milieux de base ont été essayées : 3 concentrations en gélose Bacto-agar Difco (0 : milieux liquides, 4 p. 1000 : milieux semi-solides et 8 p. 1 000 : milieux solides) ; 2 concentrations en saccharose (20 et 40 p. 1 000) et 8 formules et concentrations d'éléments minéraux majeurs : Knop [5], Knop au 1/2, Heller [4], Heller au 1/2, Miller B [8], Murashige et Skoog [9] et Murashige et Skoog au 1/5 et aux 2/5.

Tous les milieux de base ont reçu les mêmes compléments : des oligoéléments selon Murashige et Skoog modifié Nitsch [10], les substances complémentaires selon la formule de Dulieu [2] modifiée, soit : hydrolysate de caséine  $5 \cdot 10^{-4}$ , cystéine HCl  $10^{-5}$ , thiamine HCl  $10^{-6}$ , pyridoxine HCl  $10^{-6}$ , biotine  $10^{-8}$ , pantothénate de Ca  $10^{-6}$ , ac. nicotinique  $10^{-6}$ , ac. ascorbique  $10^{-4}$  et méso-inositol  $10^{-4}$ , et de l'EDTate de fer selon Murashige et Skoog [9]. Enfin plusieurs auxines (AIA ; ANA ; ANOA ; 2,4-D et 2,4,5-T) et des cytokinines ont été ajoutées à des doses variant entre  $10^{-5}$  et  $10^{-7}$ . Les milieux solides et liquides ont été distribués dans des tubes 24 x 160 recouverts d'un capuchon de verre du modèle imaginé par le laboratoire [Bouvinet et Rabéchault, 1 ; Rabéchault 12], et les milieux semi-solides, au fond de fioles cylindro-coniques de Fourneau de 125 ml. Les milieux liquides étaient aérés par rotation sur des clinostats tournant à raison de 26 t/mn.

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

- 6 FEV. 1973

n°

5905 Bio 2  
Amel

Les cultures ont toutes été maintenues à l'obscurité après l'ensemencement et le premier repiquage ; une partie était ensuite exposée à la lumière (12 000 lux). L'éclairage était dispensé pendant 12 h par jour par

des tubes fluorescents « Type Gro-lux Sylvania » (F 40 GRO/F 46-23) spécialement étudiés pour la croissance des végétaux. La température des salles de cultures était maintenue à  $27^{\circ} \pm 0,5^{\circ} \text{C}$ .

## RÉSULTATS

Après l'ensemencement, les proliférations cellulaires les plus spectaculaires ont été obtenues à partir des segments longitudinaux passant par l'axe de l'apex ; elles devenaient très faibles ou pratiquement nulles dans le cœur fibreux au-dessous de l'apex et elles diminuaient graduellement quand on s'élevait au-dessus et que l'on s'approchait de la partie chlorophyllienne des pétioles.

Les milieux liquides convenaient le mieux ; ensuite venaient les milieux semi-solides et solides. La gélose tendait à favoriser le brunissement.

Pendant la période de dédifférenciation des tissus, la concentration la meilleure en saccharose a été de 20 p. 1000, tandis que la teneur 40 p. 1000 a nettement amélioré la différenciation d'organes. Les comparaisons de milieux minéraux pour l'obtention de cals ont montré que la concentration en éléments majeurs ne devait pas être inférieure à 1 800 mg/l. En première analyse, nous n'avons pas trouvé de différence dans les rendements en tissus, entre les milieux Knop, Heller et Murashige et Skoog aux 2/5, au cours de la phase de dédifférenciation et nous n'avons pu relever, à ce stade, d'influence particulière de l'apport de l'ion  $\text{NH}_4^+$ .

En ce qui concerne les auxines, l'ANA et le 2,4-D ont donné les meilleurs résultats pendant la phase de dédifférenciation. Les concentrations optimales étaient de l'ordre de  $2.10^{-6}$  à  $6.10^{-6}$ .

