

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

IX. ACTIVATION DE LA SENSIBILITÉ AU LAIT DE COCO PAR UNE RÉHYDRATATION DES GRAINES

H. RABÉCHAULT, G. GUÉNIN et J. AHÉE

Laboratoire de Physiologie Végétale
des Services Scientifiques Centraux de l'O. R. S. T. O. M.
70, route d'Aulnay, 93-Bondy

Le lait de coco autoclavé, albumen liquide du cocotier, ne peut remplacer tout à fait l'albumen de la noix de palme. Le lait de coco agit mieux en milieu liquide qu'en milieu gélosé et ses effets sont très nettement améliorés par la lumière [RABÉCHAULT *et al.*, 1972] (1).

Les embryons de graines fraîches non dormantes sont peu sensibles au lait de coco, lequel est capable de revivifier les embryons de graines âgées de plus de 71 jours dont la teneur en eau est inférieure à 11 p. 100 comme le fait la réhydratation préalable des graines [RABÉCHAULT, 1967 et RABÉCHAULT *et al.*, 1972]. Le maximum de sensibilité au lait de coco a été observé chez les embryons de graines de 45 à 60 jours en présence d'un milieu renfermant des éléments minéraux selon WHITE [RABÉCHAULT *et al.*, 1972].

Nous avons pensé que l'autoclave avait pu détruire une partie des substances actives du lait de coco mais le lait de coco stérilisé par filtration n'a pas donné de meilleurs résultats. Nous avons évoqué la possibilité d'une déficience en éléments minéraux du milieu de base apporté selon la formule de White *et al.*, en effet, des expériences effectuées en remplaçant cette solution par celle de Heller ont donné des résultats moins saillants : le lait de coco apporterait, dans une certaine mesure, des éléments minéraux susceptibles de pallier les déficiences d'un milieu de base trop pauvre en éléments minéraux. Il ne semble pas suffisant cependant d'apporter un ensemble de substances stimulatrices dans un milieu de culture, il faut que les tissus cultivés soient sensibles et réceptifs et qu'ils disposent de tout l'arsenal indispensable (système d'enzymes en particulier) à une bonne utilisation des éléments fournis. Or, il apparaît que la réhydratation des graines sèches peut provoquer la remise en place de ce système dans l'embryon. En supposant que **toutes** les substances nécessaires au développement de l'embryon se trouvent alors dans le milieu de culture (où elles seraient apportées ici par le lait de coco), la réhydratation des graines permettrait à l'embryon de réacquérir ses systèmes d'utilisation et son développement devrait

être alors comparable à celui observé pendant la germination naturelle.

Ces diverses considérations nous ont amenés à entreprendre la série d'expériences nouvelles sur le lait de coco dont les résultats vont être exposés ci-après.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les graines ont été récoltées à la Station de l'I. R. H. O. de Pobé (Dahomey) sur l'arbre 44-16-3 lignée DA 16, 75 jours avant l'ensemencement des embryons. Elles avaient donc perdu la majeure partie de leur sensibilité au lait de coco [RABÉCHAULT *et al.*, 1972]. Pour la remise en place des systèmes enzymatiques, **ces graines, avant utilisation, ont été réhumidifiées** par trempage pendant 7 jours dans l'eau distillée et stockées à humidité constante en sac de polyéthylène dans une salle obscure à 27 °C jusqu'à ce que leur teneur en eau atteigne 20,06 p. 100 et celle des embryons 169,79 p. 100 par rapport au poids sec. Les embryons des graines réhydratées ont été extraits et ensemencés dans des milieux liquides, en tubes 18 × 180 mm placés sur un clinostat tournant à 26 t/mn selon des techniques décrites précédemment [RABÉCHAULT, 1962]. Des tubes fluorescents Philips « Blanc Lumière du jour luxe » dispensaient au niveau des cultures un éclairage de 5 000 lux.

MILIEUX DE CULTURE

Le lait de coco (LC) provenait de noix de coco immatures récoltées à la Station de Recherches sur le Cocotier de l'I. R. H. O. à Sémé Podji (Dahomey).

Nous avons étudié l'influence du lait de coco autoclavé (LC Auto.) et du lait de coco stérilisé par filtration (LCF) avant son addition aux milieux de base, avec ou sans auxine : acide β -indolyl-acétique (AIA). Les concentrations en LC étaient de 0, 5, 10, 15 et 20 p. 100.

