

**RECHERCHES SUR LA CULTURE « IN VITRO »
DES EMBRYONS DE PALMIER A HUILE
(*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ. var. *Dura*)
V. — EFFETS DU GLUCOSE, DU LÉVULOSE, DU MALTOSE
ET DU SACCHAROSE**

M^{me} J. BUFFARD-MOREL

Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (ORSTOM)

Les embryons en culture « in vitro » ont besoin, dans les premiers stades de leur développement, d'une source de carbone ; les sucres utilisés à cet effet sont nécessaires en tant que substrat pour le métabolisme et ils servent de plus au maintien de la pression osmotique dans les milieux (RIETSEMA, SATINA et BLAKESLEE [17] ; VEEN [21] ; RAGHAVAN et TORREY [16]).

D'après les résultats obtenus, RAGHAVAN [15] estime que les éléments minéraux et le sucre sont les constituants majeurs pour la culture des embryons parvenus à maturité ou proches de ce stade, l'immaturité nécessitant un milieu plus complexe.

Les études comparatives entre sucres ont montré généralement la supériorité du saccharose (STEINBERG [19] ; HALL [7] ; RIJVEN [18] ; MAUNEY [11]) ; cependant on a pu constater que le glucose égalait le saccharose dans la culture des embryons de *Carex* (LEE [10]), de *Gingko* (BALL [2]) et de pin (RADFORTH et PEGORARO [14]) ; le maltose de même a permis une croissance satisfaisante des embryons de *Capselle* (RIJVEN [18]) et le lévulose a favorisé l'allongement des embryons de tabac (STEINBERG [19]) et de riz (AMEMIYA, AKEMINE et TORIYAMA [1]) bien que l'on ait signalé avec ce sucre une augmentation des nécroses chez l'embryon de cotonnier (MAUNEY [11]).

DOERPINGHAUS [6] a constaté que la valeur nutritive d'un sucre dépendait de l'espèce cultivée. Sur les dix espèces de *Datura* étudiées, le saccharose ne favorisait pas toujours la croissance des embryons, le glucose et le lévulose donnaient dans certains cas de meilleurs résultats.

La concentration optimale en sucre se situe généralement entre 1 et 2 p. 100 pour les embryons parvenus à maturité ou proches de ce stade (RADFORTH et PEGORARO [14] ; LEE [10] ; RIETSEMA, SATINA et BLAKESLEE [17] ; HUSSEY [8] ; BALL [2] ; DAVIS [5]).

La quantité de glucide introduite dans les milieux a une grande importance chez les jeunes plantes pour le maintien correct du rapport tige/racine (RAGHAVAN [15] ; IOFFE et ZHUKOVA [9]). En effet, une augmen-

tation de la concentration contribue au développement du système racinaire et une basse concentration intensifie la croissance des feuilles (RIETSEMA et coll. [17] ; RAGHAVAN [15]).

Il n'existe à notre connaissance aucune étude concernant l'action des différents sucres sur le développement de l'embryon de palmier à huile. HUSSEY [8] a utilisé le saccharose à 2 p. 100 et le milieu de White gélosé, mais il a obtenu une croissance lente et les plantules étaient incomplètes sans feuilles ou sans racines. BOUHARMONT [3] a essayé divers milieux mais en employant toujours le glucose à 5 p. 100. Enfin, plus récemment, BOUVINET et RABÉCHAULT [4] pour étudier l'effet des auxines ont utilisé le milieu de White gélosé additionné de vitamines et de saccharose à 3 p. 100.

Il a donc semblé intéressant de préciser les tolérances et les besoins exacts en sucre des embryons de palmier à huile.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les embryons ont été extraits aseptiquement de graines de palmier à huile de la variété *Dura* Deli, issues de fécondations libres et récoltées à la Station de recherches I. R. H. O. de La Mé (Côte d'Ivoire).

L'hétérogénéité des résultats constatés par BOUVINET et RABÉCHAULT [4] était due en grande partie à l'utilisation de graines « tout venant » et trop sèches. On a donc été amené à modifier la méthode de préparation : les graines issues d'un même régime ont été réhumidifiées jusqu'à une teneur globale de 17 p. 100 par rapport à la matière sèche, puis elles ont été stockées en sac de polyéthylène pendant 10 jours à 27° et à l'obscurité jusqu'à l'isolement des embryons.

