

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Colonies cellulaires et formes embryoides obtenues in vitro à partir de cultures d'embryons de Palmier à huile (Elaeis guineensis Jacq. var. dura Becc.).* Note (\*) de M. **Henri Rabéchault**, M<sup>me</sup> **Jeanne Ahée** et M. **Gilbert Guénin**, présentée par M. Lucien Plantefol.

Sous l'influence de l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique et de la kinétine, puis de l'acide  $\beta$  indolyl acétique associé à l'acide ascorbique, les embryons de Palmier à huile produisent des cals puis des nodules. Ces derniers verdissent à la lumière et ils émettent des racines. A partir d'un nodule on peut obtenir une colonie de nodules de même forme et qui présentent les mêmes caractères de développement que des embryoides.

L'obtention *in vitro* de cultures de tissus de Monocotylédones est signalée moins fréquemment dans la littérature que celle de tissus de Dicotylédones (<sup>1</sup>). Ce sont surtout les cultures de tissus des Graminées qui ont fait l'objet des plus nombreux travaux : citons ceux de Trione et coll. (<sup>10</sup>) sur le Blé, ceux de Graebe et coll. (<sup>2</sup>) sur le Maïs et surtout ceux des physiologistes japonais sur le Riz [Maeda (<sup>5</sup>), Yamada et coll. (<sup>11</sup>), Yatazawa et coll. (<sup>12</sup>)].

Sans doute les cultures de tissus de Palmier ont-elles été rarement tentées. C'est la raison pour laquelle il nous a semblé intéressant de donner ici un bref compte rendu de nos recherches sur la culture de tissus de Palmier à huile, menées parallèlement à celles que nous poursuivons sur la culture *in vitro* des embryons. Les premières expériences ont été réalisées en 1966 à la suite de l'observation de la formation de cals à la surface des embryons se développant sur des milieux renfermant de l'acide  $\beta$  indolyl acétique ou AIA (<sup>7</sup>) ou de l'acide 2,4 dichlorophénoxyacétique ou 2.4-D.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les embryons ont été extraits de graines provenant de la Station IRHO de La Mé (Côte-d'Ivoire). Nous avons effectué cinq séries d'expériences : les deux premières portaient sur les embryons de graines âgées (8 mois après la récolte) et les trois autres sur les embryons de graines fraîches (1-2 mois après la récolte). L'extraction aseptique des embryons a été effectuée selon des techniques décrites précédemment (<sup>7</sup>) à partir de graines amenées par trempage à 21,5 % d'eau par rapport à la matière sèche (<sup>8</sup>). Ils ont été cultivés sur des milieux gélosés (9‰ de Bacto-Agar Difco) ou en suspension dans des milieux liquides distribués dans des matras de 150 ml. Afin de permettre la respiration et un brassage énergétique des embryons en milieux liquides, nous avons provoqué une aération forcée à l'aide d'un barbotage d'air stérilisé par filtration et amené au fond du liquide par un tube capillaire.

Il y avait 24 embryons par traitement en milieux gélosés ou 10 embryons par matras et 3 matras par traitement pour les expériences en milieux liquides.

Pour favoriser la dédifférenciation des tissus, diverses substances stimulant la division cellulaire (lait de coco, AIA, 2.4-D, kinétine, etc.) ont été ajoutées, seules ou en mélange, à un milieu de base renfermant des éléments minéraux selon Heller (<sup>3</sup>) et du saccharose à 20 ‰. Finalement le milieu le plus favorable avait la composi-

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

Collection de Référence

n° 14408

- 5 OCT. 1970

tion suivante pour 1 000 ml : éléments minéraux selon Heller, saccharose 20 g, 2.4-D  $1.10^{-6}$ , kinétine 0,5 à  $1.10^{-6}$ , hydrolysate de caséine  $200.10^{-6}$  et lait de coco 100 ml. Ce dernier peut être remplacé par le mélange : glycine  $20.10^{-6}$ , acide nicotinique  $5.10^{-6}$ , pyridoxine HCl  $5.10^{-6}$ , thiamine  $1.10^{-6}$ , cystéine  $2.10^{-6}$ , adénine HCl  $10.10^{-6}$ , pantothénate de calcium  $5.10^{-6}$  et mésoinositol  $200.10^{-6}$ .