Parmi les cytokinines, la benzylamino purine a provoqué moins de brunissement que la kinétine ; elles doivent être utilisées à faibles concentrations, de l'ordre de  $10^{-7}$ . En présence d'ANA ou de 2,4-D aux concentrations indiquées ci-dessus, les premières proliférations commencent à apparaître après 3 semaines de culture sous la forme d'un gonflement au niveau de la section des tissus. Des cals se forment, qui peuvent proliférer indéfiniment et qui présentent peu ou pas d'organogenèse (Photographie 1).

Pour augmenter l'organogenèse, nous avons décidé de provoquer des « chocs physiologiques » par passage des cultures sur des milieux successifs de compositions différentes et de l'obscurité à la lumière.

La meilleure combinaison trouvée jusqu'à présent est la suivante :

1) La culture initiale après l'ensemencement est effectuée à l'obscurité dans un milieu liquide renfermant environ 1 800 mg/l de sels minéraux (solution de Knop, Heller ou Murashige et Skoog aux 2/5), 20 p. 1000 de saccharose, des oligoéléments et du fer

comme indiqué ci-dessus,  $2.10^{-6}$  de 2,4-D et  $10^{-7}$  de kinétine ou benzylaminopurine.

2) Le premier repiquage est réalisé après une période d'un mois environ sur un milieu liquide identique au précédent, mais dans lequel la quantité de sels minéraux est élevée jusqu'à 3 000 mg/l. Les formules de Miller B et de Murashige et Skoog, riches à la fois en ions  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{NH}_4^+$ , conviennent bien. Le 2,4-D est remplacé par  $10^{-6}$  d'ANA. Les cultures sont encore maintenues à l'obscurité pendant 4 à 6 semaines. On favorise ainsi l'apparition des primordiums des racines et des feuilles.

3) Le deuxième repiquage consiste à transférer les cultures sur un milieu liquide ou semi-solide de composition identique au précédent, mais dans lequel la concentration en saccharose est portée de 20 à 40 p. 1000.

4) Enfin, les repiquages suivants sont effectués sur des milieux exposés à la lumière, dont la concentration en sels minéraux majeurs est ramenée à 1 800 mg/l, le sucre à 20 p. 1000 et où l'ANA est remplacé par  $10^{-7}$  d'AIA.

Les cultures qui ont été faites à la lumière à partir du deuxième repiquage ont eu une organogenèse moins importante que celles éclairées seulement à partir du troisième.

La photographie 2 de la planche représente une culture en milieu liquide, dont les cals ont envahi tout l'espace disponible 60 jours après le deuxième repiquage, (ANA  $10^{-6}$ ). On distingue deux sortes de cals : les uns sont d'un blanc pur très fermes et à surface lisse ( $c_2$ ) donnant des pousses (P), les autres sont d'un blanc crème et ont une surface floconneuse ( $c_1$ ).

La photographie 3 montre la formation de deux fortes racines (r) sur un cal, 21 jours après le troisième repiquage, à la lumière en présence de  $10^{-7}$  d'AIA. Ces racines ont été repiquées en milieu semi-solide (MS 2/5, gélose 4 p. 1000, saccharose 20 p. 1000, fer selon Murashige et Skoog [9], oligoéléments selon Nitsch [10] et substances complémentaires comprenant : adénine HCl  $1,5.10^{-6}$ , AIA  $10^{-7}$ , glutathion  $5.10^{-6}$ , glycocolle  $2.10^{-6}$ ). Elles ont émis de nombreuses racines adventives et s'allongent (30 mm en 3 semaines). Les milieux gélés sont moins favorables à la croissance des racines (photographie 4), ainsi que nous l'avons déjà montré [Martin *et al.* 6,7].

La photographie 5 est celle de l'une des cultures, au troisième repiquage, où l'on remarque des pousses (P) et des racines (r), mais la concentration du milieu en AIA a été portée à  $10^{-6}$ .