De plus, le milieu de White pauvre en phosphore a été remplacé par celui de Heller ; une première série d'expériences a été réalisée avec le glucose, le lévulose, le maltose et le saccharose aux concentrations suivantes : 0,5, 1, 2, 3 et 4 p. 100.

23 MAI 1986

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 20 202

Cote : B.

20 JAN. 1989

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

Collection de Référence

n° 66

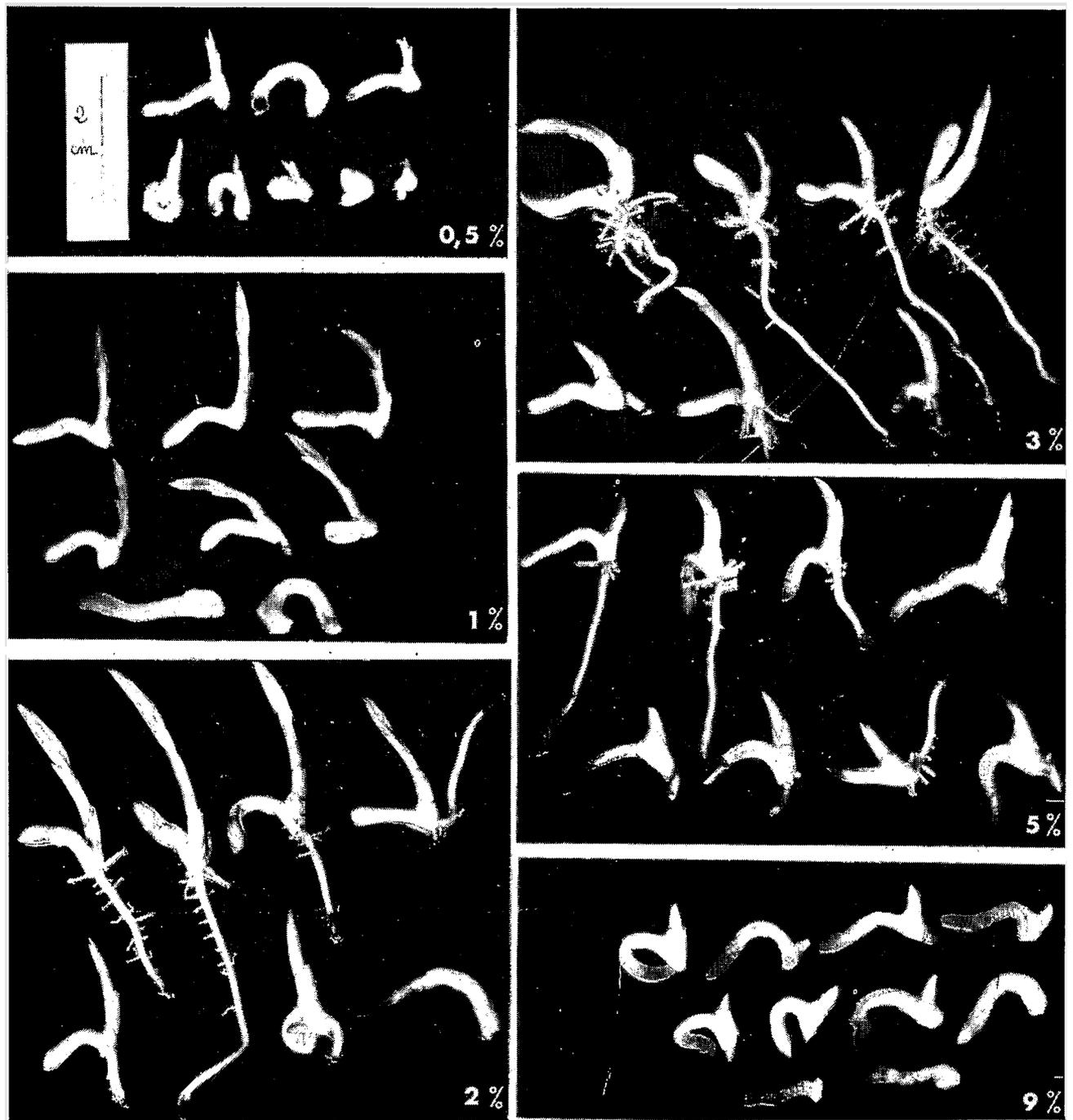


Planche I. — Plantules obtenues après un mois et demi de culture sur milieu de Heller enrichi plus ou moins en saccharose.