Les milieux de base renfermaient des éléments minéraux selon la formule de HELLER (1953), du saccharose 20 p. 1 000 (milieu de base sans AIA) ainsi que de l'auxine à raison de 1 mg/l (conc. 10^{-6}) pour le milieu de base avec AIA.

Le pH des milieux définitifs était ajusté à 5,8 avant la stérilisation.

(1) ERRATUM : Dans l'article précédent, *Oléagineux*, 27, 5, 1972, p. 249-254, lire p. 249, chapitre « Matériel et méthodes », au dernier paragraphe : « saccharose à 20 p. 1 000 » au lieu de « saccharose à 20 p. 100 ».

23 MAI 1986

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

No : 20206, ex 2.

Cote : B

14 NOV. 1973

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

Collection de Référence

n°

66 Biol. Funct.

RÉSULTATS

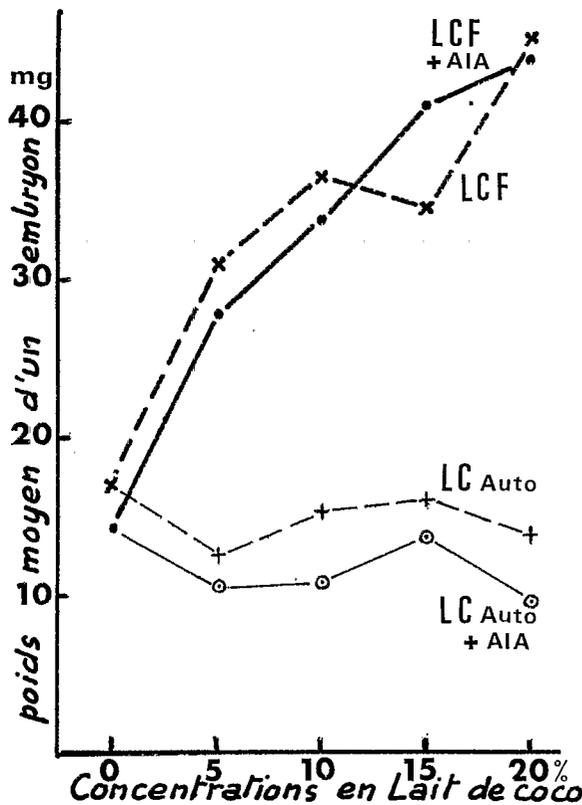
Poids frais et poids sec.

Les évolutions du poids frais et du poids sec des embryons en fonction de la teneur des milieux en LC ont été identiques. Celle du poids sec après 61 jours de culture, prise comme exemple, est traduite par le graphique 1 : les poids secs correspondants aux traitements LC sans AIA sont représentés par des croix et ceux des traitements LC avec AIA par des points.

On remarque à l'examen de ce graphique que l'AIA (10^{-6}) a peu d'influence sur l'effet du LCF ou du LC Auto. sur le poids sec (ou le poids frais), d'ailleurs le LC Auto. n'a pas eu d'effet avec ou sans AIA. Par contre, l'addition de LCF au milieu a eu un effet stimulateur spectaculaire proportionnel à la concentration sur le poids sec (et le poids frais). Les différences constatées sont hautement significatives (test F. de Snedecor) par rapport aux témoins sans LC.

Longueur de l'embryon (Limbe + Pétiole cotylédonaire).

