

IRHO/CIRAD

(Institut de Recherche sur les Huiles et les Oléagineux)

(Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement)

Laboratoire de Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales

ORSTOM (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération)

2051, Avenue du Val de Montferrand - B.P. 5045 - 34032 MONTPELLIER CEDEX 1

ENGELMANN Florent

Etude du comportement des cultures en fonction des conditions du milieu, de l'environnement et de la fréquence des repiquages (bananiers et palmier à huile)

Compte-Rendu de fin d'étude
d'une recherche financée par
le Ministère de la Recherche
et de l'Enseignement Supérieur

Avril 1990

Décision d'aide n° 86 L 0293

Fonds Documentaire ORSTOM



010006924

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote : B*6924 Ex : 1

FICHE BIBLIOGRAPHIQUE

Numéro de la décision d'aide : 86.L.0293

Objet de la décision :

Recherche sur la culture *in vitro* appliquée à des cultures vivrières amylacées et oléagineuses tropicales

Auteur :

F. ENGELMANN

Titre :

Etude du comportement des cultures en fonction des conditions du milieu, de l'environnement et de la fréquence des repiquages (bananiers et palmiers à huile)

Organisme bénéficiaire :

CIRAD, avenue du Val de Montferrand, BP 5035, 34032 Montpellier Cédex

Date de rédaction du compte-rendu de fin d'études : avril 1990

Fiche signalétique

ATP MICAP n° 6/1986

Intitulé

Etude du comportement des cultures en fonction des conditions du milieu, de l'environnement et de la fréquence des repiquages (bananier et palmier à huile)

Durée - Date

-Financement démarré en 1987

-Activité démarrée en 1985, terminée en 1989

Responsable scientifique

Florent Engelmann, Laboratoire des Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes, ORSTOM Montpellier

Cadre de réalisation

-Laboratoire de Physiologie Végétale, ORSTOM, 70-74 route d'Aulnay, 93140 Bondy

-Laboratoire de Physiologie des Organes Végétaux Après Récolte, CNRS, 4 ter route des Gardes, 92190 Meudon
(jusqu'en décembre 1988)

-Laboratoire des Ressources Génétiques et d'Amélioration des Plantes Tropicales, ORSTOM, BP 5045, 34032 Montpellier Cedex
(janvier-juin 1989)

Objectifs

Les essais, initialement prévus sur deux espèces, palmier à huile et bananier, n'ont pu être réalisés que sur le palmier à huile, étant donnée l'importance du volume de matériel végétal à traiter.

Le procédé de multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile conduit à la création d'arbres sélectionnés. L'entretien des souches d'embryons avec des repiquages fréquents et répétés peut présenter des risques pour la conformité du matériel produit. Il représente d'ailleurs une charge de travail extrêmement importante.

Le premier but de ce travail était de déterminer des conditions de culture permettant un ralentissement du développement avec maintien de la viabilité.

D'autre part, l'état de développement du programme est tel que la production de clones à grande échelle est en cours dans différents laboratoires. Une méthode de conservation des vitroplants permettrait une production en continu tout en autorisant la sortie des plants à des périodes déterminées de l'année (périodes de plantation favorables) et en fonction des commandes de matériel végétal.

Résultats

-Conservation des vitroplants

Les essais de conservation, de 10 à 18°C, de vitroplants non racinés ou racinés, ont permis de mettre en évidence leur très grande sensibilité au froid. La viabilité des vitroplants enracinés est nulle après 6 semaines de stockage, celle des vitroplants non enracinés après 18 semaines de stockage.

-Conservation des embryons

Dans le cas des embryoides, 2 types d'expérimentations ont été réalisés :

1) conservation à 15, 20 et 27°C, sur des milieux enrichis en mannitol, avec des fréquences de repiquage de 4 et 6 mois, pour une durée maximale de 12 mois.

Les résultats ont fait apparaître, dès 4 mois de conservation, une perte importante de matériel. D'autre part, la reprise de la prolifération s'est avérée longue à obtenir.