Comme le pourcentage et l'allongement des racines restaient valables avec le saccharose à 4 p. 100, une deuxième série d'expériences a été réalisée avec ce sucre en augmentant les concentrations jusqu'à 9 p. 100.

Le pH a été ajusté à 5,6 et les tubes de culture ont été aérés sur clinostat tournant à 20 t/m dans une salle climatisée à 27° et soumis 9 h par jour à un éclairage de 6 000 lux.

RÉSULTATS

1) Comparaisons entre les effets du glucose, du lévulose, du maltose et du saccharose.

La morphologie de l'embryon a été décrite par VALLADE [20]. L'embryon excisé est formé de deux parties : le pétiole cotylédonaire qui renferme ébauches foliaires et zone radiculaire et le limbe cotylédonaire, ce dernier faisant fonction d'haustorium dans la graine.

Sur milieu liquide aéré, le pétiole et le limbe cotylédonaire se sont développés plus ou moins suivant les sucres et les concentrations utilisées. Le lévulose a donné les moins bons résultats et a favorisé les déformations et les craquelures.

La longueur totale de l'embryon, faible avec 0,5 p. 100 de sucre, augmentait régulièrement jusqu'à 2 p. 100 pour le saccharose et jusqu'à 3 p. 100 pour le glucose ; le maltose n'a donné de réponses valables qu'à partir de 3 p. 100 (fig. 1).

L'analyse de la variance réalisée sur la longueur des embryons en cours de culture a montré que les différences entre les concentrations étaient significatives à partir du 20^e jour, à l'exception de celles obtenues avec le lévulose.

La chlorophylle s'est formée rapidement au niveau du pétiole cotylédonaire, sauf en présence du lévulose.

Le limbe cotylédonaire par contre a été beaucoup plus sensible à la nature du sucre et à la concentration utilisée : à partir de 2 p. 100 de glucose et de 4 p. 100 de saccharose, il a bruni et s'est nécrosé dans certains cas,

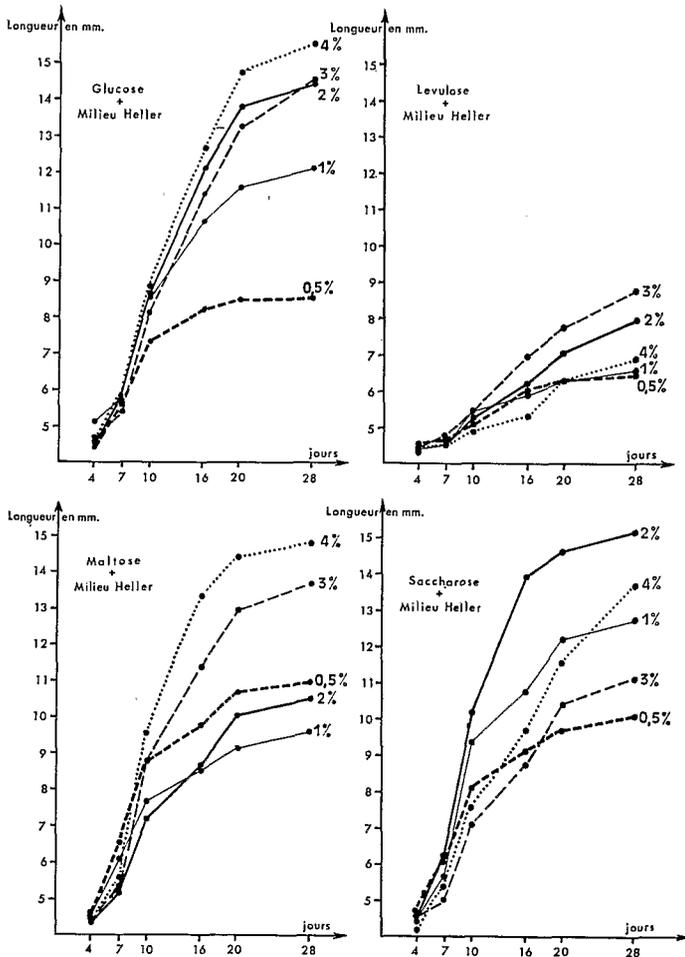


FIG. 1. Action du glucose, du lévulose, du maltose et du saccharose sur l'allongement embryonnaire en cours de culture.