L'analyse de la variance des résultats pour les

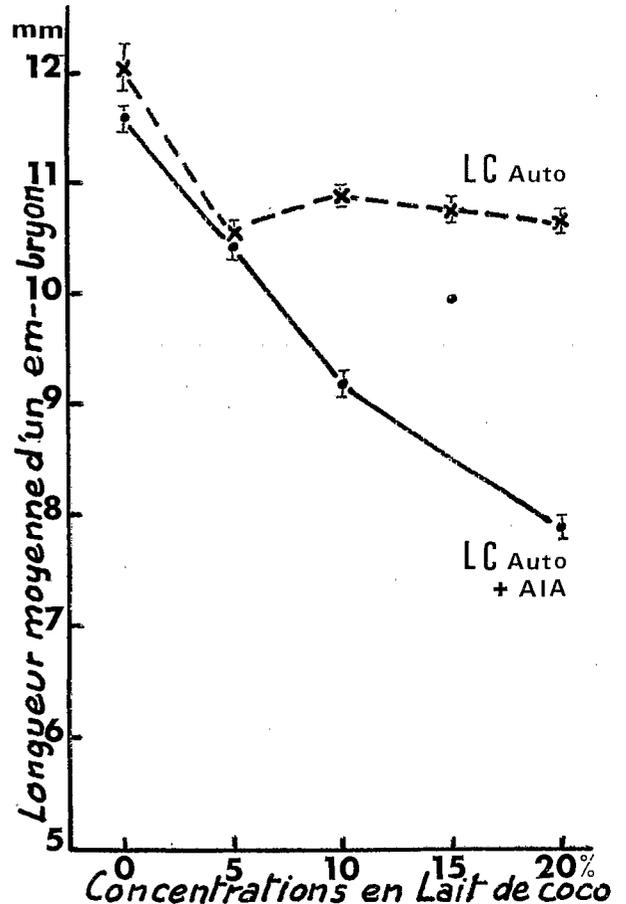


Graphique 1.

mesures prises au 31^e jour de culture a permis de confirmer que les différences observées étaient hautement significatives et, grâce à l'application du test de comparaison des moyennes deux à deux de Duncan, nous avons pu classer ces dernières en 7 groupes homogènes qui diffèrent entre eux significativement. Seul le premier groupe (moyennes supérieures à l'ensemble) et le dernier groupe (moyennes inférieures à l'ensemble) (Tabl. I) nous ont semblé intéressants à considérer.

On peut conclure en effet que les traitements LCF aux plus fortes concentrations et sans AIA (Premier Groupe) sont les plus actifs sur l'allongement de l'embryon et qu'ils sont très significativement supérieurs à tous les traitements LC Auto. avec ou sans AIA et aux témoins sans LC avec ou sans AIA.

Dans le dernier groupe figurent les moyennes des traitements, très inférieures à toutes les autres et notamment à celles des témoins sans LC avec ou sans AIA. On y remarque tous les traitements LC Auto. + AIA et LC Auto. 5 et 20 p. 100 sans AIA.



Graphique 2.

TABLEAU I

LC	Dernier groupe (moyennes inférieures)						Premier groupe (moyennes supérieures)		
	Auto. 20 p. 100	Auto. 10 p. 100	Auto. 15 p. 100	Auto. 20 p. 100	Auto. 5 p. 100	Auto. 5 p. 100	F 15 p. 100	F 10 p. 100	F 20 p. 100
AIA 10^{-6}	+	+	+	0	0	+	0	0	0
\bar{x}	9,08 ± 1,28	10,03 ± 1,64	10,91 ± 1,47	11,33 ± 1,41	11,63 ± 1,33	11,65 ± 1,12	14,34 ± 1,26	14,81 ± 1,48	15,91 ± 1,18

Les traitements LCF + AIA appartiennent à un groupe intermédiaire.

Le LC Auto. est donc ici nettement inhibiteur. Le graphique 2 représente la longueur moyenne de l'haustorium pour chaque concentration en LC Auto. ajouté à un milieu de base avec ou sans AIA. La courbe en trait continu montre que le LC Auto. ajouté au milieu de base sans AIA provoque une inhibition qui se maintient ensuite à un même niveau quelle que soit la concentration en LC. La courbe en tirets traduit une inhibition proportionnelle à la concentration lorsque le LC est ajouté au milieu de base avec AIA : il y aurait donc une synergie entre le LC Auto. et l'AIA.

Proportion d'embryons différenciés.

Dans cette catégorie entrent les embryons qui ont pu parvenir du stade IV (apparition d'une gemmule) et quelquefois même au stade V (apparition de la racine), signes certains de la formation d'une jeune plante. Le tableau II indique les pourcentages observés après 15 jours de cultures.

La première remarque que l'on peut faire à l'examen de ce tableau est l'inhibition importante apportée par l'AIA en présence de LC dans le milieu de base (partie de droite du tableau). L'application du test Chi² permet de confirmer que les différences constatées entre les pourcentages d'embryons différenciés des milieux LC sans AIA sont significativement supérieures à celles des milieux LC avec AIA. L'inhibition est moins forte avec l'addition de LCF.

La comparaison du témoin (0 p. 100 de LC sans AIA) avec les traitements LC sans AIA à l'aide du test Chi² a permis de montrer que les différences observées ne sont pas significatives excepté pour le traitement LCF à 20 p. 100. Tandis que la comparaison entre les deux modes de stérilisation indique que les traitements LCF

sont significativement supérieurs aux traitements LC Auto. (Tabl. III).