RÉSULTATS. — A. Dans les deux premières séries d'expériences, effectuées à l'aide d'embryons de *graines de 8 mois*, l'haustorium a eu tendance à brunir surtout sur les milieux gélosés, et le parenchyme interne est mort puis s'est désagrégé. Le lait de coco a eu un effet bénéfique en limitant le brunissement et en stimulant l'augmentation du volume des tissus, tandis que la kinétine a provoqué des craquelures transversales de l'haustorium et même des sections plus ou moins profondes allant jusqu'à la séparation de l'embryon en deux parties.

Lorsqu'au milieu de base nous avons ajouté du lait de coco (100 ‰) et de la kinétine ( $1.10^{-6}$ ), les embryons ont poursuivi leur développement normal en jeunes plantes. Les milieux les plus favorables à une dédifférenciation des tissus renfermaient, en plus du milieu de base, du lait de coco, du 2.4-D, de la kinétine et de l'hydrolysate de caséine.

B. Avec les embryons de *graines fraîches*, la kinétine n'a pas eu les mêmes effets que précédemment. Elle a stimulé l'augmentation du volume et la dédifférenciation des tissus. De même, le lait de coco ici n'était plus indispensable et il a pu être remplacé par un ensemble de substances complémentaires (vitamines et acides aminés). La meilleure concentration en 2.4-D était de  $1.10^{-6}$  et celle en kinétine 0,5 à  $1.10^{-6}$ .

Le milieu auquel ont abouti ces premières recherches a été indiqué au paragraphe précédent. Dans ce milieu, la dédifférenciation des tissus de l'embryon commençait dès la première semaine de culture. L'ensemble de l'embryon augmentait de diamètre; l'haustorium devenait jaune à brun clair et présentait de légères élévations longitudinales.

#### EXPLICATION DE LA PLANCHE

Fig. A. — Embryons de Palmier à huile après 25 jours de culture en présence d'un milieu renfermant  $1.10^{-6}$  de 2.4-D et  $1.10^{-6}$  de kinétine.

Fig. B et C. — Après 6 mois de culture. Augmentation préférentielle du diamètre au niveau du pétiole p ou du limbe cotylédonnaire h ;