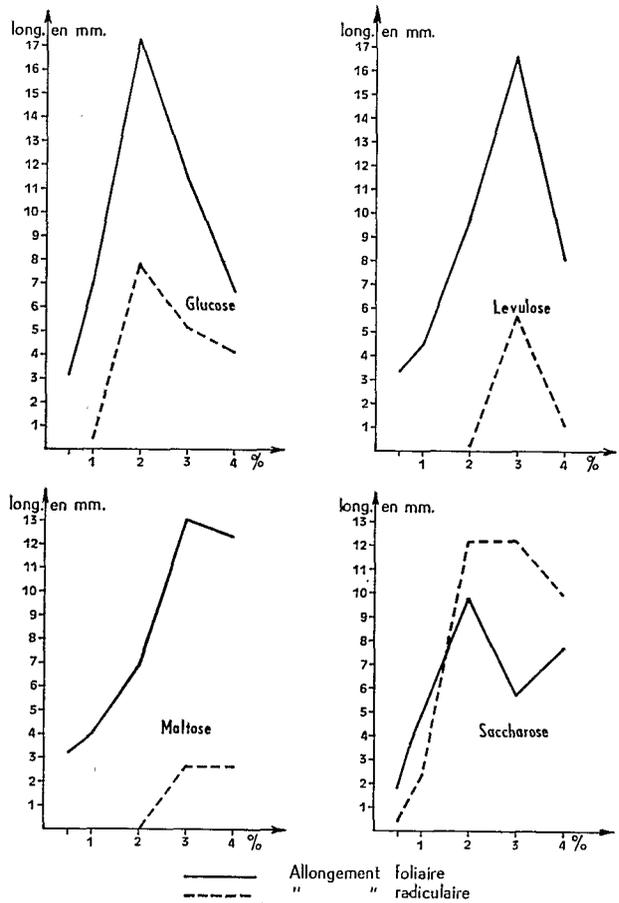


FIG. 2. Allongements foliaire et radicaire obtenus avec les sucres étudiés et après un mois et demi de culture.

ce qui n'a nullement provoqué l'arrêt du développement foliaire mais semble avoir perturbé parfois la croissance des racines ; il a pris, en présence de maltose, une coloration très foncée dans la majorité des cas. Cette coloration a atteint tous les embryons avec le lévulose. La sensibilité du limbe cotylédonaire à la concentration en sucre était due sans doute à sa constitution spongieuse et à ses fonctions dans la graine. Il faut remarquer toutefois qu'il n'avait pas le même aspect en culture « in vitro » : il restait généralement mince comme le pétiole ou légèrement plus épais et n'atteignait en principe que le tiers de la longueur totale de l'embryon.

Apparition des feuilles et des racines.

Elles sont apparues à partir du quinzième jour. En présence de lévulose, des déchirures se sont formées au niveau de la fente cotylédonaire lors du passage des feuilles ; avec les autres sucres, les feuilles se sont développées normalement. Les racines, par contre, ont été plus sensibles à la nature du sucre et à sa concentration, le maltose et le lévulose n'ont pas favorisé la rhizogenèse.

Les **allongements foliaires** maximaux ont été obtenus avec 2 p. 100 de glucose et de saccharose, 3 p. 100 de lévulose et de maltose.

Les **racines** atteignent leur croissance maximale avec 2 p. 100 de glucose, 3 p. 100 de lévulose, 3 et 4 p. 100 de maltose et 2 p. 100 de saccharose (fig. 2).