Ces essais ont permis de mettre en évidence un marqueur physiologique de la sensibilité au froid des embryons, leur production d'éthylène per l'EFE (enzyme formant l'éthylène), qui reflète l'état fonctionnel des membranes.

2) conservation en anoxie partielle

Deux méthodes ont été utilisées :

- conservation sous huile minérale : l'immersion des cultures a permis de ralentir la croissance. La reprise a été possible dans tous les cas (4 et 8 mois à 20 ou 27°C), mais la survie est parfois faible. De plus, un retour à des formations de type cal a souvent été noté, pendant et après la conservation.

- conservation en atmosphère contrôlée : le stockage des cultures d'embryoïdes pendant 4 mois sous 1 % d'oxygène à température ambiante a permis de ralentir la croissance, sans aucune perte. Une reprise rapide de l'ensemble des cultures a pu être obtenue.

Conclusion

Les essais réalisés au cours de cette ATP ont permis de montrer que les techniques conventionnelles de conservation *in vitro*, telles que la réduction de la température ou l'augmentation de la pression osmotique du milieu de culture, employées séparément ou conjointement, n'étaient pas utilisables dans le cas des embryons somatiques de palmier à huile. Ce matériel présente en effet une très grande sensibilité au froid.

L'essai de conservation en atmosphère contrôlée apparaît comme une voie intéressante pour réaliser l'objectif de cette étude. Il semble en effet qu'en jouant sur un autre facteur que le milieu ou la température, ici la teneur en oxygène de l'atmosphère de culture, on puisse ralentir considérablement la croissance, tout en conservant intactes les potentialités de prolifération du matériel, ce qui est essentiel dans le cas d'une utilisation à grande échelle de cette technique.

Enfin, cette étude a permis de mettre en évidence un marqueur physiologique de la sensibilité au froid des embryons, leur production d'éthylène, qui est d'une portée très générale.

Perspectives

Ces premiers résultats vont être approfondis à l'ORSTOM Montpellier dans le cas des embryons somatiques de palmier à huile, afin d'évaluer les possibilités d'utilisation en routine de cette technique pour la conservation de collections importantes. Cette méthode semble d'un grand intérêt pour le stockage à moyen terme des espèces tropicales, généralement sensibles au froid, et pourrait être étendue à de nombreuses plantes cultivées *in vitro* dans les laboratoires du CIRAD et de l'ORSTOM.

La mesure de la production d'éthylène pourra être utilisée comme marqueur de la sensibilité au froid de tout matériel cultivé *in vitro*.

Plan du Compte -rendu

1. Introduction

2. Déroulement du programme

3. Résultats

3.1. Conservation des vitroplants

3.1.1. non enracinés

3.1.2. enracinés

3.2. conservation des embryoides

3.2.1. essai préliminaire

3.2.2. pression osmotique

3.2.3. anoxie partielle

3.2.3.1. huile minérale

3.2.3.2. atmosphère contrôlée

3.3. recherche d'un marqueur de la sensibilité au froid des embryoides

4. Conclusion

5. Bibliographie

5.1. Rapports d'activité

5.2. Publications scientifiques

1. Introduction

Du fait du développement de la culture *in vitro*, le problème de la conservation du matériel végétal prend une importance grandissante. Il faut en effet faire face à des problèmes d'ordre différent :

- la gestion des laboratoires, avec la création constante de nouveaux clones, l'entretien de ceux qui ne sont pas produits pendant une période déterminée, la régulation de la production de vitroplants.
- les risques de variations génétiques, qui augmentent avec la durée d'entretien d'un matériel en croissance *in vitro*, et qui peuvent conduire à l'obtention de plantes non conformes à la plante d'origine.

La multiplication *in vitro* du palmier à huile est maintenant développée à un stade industriel dans 5 laboratoires différents. On se trouve donc de ce fait confronté aux problèmes évoqués précédemment. L'objectif de cette ATP était d'examiner, dans le cas du palmier à huile, les possibilités de conservation de 2 types de matériel :

- les vitroplants, afin de pouvoir assurer une production constante en s'affranchissant des périodes de plantation ou des aléas des commandes,
- les embryoides en prolifération, afin de limiter l'entretien des collections qui peuvent atteindre plusieurs centaines de clones.