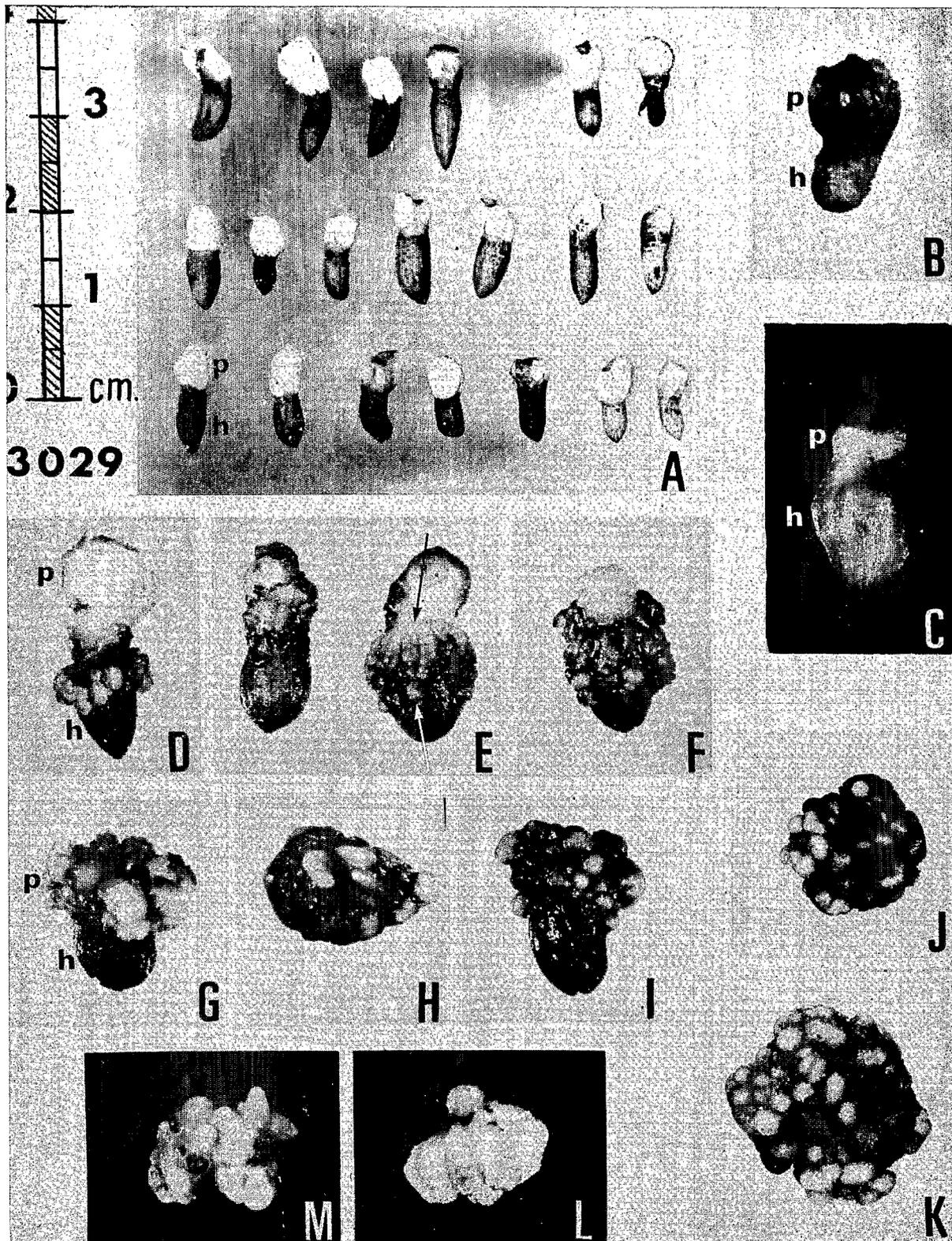
Fig. D, E, F. — Apparition de nodules à la surface du limbe ou haustorium h, selon un certain alignement (flèche).

Fig. G, H, I, J. — Apparition de nodules au niveau du pétiole p.

Fig. K. — Chaque nodule réensemencé donne une colonie de nodules semblables.

Fig. L. — En présence d'acide ascorbique le brunissement est moins important.

Fig. M. — On obtient une colonie de nodules qui verdissent à la lumière et peuvent former des racines (embryoïdes) en présence d'AIA et d'acide ascorbique.



Après 20 à 25 jours de culture le diamètre de l'embryon a atteint 2 à 3,5 mm. L'haustorium ou limbe cotylédonnaire (h, *fig. A*) était plus coloré que le pétiole cotylédonnaire p à la surface duquel on commençait à apercevoir, à la loupe, de petits appendices allongés, constitués de cellules grossièrement empilées les unes sur les autres. Ce phénomène précédait le plus souvent une prolifération cellulaire plus généralisée des tissus.

L'accroissement régulier du diamètre de l'embryon était rare ; il affectait surtout le pétiole (p, *fig. B* et *G*) ou surtout le limbe cotylédonnaire (h, *fig. C*).

Après deux ou trois mois de culture, le limbe a continué en général à brunir, tandis que des nodosités blanches crevaient la surface en commençant par la région la plus proche du pétiole cotylédonnaire (*fig. D, E* et *F*).

L'examen cytologique des tissus après 6 mois de culture nous a permis de constater que la plupart des haustoriums bruns ayant des nodosités blanches étaient creux par suite d'une désagrégation de leur parenchyme interne. Les nodules se formaient surtout à partir du pseudo-cambium entourant chaque faisceau libéro-ligneux, ce qui explique leurs alignements longitudinaux à la surface de l'haustorium (flèche, *fig. E, F*). Au contraire, les nodules apparus sur le pétiole cotylédonnaire semblaient avoir une origine quelque peu différente, car leur formation irrégulière ne semblait pas se réaliser de préférence à partir de régions méristématiques.