L'analyse de la variance réalisée sur les allongements foliaires et radiculaires pour chaque dose et après un mois de culture a montré que les différences étaient significatives entre les concentrations pour les longueurs foliaires mais non pour les allongements radiculaires. A partir de 3 p. 100 les réponses obtenues avec le glucose ont diminué et à 4 p. 100 des phénomènes toxiques se sont manifestés. Le saccharose ayant permis encore à 4 p. 100 l'obtention d'un pourcentage élevé de racines, on a effectué de nouvelles expériences avec des concentrations plus élevées.

TABLEAU I

Apparition de la première feuille et de la racine

Concentration en saccharose (en p. 100)	12 ^e jour		Pourcentages observés en cours de culture au :									
			15 ^e jour		19 ^e jour		25 ^e jour		50 ^e jour			
	F	R	F	R	F	R	F	R	F	R		
0,5	25	0	33	0	50	16	75	50	75	50		
1	14	0	50	14	71	57	78	71	78	71		
2	23	8	61	54	85	85	85	92	100	100		
3	3	15	61	61	85	92	92	92	92	92		
4	0	0	20	7	87	27	87	67	93	80		
5	0	0	14	0	64	57	100	57	100	78		
6	0	0	7	13	60	40	80	60	80	73		
7	0	0	14	0	43	28	71	28	86	50		
8	0	0	13	0	33	13	53	27	67	60		
9	0	0	0	7	7	7	50	36	78	57		

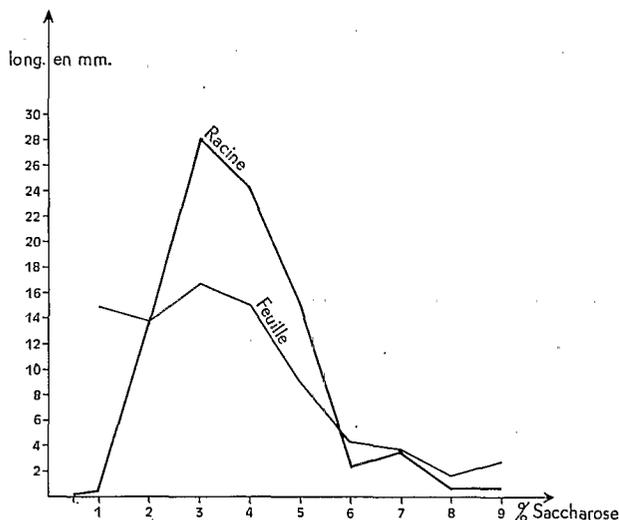


FIG. 3. Développements foliaire et radiculaire après un mois et demi de culture sur milieu de Heller enrichi plus ou moins en saccharose.

2) Expériences complémentaires avec le saccharose.

Dix traitements avec des concentrations en saccharose de 0,5 à 9 p. 100 ont été expérimentés. Au cours de ces essais, on a observé un retard dans la différenciation embryonnaire qui augmentait très nettement avec la concentration comme on peut le constater sur le tableau I.

L'augmentation de la longueur embryonnaire nette jusqu'à 2 p. 100 a été variable ensuite et non significative. Le pétiole cotylédonaire a conservé une coloration verte jusqu'à 4 p. 100 mais il est resté blanc-jaune aux concentrations supérieures et pendant toute l'expérience. Le limbe cotylédonaire a bruni intensément à partir de 4 p. 100 ; craquelures et nécroses sont devenues fréquentes aux fortes concentrations et elles ont même provoqué dans certains cas la séparation de l'embryon en 2 parties.

C'est à 2 et 3 p. 100 que les allongements foliaires et radiculaires ont été les plus rapides et les plus importants (fig. 3) et l'on peut dire qu'aucune amélioration n'a été apportée par l'augmentation des concentrations (Planche I). A 8 et 9 p. 100 si les feuilles étaient encore présentes, les racines par contre étaient ou bien inhibées ou bien nécrosées sur les quelques millimètres qui apparaissaient.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'hydratation des graines suivie d'un stockage pendant 10 jours jusqu'à l'expérience a donné des résultats très satisfaisants ; elle a provoqué une plus grande uniformité de ceux-ci en permettant la mise en activité des processus enzymatiques avant le passage sur le milieu de culture et en évitant souvent les déformations embryonnaires qui peuvent se produire lors de la réhydratation brutale de l'embryon en milieu liquide.

