

RECHERCHES SUR LA CULTURE *IN VITRO* DES EMBRYONS DE PALMIER A HUILE (*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ. VAR. *DURA* BECC.)

VII. COMPARAISON DE DIVERS MILIEUX MINÉRAUX

H. RABÉCHAULT, G. GUÉNIN, J. AHÉE

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

Dès le début de nos travaux, en 1962, nous avons adopté pour nos milieux de culture des proportions en éléments minéraux correspondant à la formule de WHITE [17, 18]. C'était, avec celle de KNOP [5], la plus fréquemment citée dans la littérature relative aux cultures de tissus et d'organes. Nous pensions alors que, pour les embryons de palmier à huile gorgés de matières de réserve, la nutrition minérale était moins importante au cours des premiers stades de leur développement que la nutrition hydrocarbonée ou que les effets des substances de croissance.

Or, ayant à plusieurs reprises utilisé d'autres équilibres d'éléments minéraux, il nous a semblé que ceux-là provoquaient un meilleur développement, de sorte que l'étude de la nutrition minérale a pris de plus en plus d'importance à nos yeux.

Le présent travail est une première étape dans ce domaine. Il a consisté à comparer six solutions nutritives minérales différentes :

- 1) celle mise au point par HELLER [2] pour la culture des tissus végétaux ;
- 2) la formule C₁ de HOAGLAND et ARNON [4] qui convient à de nombreux végétaux en culture hydroponique ;
- 3) celle de KNOP [5] utilisée pour les études sur la germination et la culture de plantes, d'embryons, d'organes ou de tissus ;
- 4) celle de RANDOLPH et COX [12] ;
- 5) celle d'OLSEN modifiée par RIJVEN [4] ;
- 6) celle de WHITE [17, 18] très utilisée par les auteurs anglo-saxons et que cet auteur a mise au point pour la culture des racines isolées.

Ces trois dernières solutions sont les plus souvent citées dans la littérature relative à la culture *in vitro* des embryons [RAPPAPORT 13].

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des graines de palmier à huile DA 40 récoltées à la Station I. R. H. O. de Pobé (République du Dahomey) par MM. BÉNARD et MALINGRAUX (que nous tenons à remercier vivement à cette occasion) ont été réhumidifiées jusqu'à une teneur en eau de 17 p. 100 par rapport à la matière sèche, puis stockées pendant 12 jours à l'obscurité à 27 °C dans un sac en polyéthylène.

Les embryons ont été alors prélevés aseptiquement et cultivés sur des milieux gélosés selon des techniques décrites précédemment [RABÉCHAULT 9] à raison de 24 embryons par traitement. L'expérience a été recommencée 7 fois (répétitions).

Les six milieux utilisés ne différaient que par leurs éléments minéraux (macro-éléments), dont la composition est indiquée dans le tableau I. Ils renfermaient tous les mêmes substances complémentaires : gélose (8 p. 1 000), saccharose (20 p. 1 000), oligo-éléments, acide glutamique, thiamine et pantothénate de calcium, selon les proportions définies précédemment [RABÉCHAULT 9]. Le pH a été amené à 5,8 avant l'addition de la gélose.

TABLEAU I

**Composition des milieux minéraux utilisés
(le poids des sels est en mg/l de solution)**

Sels	HELLER	HOAGLAND et ARNON	KNOP	RANDOLPH et COX	RIJVEN	WHITE
(NO ₃) ₂ Ca. 4 H ₂ O ...			1 000		168	200
(NO ₃) ₂ Ca		820		236,8		80
NO ₃ K		505	250	85	149	
NO ₃ Na	600					
Cl ₂ Ca. 2 H ₂ O	75					
ClK	750			65		6,5
PO ₄ H ₂ K		136	250		23	
PO ₄ H ₂ Na. H ₂ O	125					
PO ₄ H ₂ Na. 2 H ₂ O						16,5
(PO ₃ Na) ⁶				10		
SO ₄ Mg 7 H ₂ O	250	240	250	36	101	360
SO ₄ Na ₂						200
Total	1 800	1 701	1 750	432,8	441	921

23 MAI 1986
O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

No : 20 204

Cote : B

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

Collection de Référence

10 DEC. 1970

no 44224/66

L'examen du tableau I permet de constater que la quantité totale de sels par litre est deux à quatre fois plus importante pour les solutions de HELLER, HOAG-

LAND et KNOP que pour les trois autres. Les équilibres ioniques de ces solutions ont été consignés dans le tableau II.