2. Déroulement du programme

Les premières études de conservation ont démarré en 1985. Elles ont tout d'abord porté sur les pousses feuillées et les plants racinés. Devant les difficultés et surtout l'urgence de disposer d'une technique de conservation des souches d'embryons somatiques, eu égard aux problèmes de conformité, l'accent a ensuite été mis sur cet aspect.

Les laboratoires participant à cette ATP en ont assuré les parties suivantes :

ORSTOM Bondy :

- préparation de tout le matériel végétal (pousses feuillées et embryoides)
- vitroplants : enracinement et acclimatation en serre
- embryons :
 - pression osmotique : stockage à 27°C et suivi de la reprise
 - hypoxie : ensemble de l'essai de conservation sous huile

CNRS Meudon :

-vitroplants : stockage à basse température

-embryons :

-pression osmotique : stockage à 15 et 20°C, puis suivi de la reprise

-hypoxie : ensemble de l'essai de conservation en atmosphère contrôlée

(fin des essais à l'ORSTOM Montpellier)

3. Résultats

3.1. Conservation des vitroplants

3.1.1. Pousses feuillées non enracinées

Des pousses feuillées isolées ont été conservées à différentes températures (10, 12, 15, 18 et 27°C) pendant 6, 12, 18 et 24 semaines. Après chaque période de stockage, les pousses ont été enracinées à 27°C selon la méthode mise au point par l'équipe ORSTOM/IRHO. Les plants enracinés ont été transférés *ex vitro* et leur survie a été analysée.

Après un stockage de 8 semaines à 10°C, les pousses présentent un aspect nécrotique (feuilles brunâtres en voie de dessèchement). Après 12 semaines, de 12 à 18°C, les pousses sont molles et brunâtres.

L'estimation des pertes (pousses non enracinées et plants ne survivant pas au transfert *ex vitro*) montre que, même à 18°C, un stockage de plus de 10 semaines constitue le seuil de tolérance. Dans ces conditions, même si près de 90 % des pousses présentent après traitement un système racinaire, seulement 40 % ont un développement normal après transfert en sol. Pour les températures les plus basses, 10 et 12°C, le matériel se nécrose pendant le stockage lorsqu'il dépasse 12 semaines.

Dans cet essai préliminaire (mais qui impliquait le traitement et le suivi d'une quantité importante de matériel végétal), les températures basses n'ont pas permis, dans nos conditions de culture, la conservation de pousses feuillées isolées.

3.1.2. Vitroplants enracinés

Il s'agissait ici de conserver le matériel clonal entre la fin de la phase *in vitro* et le transfert en sol. Les conditions appliquées ont été les mêmes que dans l'essai précédent. Les résultats sont encore moins satisfaisants puisque, après 6 semaines à 18°C, la totalité des plants sont morts au cours du sevrage.

Cependant, on doit noter qu'une acclimatation progressive par passage des tubes de culture en serre pendant 12 jours avant le transfert des plants sur sable a permis une certaine amélioration des résultats. L'emploi de températures basses n'est donc pas adéquat pour la conservation des plants issus de culture *in vitro*.

Il est intéressant de noter que des plants conservés à 18°C pendant 30 semaines donnaient de nouvelles racines s'ils avaient été repiqués sur un milieu neuf après stockage. D'autre part, après 39 semaines à 18°C, 44 vitroplants sur 45 étaient encore vivants; après habillage des feuilles et des racines, puis traitement d'enracinement, 35 de ces plants ont repris un développement normal, tant au niveau de l'appareil racinaire qu'aérien. Des durées prolongées de conservation à basse température n'entraînent donc ni la mort de l'apex ni de la zone du plateau racinaire.

3.2. Conservation des embryoides

3.2.1. Essai préliminaire

Le but de cet essai était d'observer l'effet d'une diminution de la température de culture sur la croissance des embryons. 20 traitements ont été effectués, combinant :

- 4 températures : 10, 12, 15, 18°C
- 5 durées de conservation : 6, 12, 18, 24, 30 semaines.