La valeur nutritive des sucres envisagés a été très variable ; les plus mauvaises réponses ont été obtenues avec le lévulose qui a empêché la rhizogenèse et favorisé les nécroses. Le maltose venait ensuite ; bien qu'il ait provoqué un allongement embryonnaire et un développement foliaire intéressant à 3 et 4 p. 100, il n'a pas permis la croissance des racines. Le glucose, par contre, a donné à 2 p. 100 des réponses très satisfaisantes concernant notamment le développement foliaire ; seul le brunissement intense du limbe cotylédonaire a empêché de l'adopter pour les cultures.

La qualité du saccharose est due sans doute à sa facilité de phosphorylation (OVERBEEK, SIU et HAAGEN-SMIT [13]). Bien que certaines expériences aient mis en évidence des allongements foliaires et radiculaires maximaux à 2 p. 100, on a retenu plutôt la dose de 3 p. 100 car elle a permis d'obtenir très souvent des racines plus vigoureuses et plus ramifiées ; cette concentration, de plus, donne encore la possibilité au limbe cotylédonaire de conserver une coloration verte ou brun très clair.

Il faut remarquer que les sucres peuvent intervenir

non seulement en tant que métabolites mais aussi en modifiant la pression osmotique des milieux. C'est ce qui sera envisagé dans une prochaine étude sur les embryons de palmier à huile.

Après trois mois de culture, les plantes obtenues ont été transplantées avec succès sur solution minérale aérée puis sur sable et enfin sur terreau (RABÉCHAULT, non publié).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] AMEMIYA, AKEMINE, TORIYAMA. — *Bull. Nat. Inst. Ag. Sci.* 6, p. 1-40, 1956.
- [2] BALL E. — *Amer. J. Bot.*, 43, p. 488-495, 1959.
- [3] BOUHARMONT P. — *Agricultura*, 7, 3, p. 297-323, 1959.
- [4] BOUVINET J. et RABÉCHAULT H. — *Oléagineux*, 20^e année, 18, p. 79-87, 1965.
- [5] DAVIS D. R. — *New Phytol.*, 59, p. 9-14, 1960.
- [6] DOERPINGHAUS S. L. — *Thesis Smith College*, Northampton, Massachusetts, p. 1-62, 1948.
- [7] HALL C. B. — *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 52, p. 343-346, 1948.
- [8] HUSSEY G. — *Ann. Bot.* 22, 86, p. 259-284, 1958.
- [9] IOFFE M. D., ZHUKOVA G. Ja. — *Bot. Zh.*, 50, 8 p. 1157-1182, 1965.
- [10] LEE A. E. — *Bull. Torrey Bot. Club*, 79, 1, p. 59-62, 1952.
- [11] MAUNEY J. R. — *Bot. Gaz.*, 122, 3, p. 205-209, 1961.
- [12] NARAYANASWAMI S., NORSTOG K. — *Bot. Review*, 30, 4, p. 587-628, 1964.
- [13] OVERBEEK J., SIU R., HAAGEN-SMIT A. J. — *Amer. J. Bot.*, 31, p. 219-224, 1944.
- [14] RADFORTH N. W., PEGORARO L. C. — *Trans. Roy. Soc. Canada*, 49, 69-82, 1955.
- [15] RAGHAVAN V. — *Biol. Rev.*, 41, 1, p. 1-53, 1966.
- [16] RAGHAVAN V., TORREY J. G. — *Amer. J. Bot.*, 50, 6, p. 540-551, 1963.
- [17] RIETSEMA J., SATINA S., BLAKESLEE A. F. — *Amer. J. Bot.*, 40, p. 538-545, 1953.
- [18] RIJVEN A. H. G. C. — *Acta Bot. Neerl.*, 1, 2, p. 158-200, 1952.
- [19] STEINBERG R. A. — *J. Agric. Res.*, 75, 3, p. 81-92, 1947 a.
- [20] VALLADE J. — *C. R. Acad. Sci.*, 262, p. 856-859, 1966.
- [21] VEEN H. — *Acta Bot. Neerl.*, 12, 2, p. 129-171, 1963.

Extrait de *Oléagineux*, 23^e année, N° 12, Décembre 1968, p. 707-711.