TABLEAU II
Équilibres ioniques de solutions minérales
(les milliéquivalents n'ont pas été arrondis à l'unité supérieure)

	HELLER		HOAGLAND et ARNON		KNOP		RANDOLPH et COX		RIJVEN		WHITE	
	Mé	p. 100 des anions	Mé	p. 100 des anions	Mé	p. 100 des anions	Mé	p. 100 des anions	Mé	p. 100 des anions	Mé	p. 100 des anions
NO ₃	7,1	30,7	15,0	75,3	11,0	59,4	3,7	74,0	3,0	69,7	3,2	34,4
Cl	11,3	48,9					0,9	18,0			0,1	1,0
PO ₄	2,7	11,6	3,0	15,0	5,5	29,7	0,1	2,0	0,5	11,6	0,3	3,2
PO ₃							0,3	6,0				
SO ₄	2,0	8,6	1,9	9,5	2,0	18,0			0,8	18,6	5,7	61,2
Totaux des anions	23,1		19,9		18,5		5,0		4,3		9,3	
	Mé	p. 100 des cations	Mé	p. 100 des cations	Mé	p. 100 des cations	Mé	p. 100 des cations	Mé	p. 100 des cations	Mé	p. 100 des cations
Na	8,0	37,5					0,1	2,0	0,2	5,1	3,0	32,6
K	10,0	46,9	6,0	33,5	4,3	29,0	1,6	32,7	1,5	38,4	0,9	9,6
Ca	1,3	6,1	10,0	55,8	8,5	57,4	2,9	59,2	1,4	35,8	2,4	26,0
Mg	2,0	9,3	1,9	10,6	2,0	13,5	0,3	6,1	0,8	20,5	2,9	31,5
Totaux des ca- tions	21,3		17,9		14,8		4,9		3,9		9,2	
Rapport an./cat. .	1,07		1,11		1,25		1,10		1,01		1,02	
Mé = milliéquivalents.												

Toutes les solutions ont un bon équilibre anions/cations. L'azote est toujours fourni sous forme nitrrique (30 à 75 p. 100 des anions). Seules les solutions d'HOAGLAND et ARNON et de KNOP ne renferment pas de chlore, celle de RANDOLPH en contient 18 p. 100 et celle de Heller 48,9 p. 100 des anions. Les embryons développés sur les milieux de RANDOLPH et de WHITE risquent de présenter des carences en phosphore car ils ne peuvent en fournir respectivement que 2,0 p. 100 sous forme PO₃ et 3,3 p. 100 sous forme PO₄ [HELLER 2]. Parmi les cations remarquons la présence de

sodium dans les solutions de WHITE 32,6 p. 100 et de HELLER 37,5 p. 100.

Les embryons ensemencés aseptiquement dans des tubes en pyrex (renfermant 7 cm³ de milieu gélosé chacun) ont été cultivés dans une chambre à 27 °C sous des tubes fluorescents « Blanc Lumière du jour de luxe Philips » dispensant un éclairage de 9 000 lux pendant 9 heures par jour.

Ils ont été observés au bout d'un mois et demi de culture en ce qui concerne : le poids frais, le poids sec, les pourcentages des stades de développement, la longueur et le nombre de feuilles et de racines.

RÉSULTATS

I. — COMPARAISON DES MILIEUX MINÉRAUX.

Les photographies de la planche I permettent de comparer l'aspect des jeunes plantes obtenues après 45 jours de culture : les solutions de HELLER, de HOAGLAND et ARNON et de KNOP ont donné les meilleurs résultats (3 photographies du haut).