## CONCLUSIONS

On peut obtenir des cultures de tissus de palmier à huile à partir de fragments d'apex et de la base blanche des pétioles, dans un milieu renfermant 1 800 mg/l de sels d'éléments minéraux majeurs,

20 p. 1 000 de saccharose,  $2.10^{-6}$  de 2,4-D et  $10^{-7}$  de kinétine ou de benzylaminopurine. Au stade de la dédifférenciation des tissus, on n'observe pas de différences, dans la production de cal, entre les solu-

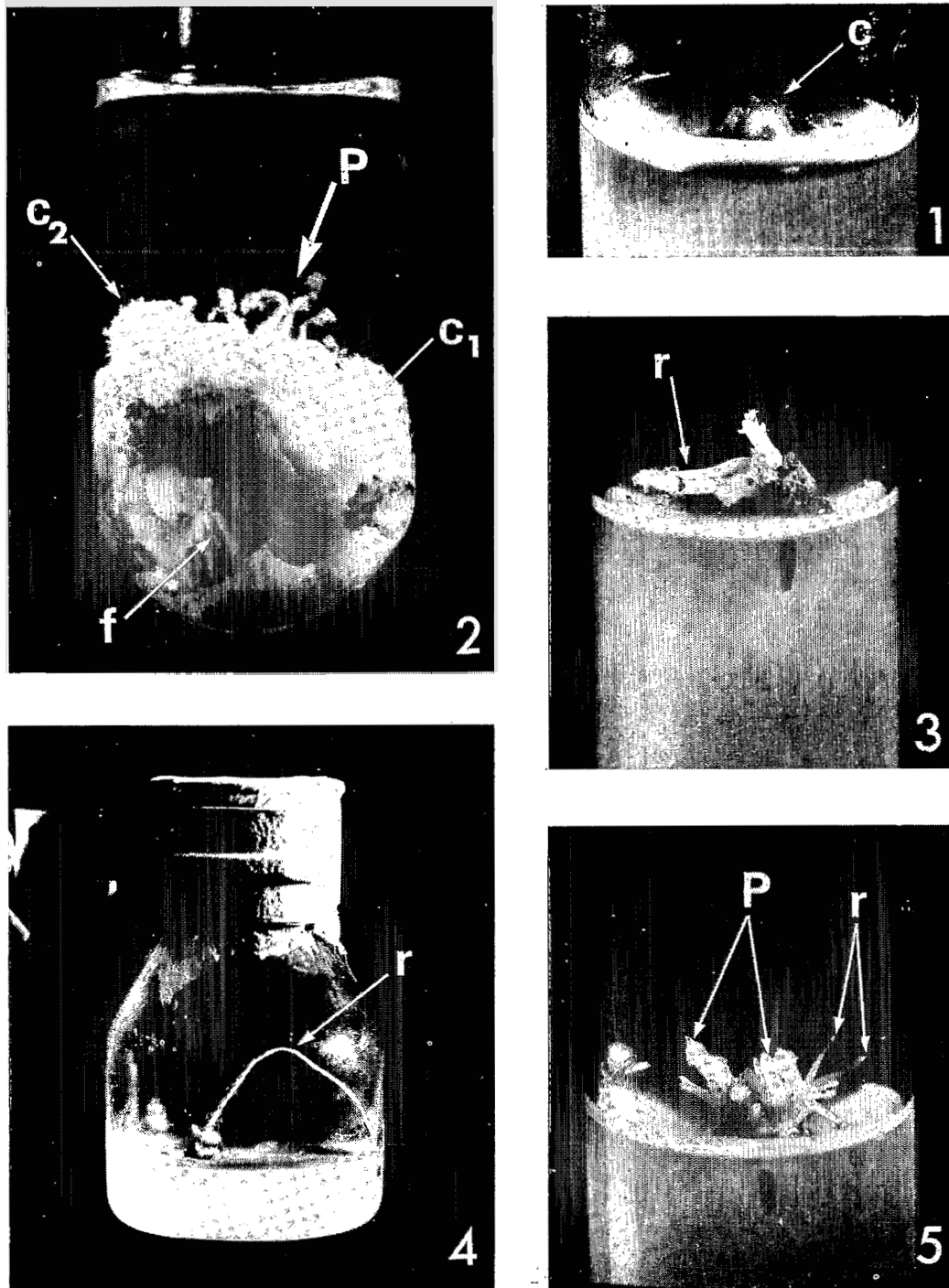


FIG. 1 : cal non organogène ; FIG. 2 : ensemble de cals sur fragment de cœur de palmier en milieu liquide : c<sub>1</sub> cal crème clair à aspect superficiel floconneux, c<sub>2</sub> cal ferme blanc pur donnant des pousses (P) au 2<sup>e</sup> repiquage ; FIG. 3 : cal ayant donné deux vigoureuses racines (r) sur milieu solide au 3<sup>e</sup> repiquage ; FIG. 4 : la racine(r) d'un explantat a continué à se développer sur un milieu solide qui n'est cependant pas le plus propice à cette culture ; FIG. 5 : cal ayant produit à la fois des pousses (P) et des racines (r).