Cet essai a été effectué sur le clone 036, avec 8 répétitions par traitement. La conservation au froid était réalisée à l'obscurité, la reprise à 27°C, à la lumière. Le milieu de base a été utilisé pour la conservation et pour la reprise.

Survie des embryons

La survie des embryons a été évaluée à la fin de la période de stockage. Les meilleurs résultats sont obtenus à 18°C (88 % de survie). A 12 et 15°C, les pertes sont très importantes après 12 semaines. A 0°C, tout le matériel meurt au cours des 6 premières semaines de conservation.

Reprise ultérieure de la croissance

A la fin de chaque période de conservation, les embryons ont été repiqués sur le milieu standard et placés à 27°C. L'estimation de la croissance a été faite à chaque repiquage par pesée directe et exprimée en valeur absolue pour 100 mg de matière fraîche initiale et en valeur relative par rapport à la pesée précédente. La reprise de croissance apparaît très hétérogène. Certains massifs d'embryons repoussèrent immédiatement, alors que pour d'autres, un temps de latence plus ou moins important est nécessaire. On observe un effet marqué du froid après 6 semaines : reprise de croissance plus faible, nombre plus important de tubes dans les classes inférieures lors d'une répartition des cultures d'après leur poids au 4ème cycle de culture.

Production de pousses feuillées

A la fin de la 4ème subculture, soit 24 semaines après l'arrêt du stockage au froid, les cultures placées à 15 et 18°C pendant 18 à 30 semaines ont été transférées sur le milieu de caulogénèse. On a rapporté le nombre de pousses dénombrées à la quantité de matière inoculée initialement. L'ensemble des pousses produites ont un aspect normal. Le nombre de pousses feuillées diminue avec l'augmentation de la durée de stockage, ce qui est une conséquence des différences déjà notées précédemment dans les capacités de prolifération des embryons en fonction de la température et de la durée de stockage.

3.2.2. Pression osmotique

Des cultures d'embryoides de 2 clones (BC 068 et LMC 63-13) ont été stockées à 15, 20 et 27°C sur des milieux contenant 0 ; 0,2 ; 0,4 et 0,6M de mannitol. La durée maximale de conservation était de 12 mois, avec des fréquences de repiquage de 4 et 6 mois. 12 tubes ont été utilisés par condition. Cet essai a démarré en octobre 1987. Les dernières mesures ont été effectuées en juillet 1989.

De nombreuses mesures ont été effectuées, qui concernent le nombre de tubes qui reproductent, l'augmentation du poids de matière fraîche des cultures pendant et après le stockage (suivie sur 4-5 subcultures), l'aspect des cultures (nécroses, brunissements, production de pousses feuillées).

- Conservation à 15 et 20°C

La conservation est possible jusqu'à 6 mois sans repiquage, 8 mois avec 1 repiquage intermédiaire à 4 mois pour les 2 clones ou 12 mois avec 2 repiquages dans le cas de LMC 63-13. Dans l'ensemble, LMC 63-13 se conserve mieux que BC 068. Ceci est dû au fait que BC 068 a un taux de multiplication plus élevé, même pendant le stockage. Pour les 2 clones, on obtient de meilleurs résultats à 20°C qu'à 15°C. En effet, dans cette condition, on n'observe aucune survie à 8 ou 12 mois pour BC 068, et un tube seulement pour LMC 63-13 à 12 mois. Dans les 2 cas, on observe une croissance pendant la conservation avant le premier repiquage. Après le premier repiquage, la croissance est quasiment nulle à 15°C, alors qu'elle n'est pratiquement pas modifiée à 20°C. Les concentrations en mannitol les plus élevées (0,4 et 0,6M) s'avèrent plus toxiques, quelle soit la température de stockage. Les cultures brunissent et se nécrosent plus rapidement, particulièrement après le premier repiquage au cours de la conservation. Enfin, on observe généralement une réponse du type "tout ou rien" : les tubes qui vont finalement reproductent ont un taux de croissance plus élevé que la moyenne pendant le stockage et redémarrent plus rapidement après leur mise en culture à 27°C. La majorité des tubes présente une reprise extrêmement lente, qui nécessite plusieurs repiquages.