L'allongement de l'haustorium a été supérieur dans ces trois milieux. L'analyse de la variance (test F de Snedecor) après 45 jours de culture a permis de déterminer que l'ensemble des moyennes obtenues pour chaque traitement était hétérogène (F calculé 8,619 pour F tabulaire 3,20 au seuil de P = 0,01). Tandis que la comparaison de ces moyennes deux à deux à l'aide

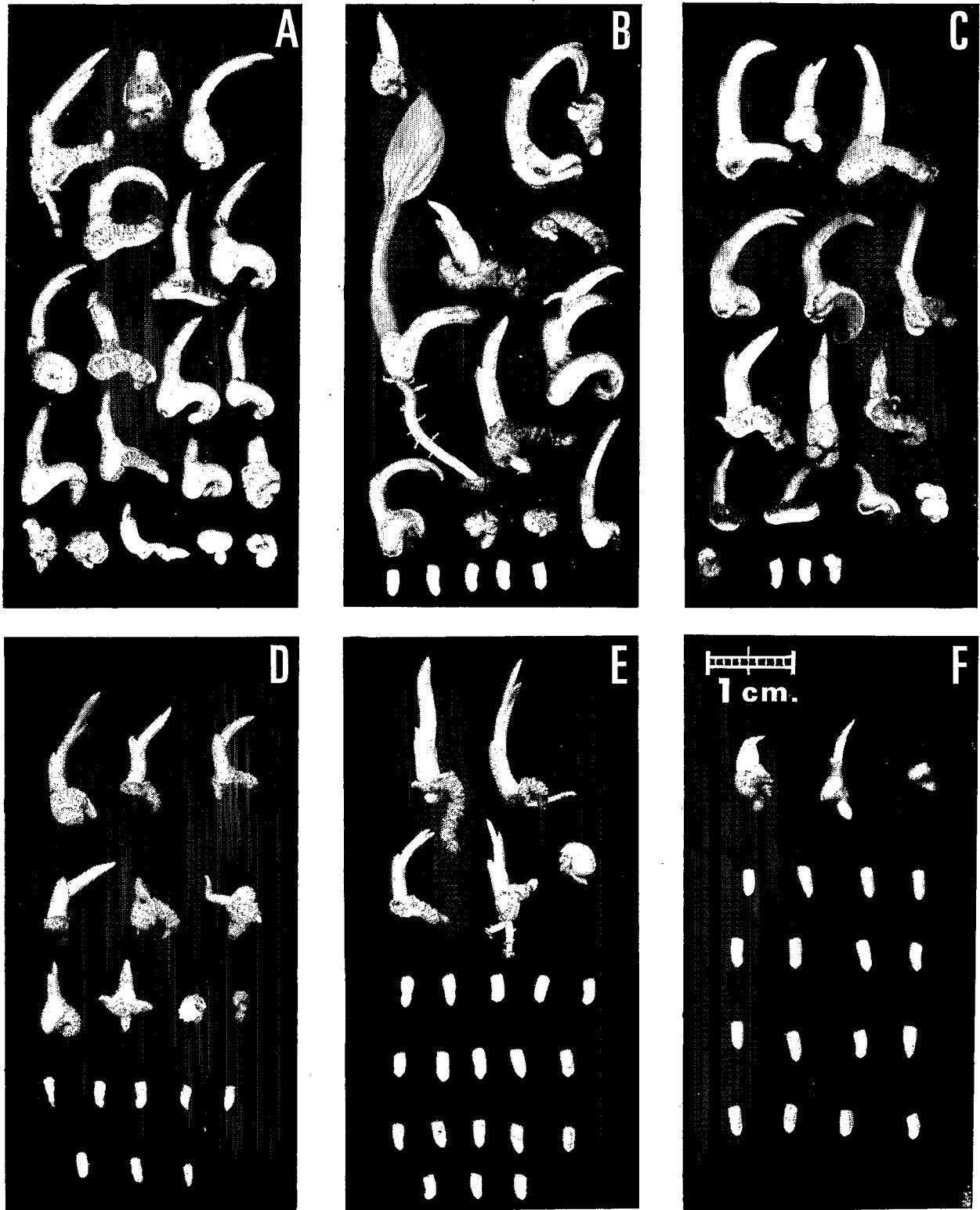


PLANCHE I

Embryons développés en présence d'un milieu de HELLER (A.), HOAGLAND et ARNON (B.),
KNOP (C.), RANDOLPH et COX (D.), RIJVEN (E.) et WHITE (F.)

du test de Keuls a montré qu'elles appartenaient à deux groupes (HELLER-HOAGLAND-KNOP) et (RANDOLPH-RIJVEN-WHITE) qui diffèrent entre eux significativement (Tableau III).

TABLEAU III
Classement des moyennes de l'allongement de l'haustorium à l'aide du test de Keuls

KNOP	HELLER	HOAGLAND
7,94 ± 1,90	7,83 ± 1,44	7,42 ± 1,90
1 ^{er} groupe		
RANDOLPH et COX	RIJVEN	WHITE
4,92 ± 0,91	4,54 ± 1,04	4,03 ± 0,53
2 ^e groupe		

A l'intérieur de chaque groupe les différences constatées ne sont pas significatives.

Le dénombrement des stades de développement est aussi en faveur des traitements du premier groupe. Ainsi qu'il ressort de l'examen des photographies de la planche I : le nombre des embryons qui ne se sont pas développés (stade I) est très important dans le milieu de WHITE (F) et diminue ensuite progressivement dans ceux de RIJVEN (E), RANDOLPH (D), HOAGLAND et ARNON (B), KNOP (C) pour s'annuler dans celui de HELLER (A). Inversement, l'examen du tableau IV dans lequel nous avons consigné les pourcentages d'embryons « différenciés », c'est-à-dire