TABLEAU III. — Comparaison entre l'effet de l'addition de lait de coco filtré (LCF) et celui dû à l'addition de lait de coco autoclavé (LC Auto).

LCF p. 100	LC Auto. p. 100	Chi ²	
		Calculé	Tabulaire (pour P = 0,05)
5	5	0,07	3,84
10	10	4,41 (*)	
20	20	7,40 (**)	

(*) significatif ;
(**) hautement significatif.

Longueur maximale des feuilles.

Les moyennes obtenues après 1 et 2 mois de culture sont consignées dans le tableau IV. Que ce soit avec le LC Auto. ou le LCF la présence d'AIA qui aurait retardé l'apparition de la gemmule s'est fait encore sentir après un mois de culture sur le développement foliaire, mais les différences se sont estompées ensuite au bout de 2 mois de culture.

L'analyse de la variance a montré que les différences constatées entre les moyennes sont très significatives.

La comparaison des moyennes deux à deux à l'aide du test de Ducan a permis de classer les traitements en trois groupes homogènes qui diffèrent entre eux significativement : le groupe supérieur n'est constitué que par le traitement LCF à 5 p. 100 sans AIA qui se détache très nettement de tous les autres. Aucune différence significative n'a pu être détectée entre les

TABLEAU II. — Pourcentages d'embryons différenciés après 15 jours de culture

Mode de stérilisation	Concentrations en LC sans AIA					Concentrations en LC + AIA				
	0	5	10	15	20	0	5	10	15	20
Autoclavé	64,19	91,67	57,14	62,50	53,33	11,11	0	0	0	0
Filtré	64,19	81,82	94,44	84,21	95,65	11,11	9,09	4,17	13,64	12

TABLEAU IV. — Allongement foliaire moyen (en mm), après 1 mois et 2 mois de culture sur milieux renfermant du LCF ou Auto (avec ou sans AIA)

	LC Auto.		LCF	
	Après 31 jours de culture	Après 2 mois de culture	Après 31 jours de culture	Après 2 mois de culture
Témoin (sans AIA)	11,79 ± 2,46	29,86 ± 6,40		
Témoin avec AIA : conc. 10 ⁻⁶	7,75 ± 1,09	20,06 ± 4,94		
5 p. 100 LC	13,08 ± 1,72	33,00 ± 4,52		
10 p. 100 LC	10,43 ± 1,64	29,93 ± 3,44	14,72 ± 3,26	34,72 ± 6,60
15 p. 100 LC	10,50 ± 2,57	28,00 ± 6,48	13,29 ± 1,73	31,12 ± 6,29
20 p. 100 LC	9,07 ± 2,70	26,21 ± 6,80	12,93 ± 1,14	30,96 ± 5,56
5 p. 100 LC + AIA 10 ⁻⁶	6,75 ± 1,18	23,81 ± 6,10	9,35 ± 1,39	24,70 ± 4,88
10 p. 100 LC + AIA 10 ⁻⁶	5,88 ± 2,00	19,73 ± 6,84	6,88 ± 0,86	19,13 ± 2,84
15 p. 100 LC + AIA 10 ⁻⁶	6,50 ± 1,34	22,50 ± 7,07	6,71 ± 0,96	14,19 ± 2,58
20 p. 100 LC + AIA 10 ⁻⁶	4,25 ± 1,29	12,79 ± 4,66	7,35 ± 0,94	18,79 ± 3,44

TABLEAU V. — Pourcentages d'embryons racinés après 2 mois de culture

Mode de stérilisation	Concentration en LC sans AIA					Concentration en LC + AIA				
	0	5	10	15	20	0	5	10	15	20
Autoclavé	71,42	50,00	57,14	56,25	53,33	83,33	23,52	17,64	17,64	5,26
Filtré	71,42	81,81	89,47	88,23	91,30	83,33	63,63	70,83	68,18	87,50

traitements LC Auto. ou LCF aux concentrations les plus élevées 10, 15 et 20 p. 100 : ces moyennes appartiennent au même groupe homogène que le témoin sans AIA, LCF 5 p. 100 + AIA et LC Auto. 5 p. 100 + AIA.

L'action bénéfique du LCF observée sur l'allongement de l'embryon et l'apparition de la gemmule est donc moins nette sur l'allongement foliaire.

Rhizogenèse.

Le dénombrement des embryons parvenus au stade V (apparition de la racine), après 2 mois de culture, est consigné dans le tableau V.

On peut remarquer ici encore : que tous les traitements LCF sont supérieurs aux traitements LC Auto., que tous les traitements LC Auto. sont tous inférieurs à leurs témoins avec ou sans AIA et enfin que les traitements LCF sans AIA sont tous supérieurs au témoin sans AIA.

L'analyse statistique a permis de déterminer cependant que pour le LCF sans AIA, seul le traitement 20 p. 100 était significativement supérieur au LC Auto. à la même concentration. Tandis qu'avec l'AIA tous les traitements LCF sont significativement supérieurs aux traitements LC Auto. ainsi qu'en témoigne le tableau d'analyse VI.

TABLEAU VI. — Comparaison entre l'addition de LCF et de LC Auto. à l'aide du test Chi²

LCF p. 100	LC Auto. p. 100	Chi ²	
		Calculé	Tabulaire (pour P = 0,05)
5	5	5,31 (*)	3,84
10	10	7,04 (*)	
15	15	7,04 (*)	
20	20	13,04 (*)	

(*) significatif.

CONCLUSIONS

Dans un travail précédent [RABÉCHAULT *et al.*, 1972], nous avons montré que la sensibilité des embryons au LC Auto. variait selon l'âge des graines : non réceptifs au cours des premiers mois suivant la récolte alors que les graines sont encore humides, leur sensibilité apparaît lors d'une période valable s'étendant environ du 45 au 60^e jour pour disparaître ensuite lorsque la teneur en eau de la graine baisse au-dessous de 11 p. 100.

Encore l'optimum de sensibilité au LC est-il nuancé selon l'origine génétique des noix de palme et du LC : le LC Auto. agit mieux en milieu liquide et à la lumière qu'en milieu gélosé et à l'obscurité ; il stimule l'allongement de l'embryon de façon significative ainsi que celui des feuilles, et inhibe la rhizogenèse.

La réhydratation des graines permet la reviviscence des embryons grâce à l'absorption d'eau et de substances stimulantes qui proviendraient de l'albumen. De tels embryons se comportent de façon très différente de ceux des graines non réhydratées : le LC Auto. n'exerce plus d'action ou devient inhibiteur, effet qui est amplifié par la présence de l'auxine dans le milieu (1 mg/l).

Au contraire, le LCF stimule de façon spectaculaire l'augmentation du poids sec proportionnellement à la concentration, l'allongement de l'embryon aux concentrations 10, 15 et 20 p. 100, le développement des embryons (vitesse d'apparition de la gemmule et de la radicule) surtout à 20 p. 100, plus faiblement l'allongement foliaire et enfin la rhizogenèse.

Il semble donc que la réhydratation des graines a remis en place dans les embryons un système d'utilisation d'éléments naturels existant dans le LCF. Ce système d'utilisation n'a pas trouvé les substances nécessaires dans le LC Auto. lesquelles ont été détruites par la chaleur et son fonctionnement aurait été empoisonné par des substances nouvelles toxiques issues de la destruction de certains composés du LC par la chaleur.

Extrait de *Oléagineux*, 28^e année, n° 7, juillet 1973. p. 333-336.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABRAHAM A., K. J. THOMAS. — *Indian Coconut J.*, 15, 84-88, 1962.
- [2] CUTTER V. M., K. S. WILSON. — *Bot. Gaz.*, 115, 3, 234-240, 1954.
- [3] GAUTHERET R. J. — *La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisation*, Masson et Cie Edit., 864 p., Paris, 1959.
- [4] HELLER R. — *Ann. Sci. Nat., Bot.*, 11 série, 14, 1-223, 1953.
- [5] NARAYANASWAMI S., K. NORSTOG. — *Bot. Rev.*, 30, 4, 587-628, 1964.
- [6] RABÉCHAULT H. — *Oléagineux*, 17, 10, 757-764, 1962.
- [7] RABÉCHAULT H. — *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 264, 276-279, 1967.
- [8] RABÉCHAULT H., J. AHÉE. — *Oléagineux*, 21, 12, 729-734, 1966.
- [9] RABÉCHAULT H., G. GUÉNIN, J. AHÉE. — *Oléagineux*, 24, 5, 263-268, 1969.
- [10] RABÉCHAULT H., J. AHÉE et G. GUÉNIN. — *Oléagineux*, 27, 5, 249-254, 1972.