- Conservation à 27°C

Après une conservation à 27°C, une survie est possible dans toutes les conditions expérimentées. Les observations réalisées pendant et après le stockage rejoignent celles effectuées sur le matériel conservé à basse température : meilleure survie du clone LMC 63-13, brunissements rapides avec les plus fortes concentrations en mannitol, même type de réponse en fin de conservation, reprise généralement lente.

En conclusion de cet essai, il a été montré que des cultures d'embryoides peuvent reproductent après 1 an de stockage à 20 ou 27°C, pour les deux clones étudiés. Cependant, les résultats obtenus n'ont pas apporté les applications attendues. Les conditions assurant une reprise rapide ne présentent que peu d'intérêt (4 mois sans repiquage). D'autre part, le matériel ne peut être entretenu en routine dans ces conditions (2 à 3 repiquages maximum). Enfin, la reprise est possible mais seulement à partir d'une petite partie de la culture. L'obtention de matériel pour la production demande un nombre de repiquages trop important. De plus, il n'est pas impossible qu'une sélection ait été opérée par les conditions de culture.

3.2.3. Anoxie partielle

La modification de la quantité d'oxygène disponible pour le stockage des cultures a déjà été citée dans la littérature. Nous avons appliqué aux embryons les deux méthodes décrites, à savoir :

- la conservation sous huile minérale (Caplin, 1959)
- la culture en atmosphère contrôlée (Bridgen et Staby, 1981)

3.2.3.1. Huile minérale

Pour cet essai, des cultures des clones LMC 63-13 et BC 068 ont été utilisées. Les trois quantités d'huile utilisées correspondent, pour les massifs d'embryoïdes, à des conditions d'immersion différentes :

- 1 ml : les cultures sont partiellement recouvertes, certaines restent au contact direct de l'air.
- 2 ml : la couche d'huile affleure à la surface des cultures.
- 3 ml : les cultures sont totalement immergées.

12 répétitions par traitement ont été réalisées.

Cultures témoins

Les cultures du clone LMC 63-13 se conservent bien, puisque le taux de mortalité est nul après 4 mois, et qu'il n'est que de 29 % et 39 % après 8 mois respectivement à 27 et 20°C. D'autre part, l'aspect des cultures est satisfaisant en fin de stockage.

Dans le cas du clone BC 068, le taux de mortalité est beaucoup plus important et les premières pertes de matériel apparaissent dès 4 mois. De plus, l'aspect des cultures se dégrade rapidement : on observe des brunissements importants, les cultures deviennent hyperhydriques, voire même flasques. On perd ainsi 60 % des cultures après 8 mois à 27°C, et 92 % à 20°C.

Cultures sous huile

Evolution pendant la conservation

Au cours de la conservation, on observe un verdissement des cultures. Elles prennent souvent un aspect vitreux, augmentent légèrement de volume, des néoformations blanches, translucides, fusiformes ou arrondies, généralement indifférenciées apparaissent à leur surface. On note la production de bulles de gaz, qui témoignent de leur activité. Le prolongement de la durée de conservation au delà de 4 mois entraîne le brunissement superficiel des embryons immergés sous 3 ml d'huile et la nécrose d'une partie des tissus. Cependant, à la fin du huitième mois, toutes les cultures sont fermes, quelle soit la condition de conservation. La plupart des cultures traitées sous 1 ou 2 ml d'huile présentent encore des zones chlorophylliennes importantes.

Reprise après la conservation

Après la conservation, les cultures ont été soit repiquées sur un milieu neuf (série 1), soit l'huile a été aspirée et les embryons n'ont été repiqués sur un milieu neuf qu'au cycle suivant (série 2). Les résultats correspondent aux observations réalisées après 5 cycles à 27°C. On note que la mortalité augmente avec l'épaisseur de la couche d'huile et qu'elle est plus intense à la température la plus basse (20°C). Enfin, le traitement en fin de conservation (série 1 ou série 2) n'influe pas significativement sur la reprise de croissance.