(Le diamètre des tubes est de 24 mm et celui de la fiole Fig. 3 de 60 mm.)

tions minérales renfermant ou non l'ion  $\text{NH}_4^+$ . La gélose favorise le brunissement des tissus. Les auxines autres que le 2,4-D donnent de moins bons résultats. Ce sont les tissus de l'apex ou proches de celui-ci qui présentent les proliférations cellulaires les plus rapides et les plus importantes. Cette faculté diminue progressivement à partir de la base blanche des pétioles, au fur et à mesure que l'on s'élève vers les parties chlorophylliennes.

Pour améliorer l'organogénèse, des « chocs physio-

logiques » sont bénéfiques. Ils consistent à transférer les tissus de l'obscurité à la lumière, et sur des milieux de compositions et de concentrations différentes (concentrations en éléments minéraux majeurs portées à 3 000 mg/l et plus, saccharose élevé à 40 p. 1000, 2,4-D remplacé par l'ANA ou l'AIA  $10^{-6}$  à  $10^{-7}$ ).

Pour faciliter la croissance des organes, il est ensuite préférable d'effectuer les cultures à la lumière, dans des milieux où les concentrations en éléments minéraux et en saccharose sont réduites.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOUVINET J. et H. RABÉCHAULT. — *C. R. Acad. Sci., Paris*, **260**, p. 5336-5338, 1965.
- [2] DULIEU H. L. — *C. R. Acad. Sci., Paris*, **256**, p. 3344-3346, 1963.
- [3] GAUTHERET R. J. — *La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations*, 963 p. (Masson et Cie Edit.) Paris, 1959.
- [4] HELLER R. — *Ann. Sci. Nat., Bot. Biol. Vég.*, 11<sup>e</sup> série, **14**, p. 1-219, 1953.
- [5] KNOP W. — *Landw. Versuchs-Stat.*, **7**, p. 98-107, 1865.
- [6] MARTIN J.-P., S. CAS et H. RABÉCHAULT. — *C. R. Acad. Sci., Paris*, **274**, p. 2171-2174, 1972.
- [7] MARTIN J.-P., S. CAS et H. RABÉCHAULT. — *Oléagineux*, **27**, **6**, p. 303-305, 1972.
- [8] MILLER C. O. — *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **12**, p. 395-408, 1961.
- [9] MURASHIGE T., F. SKOOG. — *Physiol. Plant.*, **15**, p. 473-497, 1962.
- [10] NITSCH J.-P., C. NITSCH, S. HAMON. — *C. R. Acad. Sci., Paris*, **269**, p. 1275-1277, 1969.
- [11] RABÉCHAULT H. — *Oléagineux*, **17**, **10**, p. 757-764, 1962.
- [12] RABÉCHAULT H. — *Thèse Doct. 3<sup>e</sup> cycle Physiol. Vég.* — *Fac. Sci. Paris*, ORSTOM Edit., 146 p., 15 Pl., 1967.
- [13] RABÉCHAULT H., J. AHEE et G. GUENIN. — *C. R. Acad. Sci., Paris*, **270**, p. 3067-3070, 1970.
- [14] SMITH W. K., L. H. JONES. — *Chem. and Indust.* — n° 44, p. 1399-1401, 1970.
- [15] SMITH W. K. — *Com. Society for Experimental Biology* — 6 p. dactyl. — April 1970 (Communication personnelle).
- [16] STARTSKY G. — *Euphytica*, **19**, p. 288-292, 1970.

Extrait de *Oléagineux*, 27<sup>e</sup> année, n° 11, Novembre 1972, p. 531-534.