parvenus aux stades III (forme en clou), IV (apparition de la gemmule) et V (apparition de la radicule), étapes de l'évolution certaine vers la formation d'une jeune plante, montre la supériorité des solutions de HELLER, d'HOAGLAND et ARNON et de KNOP sur les trois autres.

La comparaison de ces pourcentages à l'aide du test χ^2 au seuil de probabilité de 0,05 conduit encore ici à distinguer les deux groupes principaux précédents auxquels vient s'ajouter un troisième groupe constitué par les milieux de HOAGLAND, RANDOLPH et RIJVEN. Les différences sont très significatives entre chaque groupe, tandis qu'elles ne le sont pas à l'intérieur de chacun d'eux. Le troisième groupe vient donc chevaucher sur les deux autres. (Tableau IV — les accolades indiquent les limites entre lesquelles les différences ne sont pas significatives.)

TABLEAU IV

Pourcentages d'embryons « différenciés » classés à l'aide du test χ^2

HELLER	KNOP	HOAGLAND	RIJVEN	WHITE
76,19 %	75,00 %	56,25 %	17,39 %	15,78 %
RANDOLPH et COX				
47,05 %				

Les autres caractères et mesures relevés : le poids frais, le poids sec, nombre de feuilles, la hauteur de la partie aérienne donnent la même supériorité aux solutions de HELLER, HOAGLAND et KNOP. Cependant,

en ce qui concerne la longueur des racines, le milieu de WHITE vient remplacer le milieu de KNOP dans le groupe de tête (Tableau V). Le nombre de racines pour 100 embryons, tout en restant en faveur de la solution de HELLER, ne présente pas de différences significatives entre les traitements et semble donc échapper dans une certaine mesure à l'influence du milieu minéral (Tableau V).