Lorsque les deux parties de l'embryon : limbe et pétiole ont été ensemencées séparément, la production de nodules a été bien plus importante qu'avec les embryons entiers (*fig. J*) et le repiquage de chaque nodule a abouti à la formation d'une colonie de nodules semblables (*fig. K*).

Nous inspirant des travaux de Pillai et Hildebrandt<sup>(6)</sup>, nous avons ensemencé chaque nodule sur un milieu gélosé dans lequel le 2.4-D et la kinétine étaient remplacés par de l'acide  $\beta$  indolyl acétique  $1.10^{-6}$ . Certains ont alors produit des masses de tissus inorganisés (*fig. L*) et d'autres de nouvelles colonies de nodules (*fig. M*). L'addition d'acide ascorbique ( $200.10^{-6}$ ) et d'AIA ( $1.10^{-6}$ ) a provoqué alors l'apparition de nombreuses racines dont la croissance n'a pas excédé 2 à 3 mm. D'autre part l'exposition à la lumière 9 h par jour, amenait un verdissement des nodules racinés, mais non la production de feuilles.

Les nodules racinés étaient donc absolument comparables aux nodules néoformés ou embryoïdes décrits par Johri et Seghal<sup>(4)</sup> dans leurs cultures de tissus d'*Anethum graveolens* L. et aux premiers stades des embryons adventifs des tissus de Carotte observés par Reinert<sup>(9)</sup>.

CONCLUSIONS. — La culture d'embryons de Palmier à huile sur un milieu renfermant des éléments minéraux selon Heller, du saccharose et des substances complémentaires, en particulier du 2.4-D, de la kinétine et de l'hydrolysate de caséine, conduit à un arrêt du développement et à une dédifférenciation des tissus. Les embryons de graines fraîches sont plus sensibles que ceux de graines âgées.

Des nodules se forment qui, réensemencés individuellement en présence d'acide ascorbique et d'AIA, donnent des colonies de nodules semblables pourvus de racines et qui verdissent à la lumière, mais ne produisent pas de feuilles. Il est possible que

le développement de la partie aérienne de tels embryoides soit inhibée par celui des racines, comme on l'observe très souvent chez les embryons normaux en culture *in vitro*.

(\*) Séance du 8 juin 1970.

(1) R. J. GAUTHERET, *La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations*, Masson, Paris, 1959, 963 pages.

(2) J. E. GRAEBE et G. D. NOVELLI, *Exp. Cell. Res.*, 41, 1966, p. 521-534.

(3) R. HELLER, *Am. Sc. nat.*, 11<sup>e</sup> série, Bot. et Biol. vég., 14, 1953, p. 1-219.

(4) B. M. JOHRI et C. B. SEHGAL, *Nature (G. B.)*, 205, n<sup>o</sup> 4978, 1965, p. 1337.

(5) E. MAEDA, *Crop Sc. Soc. Japan Proc.*, 36, 1967, p. 233-239.

(6) S. K. PILLAI et A. C. HILDEBRANDT, *Amer. J. Bot.*, 56, 1, 1969, p. 52-58.

(7) H. RABÉCHAULT, *Oléagineux*, 17<sup>e</sup> année, 10, 1962, p. 757-764.

(8) H. RABÉCHAULT, *Comptes rendus*, 264, Série D, 1967, p. 276-279.

(9) J. REINERT, *Planta*, Berlin, 53, 1959, p. 318-333.

(10) E. J. TRIONE, L. E. JONES et R. J. METZGER, *Am. J. Bot.*, 55, 1968, p. 529-531.

(11) Y. YAMADA, K. TANAKA et E. TAKAHASHI, *Proc. Jap. Acad.*, 43, 1967, p. 156-160.

(12) M. YATAZAWA, K. FURUHASHI, N. KURIHARA et Y. OHNISHI, *Soil Sc. and Plant Nutr.*, 14, 1968, p. 85-88.

(Physiologie Végétale, Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM,  
70-74, route d'Aulnay, 93-Bondy, Seine-Saint-Denis.)