Comme dans l'essai préliminaire, on observe, en ce qui concerne l'intensité de la reprise de la prolifération, la même hétérogénéité. Certains massifs redémarrent immédiatement, alors que pour les autres, un temps de latence plus ou moins important est nécessaire. La vitesse de croissance est affectée par l'épaisseur de la couche d'huile, la durée et la température de conservation.

Production de pousses feuillées

Après 2 cycles de multiplication supplémentaires, les cultures ont été repiquées sur un milieu favorisant la caulogénèse. Avec 3 ml d'huile, les résultats sont très mauvais : on n'obtient pratiquement aucune plantule quelles que soient les conditions. Avec 1 et 2 ml d'huile, on observe une chute de la production de pousses entre 4 et 8 mois de conservation et 20 et 27°C.

Cette étude permet également de mettre en évidence le comportement différent des clones, le clone BC 068 produisant dans tous les cas beaucoup moins de pousses feuillées que LMC 63-13.

3.2.3.2. Atmosphères contrôlées

Le pourcentage d'augmentation de la masse de matière fraîche (MMF) des cultures a été mesuré dans les différentes conditions expérimentées et au cours des 2 cycles de culture suivants. Pendant le stockage, l'accroissement de la MMF des cultures stockées sous 1 % d'oxygène est inférieur de plus d' 1/4 à celui des témoins air. On ne note aucune différence de croissance entre les embryons stockés immédiatement ou 15 jours après le repiquage.

L'aspect des cultures en fin de stockage est différent suivant les conditions. Moins de 40 % des tubes témoins sont encore en bon état, contre plus de 90 % en hypoxie. Plus de la moitié des témoins sont partiellement ou totalement mous, contre moins de 10 % avec 1 % d'oxygène. Le nombre de tubes comportant des nécroses et des diffusions de phénols dans le milieu est également beaucoup plus important chez les cultures témoins. Enfin, la production de pousses feuillées est considérablement diminuée dans les cultures placées en hypoxie.

Lors de la remise en culture en conditions standard, on ne note pas de différence significative dans l'accroissement de la MMF entre les différentes conditions. Les valeurs obtenues sont proches de celle mesurée chez le témoin repiqué tous les mois, soit + 450 %. Cependant, du fait de l'état différent des cultures en fin de stockage, la quasi-totalité des embryons cultivés en hypoxie peut être utilisée. Il n'en est pas de même pour le matériel conservé dans l'air. Dans ce cas, seule une partie plus ou moins importante des embryons de chaque tube reste capable de reprendre la prolifération.

Aucune différence n'a été observée dans l'aspect des pousses feuillées produites à partir des témoins et des cultures conservées en hypoxie.

3.2.4. Recherche d'un marqueur physiologique de la sensibilité au froid des embryoides

Parallèlement aux essais de conservation au froid des embryons, une étude a été menée pour rechercher un marqueur précoce de l'état physiologique des cultures. La production d'éthylène chez les végétaux est un indicateur de stress. Elle est dépendante de la température. Selon les espèces végétales, le dégagement d'éthylène se produit pendant ou après le traitement par le froid. Nos essais en cours sur la conservation nous avaient montré la très grande sensibilité au froid (chilling injury) des embryons de palmier à huile. Nous avons donc cherché quelle était la relation entre le chilling injury et la production d'éthylène par les cultures d'embryons de palmier à huile.

Les mesures de croissance des embryons font apparaître une discontinuité entre 18 et 20°C. De plus, après conservation au dessous de 18°C, la reprise de la croissance à 27°C est considérablement ralentie.

La production d'éthylène a été mesurée pendant le stockage à 12, 18 et 27°C. Le dégagement d'éthylène est important à 27°C; il augmente progressivement, sans doute à cause de la croissance des embryoides. A 18°C, la production est moins importante et reste stable pendant le stockage. A 12°C, la production d'éthylène disparaît progressivement.

La production d'éthylène a d'autre part été mesurée lors du retour à 27°C après différentes durées de stockage à 12 ou 18°C. Après 2 à 6 semaines à 18°C, on observe une bouffée importante qui diminue progressivement. Le phénomène est identique pour 12°C, mais de moindre importance.