TABLEAU V

Rhizogenèse des embryons après 45 jours de culture

	HELLER	HOAGLAND	KNOP	RANDOLPH et COX	RIJVEN	WHITE
Nombre de racines pour 100 embryons mis en culture	36,17	35,00	10,90	22,95	24,19	23,72
Longueur de la racine principale en mm	14,14	9,67	8,41	7,78	8,07	10,38

II. — COMPARAISON DES SOLUTIONS A CONCENTRATIONS ÉGALES.

Il nous a semblé que la supériorité des solutions de HELLER, HOAGLAND et KNOP était davantage le fait de leur plus forte concentration en sels que des différences entre leurs équilibres ioniques. Ainsi, (Tableau I) on peut remarquer que ces solutions renferment deux à quatre fois plus de sels que celles de RANDOLPH, RIJVEN et WHITE.

Nous avons donc mis en place une seconde série d'expériences dans laquelle les trois solutions les plus faibles ont été amenées à la même concentration que celle de HELLER prise comme témoin (le poids de chaque sel ayant été multiplié par un coefficient de dilution, calculé par rapport à cette dernière (Tableau VI).

TABLEAU VI

Solutions	Concentration normale en mg/l	Coefficient x pour chaque sel	Concentration de la solution après correction
HELLER . .	1 800,0	0	1 800,00
RANDOLPH et COX . .	432,8	4,158	1 799,57
RIJVEN . . .	441,0	4,081	1 799,70
WHITE . . .	921,5	1,953	1 799,96

Les embryons ont été extraits à partir de graines de même origine et traitées de la même manière que celles des expériences précédentes. Les observations ont été faites après trois mois de culture.

a) Allongement de l'embryon (haustorium + pétiole cotylédonaire).

Les moyennes obtenues avec leurs intervalles de confiance sont consignés dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Répétitions	HELLER	RANDOLPH et COX	RIJVEN	WHITE
N° 1	12,97 ± 2,76	10,52 ± 1,61	12,36 ± 3,79	9,75 ± 1,21
N° 2	10,25 ± 3,15	10,71 ± 4,27	12,05 ± 1,97	9,97 ± 2,42
N° 3	10,92 ± 2,33	10,66 ± 2,96	10,48 ± 2,57	9,95 ± 1,81

A l'examen, bien que les résultats obtenus avec le milieu de WHITE semblent légèrement inférieurs aux autres, l'analyse de la variance (Test F de Snedecor) effectuée sur les moyennes des trois répétitions n'a pas permis de mettre en évidence des différences significatives.

b) Dénombrement des stades.

Comme dans les expériences de la partie précédente, les pourcentages des stades III, IV et V ont été cumulés (p. 100 d'embryons différenciés) et le test χ^2 appliqué n'a pas permis de déterminer ici encore de différence significative entre les quatre solutions.

Seuls les pourcentages de stade V (apparition de la racine) marquent un léger avantage en faveur de la solution de HELLER.

c) Allongement de la partie aérienne.

Les longueurs moyennes ont été indiquées dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Répétitions	HELLER	RANDOLPH et COX	RIJVEN	WHITE
N° 1	38,88 ± 21,81	28,64 ± 11,11	55,22 ± 24,35	39,81 ± 12,26
N° 2	38,40 ± 17,00	14,75 ± 12,32	62,27 ± 20,25	47,55 ± 14,55
N° 3	52,73 ± 12,99	26,96 ± 10,39	70,10 ± 30,45	39,09 ± 13,33

L'analyse de la variance a montré que les différences entre les effets des milieux étaient significatives. En outre, le test de Bartlett a indiqué que les trois répétitions de chaque traitement constituaient un groupe homogène. Comme les effets entre chaque traitement étaient significativement différents, nous avons comparé les moyennes deux à deux à l'aide du Test de Duncan afin de déterminer l'efficacité de chaque solution.

La classification (Tableau IX) obtenue indique que le milieu de RIJVEN a été supérieur et celui de RANDOLPH inférieur aux autres, mais pour deux répétitions on a pu remarquer une permutation dans l'efficacité entre les milieux de HELLER et de WHITE, l'un et l'autre peu différents soit du milieu le meilleur (RIJVEN) soit du milieu le moins bon (RANDOLPH).

TABLEAU IX

RIJVEN	HELLER	WHITE	RANDOLPH et COX
	┌──────────┐		
	└──────────┘		

d) Allongement des racines et poids sec : aucune différence significative n'a pu être décelée.

CONCLUSIONS

L'influence de la nutrition minérale sur le développement des embryons a été peu étudiée. Les résultats les plus nombreux ont trait à la nutrition azotée des embryons de graminées (riz) et d'orchidées, très sensibles à l'ion NO_3 [RAGHAVAN 10, RAGHAVAN et TORREY 11, RAPPAPORT 13].

Dans le cas du palmier à huile, il semble que la nutrition minérale joue un rôle non négligeable. Les solutions de HELLER, d'HOAGLAND et ARNON et de KNOP donnent de meilleurs résultats que celles de RANDOLPH et COX, de RIJVEN et de WHITE. Les différences constatées sont hautement significatives entre les deux groupes mais elles ne le sont pas entre les solutions d'un même groupe.

Dans le premier groupe bien que les différences ne soient pas significatives, les résultats sont légèrement en faveur de la solution de HELLER. Les solutions de RANDOLPH et COX, de RIJVEN et de WHITE sont, semble-t-il, trop pauvres en éléments minéraux car lorsque leurs concentrations sont amenées à la même valeur que celle de la solution de HELLER les différences constatées avec cette dernière ne sont plus significatives.

Nous nous proposons de définir si certains ions comme le potassium ou l'ammonium (qui ne figurent pas dans les solutions étudiées ici) ont des effets sur l'organogenèse comme chez les cultures de tissus et d'apex végétaux [MOREL 7, 8].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GAUTHERET R. J. (1959). — La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations (Masson et Cie Edit.), 864 pp., Paris.
- [2] HELLER R. (1953). — Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. nat., Bot.*, 11^e sér., XIV, pp. 1-223.

- [3] HELLER R. (1965). — In : « Trav. dédiés à L. Plantefol », Masson Edit. Paris, pp. 499-520.
- [4] HOAGLAND D. R., D. I. ARNON (1938). — Calif. agric. exp. Sta. Circ. 347, pp. 1-39.
- [5] KNOP W. (1865). — *Landw. Versuchs-Stat.*, 7, pp. 98-107.
- [6] LIPTZ J. (1965). — Proc. Inter. Conf. Plant Tissue Culture Penn. State Univ., 1965, pp. 69-76.
- [7] MOREL G. (1964). — *Rev. Cytol. et Cytophysiol. vég.*, 27, pp. 307-314.
- [8] MOREL G. (1965). — *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.*, 11, 3, pp. 213-224.
- [9] RABÉCHAULT H. (1962). — *Oléagineux*, 17, 10, pp. 757-764.
- [10] RAGHAVAN V. (1966). — *Biol. Rev.*, 41, 1, pp. 1-58.
- [11] RAGHAVAN V., J. H. TORREY (1964). — *Amer. J. Bot.*, 51, 3, pp. 264-274.
- [12] RANDOLPH L. F., L. G. COX (1943). — *Proc. amer. Soc. hort. Sci.*, 43, pp. 284-300.
- [13] RAPPAPORT J., (1954). — *Bot. Rev.*, XX, 4, pp. 201-225.
- [14] RIJVEN A. H. G. C. (1952). — *Acta bot. neerl.*, 1, 2, pp. 157-200.
- [15] RIJVEN A. H. G. C. (1958). — *Austral. J. biol. Sci.*, 11, pp. 142-154.
- [16] STREET H. E. — *J. Nation. Cancer Inst.*, USA, 19, 4, pp. 467-494.
- [17] WHITE Ph. R. (1943). — A handbook of plant tissue culture. The Jaques Cattell Press, Lancaster, Pennsylvania, 277 p.
- [18] WHITE Ph. R. (1951). — *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 2, pp. 231-244.