Lorsque l'on ajoute de l'ACC (acide amino-cyclopropane carboxylique) dans le milieu à 27°C, les embryons témoins produisent beaucoup plus d'éthylène que sans ACC. Les embryons stockés à 18°C produisent immédiatement plus d'éthylène que les témoins. A 12°C, l'augmentation de la production est plus lente et moins intense.

Dans le cas des embryoides de palmier à huile, la production d'éthylène est élevée à 27°C, et décroît à 18 et 12°C. L'importance de la bouffée d'éthylène observée lors de la remise à 27°C après conservation au froid diminue avec l'augmentation de la durée de stockage au froid. La capacité des embryons de synthétiser de l'éthylène reflète donc bien l'étendue des dommages dus au froid. Ces résultats suggèrent d'autre part que le dégagement d'éthylène après le réchauffement peut être considéré comme un bon indicateur de la sensibilité au froid.

Enfin, les résultats obtenus avec des applications d'ACC exogène indiquent que le système EFE est affecté par le séjour au froid, donc que l'intégrité membranaire ou la composition lipoprotéique des membranes sont perturbées.

4. Conclusion

Cette étude a permis de préciser les possibilités de conservation à différents niveaux du procédé de multiplication *in vitro* des embryons somatiques de palmier à huile. Il a ainsi été montré que l'emploi de méthodes de stockage conventionnelles, comme la réduction de la température de culture ou l'augmentation de la pression osmotique du milieu, n'était pas envisageable avec ce système. En effet, les durées de conservation garantissant une survie et une reprise rapide de l'ensemble du matériel ne sont pas suffisantes pour présenter un intérêt d'application. Dans le cas de durées de conservation importantes et potentiellement intéressantes, seule une faible partie du matériel résiste et la reprise de la croissance nécessite des traitements supplémentaires : nouvelle induction de l'enracinement dans le cas de vitroplants enracinés, nombreux repiquages dans le cas des embryoides.

Par contre, l'intérêt d'une méthode alternative, jusqu'à présent peu utilisée, a été confirmé : l'utilisation des atmosphères contrôlées appauvries en oxygène semble répondre aux conditions recherchées, survie de l'ensemble des cultures, reprise immédiate, espacement suffisant des repiquages.

Cette méthode simple semble particulièrement adaptée pour les espèces tropicales, sensibles au froid, puisqu'elle ne fait pas intervenir de modification de la température de culture. La généralisation de son emploi, après des essais et des adaptations préalables aux différentes espèces qui posent des problèmes de conservation *in vitro*, pourrait être envisagée dans les laboratoires de culture *in vitro* du CIRAD et de l'ORSTOM, qui entretiennent essentiellement des collections d'espèces tropicales. Une nouvelle série d'essais, à plus grande échelle, va être entreprise prochainement sur le palmier à huile et le caféier.

Enfin, sur un plan plus fondamental, il a été mis en évidence que la production d'éthylène par des tissus de palmier stockés au froid était une bonne appréciation de leur état physiologique. Cette observation est d'une portée générale.

Ce type d'expérimentation sera repris prochainement dans le cadre d'une étude sur la résistance au froid de caféiers *in vitro* de différentes espèces.

5. Bibliographie

5.1. Rapports d'activité

F. Engelmann : Rapports d'activité pour les Commissions Mixtes ORSTOM/IRHO : décembre 1987, janvier 1989, février 1990.

F. Engelmann, 1990 : Synthèse des essais réalisés pour la conservation à moyen terme de cultures d'embryons somatiques de palmier à huile. En cours de rédaction.

5.2. Articles scientifiques

Une copie des articles tirés des travaux décrits précédemment est jointe à ce document.

F. Corbineau, F. Engelmann et D. Côme, 1990. Ethylene production as an indicator of chilling injury in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) somatic embryos. Soumis à Plant Science.

F. Engelmann, 1990. Utilisation d'atmosphères à teneur en oxygène réduite pour la conservation de cultures d'embryons somatiques de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.), accepté pour publication dans les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences.