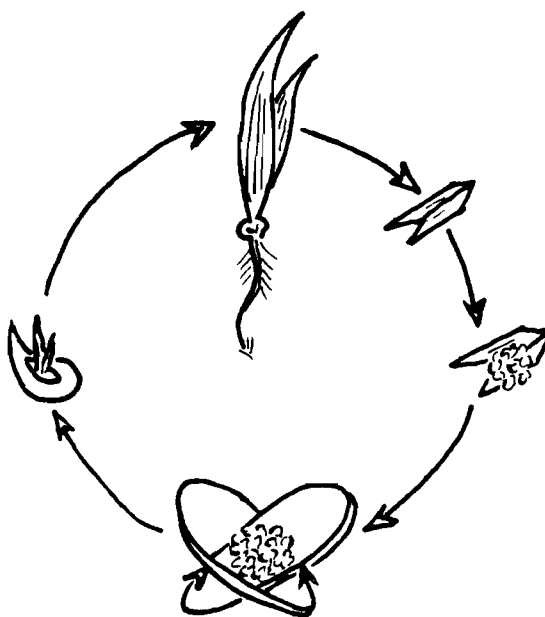


RECHERCHES SUR L'AMÉLIORATION DE LA
CULTURE DE TISSU DE PALMIER A HUILE (*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ.)
PAR LA TECHNIQUE DU MILIEU LIQUIDE AGITÉ

RAPPORT D'ÉLÈVE DE 2^e ANNÉE



ORSTOM

SSC - Bondy

Laboratoire de Physiologie Végétale

Recherches sur l'amélioration de la culture
de tissu de Palmier à Huile (*Elaëis guineensis* Jacq.) par la technique
du milieu liquide agité

par

Bernard MALAURIE

Septembre 1981

Plan

I - Introduction - Historique

A - Introduction générale.....	1.2
B - Historique.....	2.6
1 - La culture de tissu - Généralités.....	3
2 - La culture de tissu en milieu liquide agité.....	
2.1 - Principaux travaux réalisés à partir de matériel végétal appartenant à la classe des dicotylédones ...	3
2.2 - Principaux travaux réalisés à partir de matériel végétal appartenant à la classe des monocotylédones.....	4
2.2.1 - Travaux effectués sur toutes les plantes monocotylédones, hormis le palmier à huile	
2.2.2 - Travaux réalisés sur le palmier à huile	5
2.2.2.1 - Travaux effectués hors du laboratoire.	
2.2.2.2 - Travaux réalisés au sein du laboratoire de Bondy	

II - Matériel et Méthodes

1 - Techniques employées pour la culture de tissu en milieu liquide	
1.1 - Matériel végétal	7
1.2 - Appareillage	
1.2.1 - Table d'agitation	
1.2.2 - Roller-Bottle	
1.3 - Milieux de culture.....	8
1.4 - Mise en culture.....	8
1.5 - Méthodes de mesure et de notation ...	10
1.5.1 - Méthodes de mesure de la croissance	
1.5.2 - Méthodes de mesure de L'organogenèse	
1.5.3 - Analyse des résultats par des tests statistiques.....	11

1.6 - Conditions de culture : thermiques et d'éclairement.....	11
1.7 - Lecture des références bibliographiques..	12
 III - Résultats	
A - Etude de la croissance des cals à croissance rapide (CCR).....	13 à 35
1 - Etude de la croissance d'une CCR (d'un clone Tc 12) en milieu liquide de type "entretien" pour deux masses ensemencées	
1.1 - Ensemencement de 1 mg/ml.....	13 à 15
1.1.1 - Résultats	
1.1.2 - Analyse des résultats	
1.2 - Ensemencement de 10 mg/ ml.....	16 à 19
1.2.1 - Résultats	
1.2.2 - Analyse des résultats	
1.2 - Analyse des résultats des deux ensemencements et conclusion	
2 - Etude comparée de la croissance en milieu liquide et gélosé de deux clones différents.....	20 à 27
2.1 - Objectif de l'essai	
2.2 - Résultats et conclusion	
3 - Etude de l'adaptation des CCR au milieu liquide	28
3.1 - Objectif de l'essai	
3.2 - Résultats	
4 - Influence d'un "passage" en milieu liquide sur la croissance de CCR cultivées sur gélose.....	28. 29
B - Etude des capacités des tissus (CCR ou cals primaires) à exprimer leur potentialité organogène	
1 - Organogenèse directe en milieu liquide.....	36 à 40
1.1 - Organogenèse directe à partir de CCR	
1.2 - Organogenèse directe à partir de cals primaires	

1.2.1 - Méthodes et Techniques	
1.2.2 - Résultats	
1.3 - Développement des embryoides apparus en milieu liquide	
1.4 - Conclusions	
- Planches photos	
2 - Organogenèse sur milieu gélosé : influence d'un passage en milieu liquide	41 à 47
2.1 - Techniques et méthodes employées	
2.2 - Résultats	
2.2.1 - Résultats concernant les clones 8, 12 M2, 20 et 56	
2.2.2 - Résultats concernant l'utilisation de milieux différents par leur composition en phytohormones (clones 8 et 11)	
3 - Etude de l'action d'un milieu conditionné sur la vitesse et la fréquence d'apparition des embryoides.....	47 à 48
3.1 - Matériel et Méthodes	
3.2 - Résultats	
4 - Etude de l'influence des dilutions d'une "suspension d'agréats cellulaires" sur les potentialités organogènes d'une CCR.....	49.50
4.1 - Matériel et Méthodes	
4.2 - Résultats et conclusions	
C - Analyse simultanée de l'embryogenèse et de la croissance pour des tissus (CCR) provenant de 5 arbres différents.....	51.60
1 - Matériel et Méthodes	
2 - Résultats	
2.1 - Embryogenèse des 5 clones étudiés	
2.2 - Etude comparative : liquide-gélose de la croissance en conditions organogènes	
2.2.1 - Influence de la durée du "passage" en milieu liquide sur la croissance	
2.2.2 - comparaison du "passage" en milieu liquide par rapport au témoin gélosé, pour les deux traitements.	
2.3 - Conclusions	
IV - Conclusions générales et discussion	
V - Index bibliographique	

I - Introduction - Historique

A - Introduction générale

Le Palmier à Huile (*Elaëis guineensis* Jacq.) est la plante oléagineuse, perenne et allogame la plus intéressante actuellement sur le marché mondial pour sa forte productivité. Sa reproduction étant uniquement sexuée, la constitution de plantations ayant des lots homogènes est de ce fait impossible.

L'utilisation de la culture de tissu de Palmier à Huile a permis de pallier à cet inconvénient. La culture de tissu par le biais de la multiplication végétative expérimentale, concoure à la création de clones.

Les travaux réalisés au Laboratoire de Bondy, depuis 1972 ont permis de mettre au point une technique d'obtention de plantules par la voie de l'embryogenèse somatique (RABECHAULT & MARTIN., 1976) (II. 2)* La mise au point de cette technique est souvent mentionnée, par la suite, sous le terme de "procédé".

Depuis, une équipe de chercheurs appartenant à l'ORSTOM et l'IRHO tente d'améliorer la technique du "procédé", tout en conservant la gélose comme support du milieu (solide).

Un autre support possible de la culture de tissu est le milieu liquide.

L'étude de l'utilisation possible des techniques de culture de tissu de Palmier à Huile (*Elaëis guineensis* Jacq.) en milieu liquide nous a été confiée dans le but d'obtenir une amélioration du "procédé".

Nous avons donc, dans un premier temps, étudié le comportement des souches mises en milieu liquide, provenant de cultures en entretien, selon le procédé classique, sur gélose.

Cette étude effectuée lors de notre première année, nous a permis de constater plusieurs points fort importants quant à la poursuite de nos travaux.

- les tissus de Palmier à Huile à l'état de colonies cellulaires issues de croissance sur milieu gélosé n'ont pas perdu leur faculté de division et de multiplication après un passage en milieu liquide.

- le séjour en milieu liquide n'a pas empêché l'expression des capacités organogènes d'une souche après retour de celle-ci sur milieu gélosé.

Cette première étape, dépassée avec succès, il nous fallait étudier les avantages éventuels de cette technique par rapport au procédé classique. Elle pouvait être meilleure et dans ce cas, remplacer le procédé habituel, ou bien n'intervenir que partiellement, à différents stades améliorant la production finale de plantules par la voie de l'embryogenèse somatique.

L'amélioration que nous devions essayer d'obtenir pouvait être de deux types :

- une amélioration du point de vue purement scientifique.
 - par un raccourcissement de la durée des différentes phases du "procédé".
 - par une augmentation en masse des tissus de Palmier à Huile.

* L'indice accompagnant les noms d'auteurs fait référence aux chapitres correspondant de l'index bibliographique

- par une augmentation des capacités organogènes des tissus.
- ou une amélioration sur un plan purement technologique
- à savoir qu'il serait possible d'étudier sur le Palmier à Huile, une technologie de production de matériel végétal en grande quantité de type "fermenteur" employée couramment en industrie pharmaceutique.

Le procédé final tendant à une application industrielle, le type de "fermenteur", si nous pouvons en montrer son utilité, serait la technologie idéale pouvant résoudre les problèmes posés actuellement par le repiquage continu du matériel végétal sur gélose. L'entretien du matériel demandant une importante manipulation de flacons de culture.

Cette manipulation représentant une perte de temps et une fatigue inutile et un grand investissement dans une vaisselle de culture sujette à être renouvelée assez fréquemment.

Une partie de notre travail a donc été consacrée à l'étude de la croissance de CCR** en milieu liquide et sur milieu gélosé et dans un second temps nous nous sommes intéressés à l'action du milieu liquide en tant que stimulateur ou inhibiteur de la vitesse d'expression des capacités organogènes.

A la fin de ce mémoire nous avons regroupé les résultats d'une importante étude bibliographique dans un index.

Le laboratoire n'étant pas familiarisé avec la technique de tissu en milieu liquide et cette technique n'ayant jamais été confrontée au matériel végétal appartenant à la famille des Palmacées, il nous est paru indispensable de faire une recherche bibliographique capable de nous apporter le plus de renseignements possibles.

Du fait du grand nombre d'ouvrages et de publications compulsés, nous avons pensé qu'il serait utile de les citer tous dans l'index bibliographique. Le fil conducteur de notre travail nous a amené à les classer dans des chapitres différents selon le sujet débattu dans l'article.

Leur grand nombre ne nous a pas permis de les citer tous dans le texte.

B - Historique

1 - La culture de tissu - Généralités

Depuis les premiers travaux des pionniers de la culture de tissu, GAUTHERET, WHITE, HILDEBRANDT, REINERT, TULECKE, NICKELL et d'autres, dans les années 50, les cultures de tissu à partir de cals isolés, néoformés sur des fragments de plants cultivés in vitro, ont acquis un développement très important.

Le matériel végétal utilisé en culture de tissu sert à une vaste panoplie d'orientation des recherches et constitue actuellement un des outils de base de la recherche moderne en Physiologie Végétale.

** CCR : Cultures apparaissant après un délai plus ou moins long sur les cals primaires, obtenues sur fragments foliaires et présentant une vitesse de croissance plus rapide que ces derniers.

Les sujets principaux utilisant la culture de tissu vont de la régénération de plantes par propagation végétative et la constitution de clones à la constitution de plantes haploïdes par culture d'anthers, à la régénération de plantes indemnes de maladies par la culture de tissu, à la recherche sur les relations hôte-virus au niveau cellulaire, la production de métabolites à partir de cultures de cellules, l'étude de la cytologie, de la croissance cellulaire et du passage à l'état embryonnaire par la voie somatique.

2 - La culture de tissu en milieu liquide agité

Quant à nous, nous nous bornerons à regarder ce qui intéresse la culture de cellules végétales en suspension. Les premiers travaux dans ce domaine sont attribués à STEWARD & al., 1958 (I. 2)*, TULECKE et NICKELL., 1960 (I. 1)*.

Depuis, les cultures de tissu par la voie liquide s'est vue prendre une importance de plus en plus grande. Les premiers travaux effectués entre 1960 et 1968 ont été réalisés essentiellement à partir de plantes appartenant à la classe des dicotylédones.

2.1 - Principaux travaux réalisés à partir de matériel végétal appartenant à la classe des dicotylédones.

Les travaux de (DOUGALL., 1964 ; ERIKSEON, 1965 ; LAMPORT, 1964 ; TORREY et REINERT, 1961 ; HENSHAW et al, 1966) (I. 1)* donnent des méthodes précises pour l'établissement des suspensions cellulaires et pour l'obtention de taux de croissance optimaux.

RAJASEKHAR & al, 1971 (I. 1)* et TORREY et REINERT, 1961 (I. 1) mettent en évidence l'importance de l'agitation dans l'aération du milieu et l'aspect de la suspension en fonction de la vitesse de rotation.

STUART et STREET en 1969 et 1971 (I. 1)* s'intéressent au problème du conditionnement du milieu et en quelque sorte de la densité cellulaire nécessaire pour une bonne reprise de la croissance.

GOULD et STREET en 1975 (I. 1)* mettent en évidence l'intérêt des suspensions cellulaires dans l'étude des divisions synchrones.

Une autre source d'intérêt de la culture de tissu en milieu liquide agité a été de l'utiliser dans des tentatives d'obtention de plantules par la voie de l'embryogenèse somatique.

La régénération de plantules à partir d'une suspension cellulaire a été décrite pour la première fois dans les travaux sur la carotte (STEWARD & al., 1958 et 1964 (I. 2)*. Cette régénération de plante est obtenue, actuellement, dans de nombreuses espèces de dicotylédones (VASIL & al., 1964 ; KONAR & NATARAJA., 1965 ; VASIL et HILDEBRANDT, 1966 ; BUTTON et al., 1974 ; Mc WILLIAM & al., 1974 ; KOELENBACH, 1977 (I. 2)*

Nous savons bien que de nombreux travaux ont mis en évidence le danger d'exposer trop longtemps un matériel végétal au contact de milieu contenant des phytohormones tel que le 2,4-D. En effet, des études sur la conformité du matériel ont montré le grand nombre d'aberrations chromosomiques pouvant survenir en contact du 2,4-D.

De nombreux travaux font part de ces problèmes (MURASHIGE & NAKANO, 1966 (III).

La culture de cellules isolées en suspension n'est pas épargnée par les risques de variations de génomes ; les travaux de BLAKELY et STEWARD, 1964 (III) nous y renseigne dans une étude sur Haplopappus gracilis et Daucus carota. Une analyse de l'origine de cette variation y est abordée.

Cependant, une publication de HALPERIN, 1966 (I. 2) tend à nous montrer que ces phénomènes d'aberration n'apparaissent que très peu en milieu liquide par rapport au milieu gélosé : "...les cultures maintenues en milieu liquide agité en présence de 2,4-D montrent une très grande stabilité dans leur nombre chromosomique"... HALPERIN rajoute "... que les cultures maintenues en milieu liquide agité en présence de 2,4-D pendant une durée prolongée manifestent toujours une grande capacité à l'embryogenèse"... SMITH et STREET., 1974 (I. 2) rajoutant à ce sujet que "...la perte du potentiel embryogène arrive plus fréquemment et rapidement dans les cultures de cals que dans les suspensions cellulaires..."

2.2 - Principaux travaux réalisés à partir de matériel végétal appartenant à la classe des monocotylédones

2.2.1 - Travaux effectués sur toutes les plantes monocotylédones, hormis le Palmier à Huile.

Nous avons distingué les travaux réalisés sur les monocotylédones herbacées des travaux réalisés sur les monocotylédones arborescentes. Les premiers cités, d'un abord plus facile et, par le fait de leur appartenance, pour leur plus grande part, à une sous classe d'intérêt économique, les céréales, se sont vus utilisés en premier par de nombreux travaux de culture de tissu in vitro.

En effet, l'embryogenèse somatique et la formation de plantes à partir d'une suspension cellulaire de monocotylédones, a été décrite pour la première fois dans les publications de (WILMAR et HELLENDORF., 1968, et STEWARD et MAPES., 1971) (II. I)* utilisant l'Asparagus officinalis comme matériel végétal. Citons de nombreux travaux réalisés sur les céréales : sur le Riz (Oryza sativa) avec les travaux de (MAEDA., 1969; NAKANO et MAEDA., 1979) (II. I)* ; sur le Maïs (Zea mays) : SPRINGER, GREEN et KOHN, 1979 (II. I)*.

La formation d'embryoïdes et de plantules issus de protoplastes de Pennisetum americanum a été décrite dans l'ouvrage de VASIL & VASIL., 1980 (II. I)*

Dans une publication de 1981 (II. I), les mêmes auteurs nous décrivent les phénomènes de régénération de plantes entières par les voies de l'embryogenèse somatique à partir de suspensions cellulaires de Pennisetum americanum.

La culture de tissu à partir de monocotylédones arborescentes remonte à une dizaine d'années seulement et de nombreuses espèces de plantes ont été utilisées. Cependant en nombre beaucoup plus restreint que chez les monocotylédones.

Les travaux ont porté essentiellement sur 3 types d'arbres appartenant tous 3 à la famille des Palmées, il s'agit du cocotier (*cocos nucifera*), du Palmier-dattier (*Phoenix dactylifera* L.) et du Palmier à Huile (*Elaeis guineensis* Jacq.). Nous pouvons citer les travaux de AMMAR & BENBADIS., 1977, de REUVENI, ADATO & LILIEN-KIPNIS., 1972, de REUVENI, 1979, de SHROEDER, 1970 et de SMITH, 1975, sur le Palmier-dattier. Sur le cocotier, citons EEUVENS 1976, et EEUVENS & BLAKES, 1977 (II.2.2).

2.2.2 - Travaux réalisés sur le Palmier à Huile

Nous aborderons l'historique de la culture de tissu sur le Palmier à Huile dans le paragraphe suivant où nous distinguerons les travaux réalisés hors du laboratoire et les travaux réalisés par l'équipe ORSTOM-IRHO.

2.2.2.1- Travaux effectués hors du laboratoire (II.2.1)

La culture in vitro de tissu chez le Palmier à Huile est relativement récente et de nombreuses sources d'explants ont été utilisées : embryons, apex, zone apicale, bases pétiolaires, rachis, inflorescences et racines.

Les premiers travaux hors Laboratoire ont été réalisés par STARISKY, 1970 ; il observe la formation de nouvelles pousses et de racines en mettant des morceaux d'apex en culture. JONES en 1974, régénère des pousses vertes et des racines sur une même culture avec des explants de la zone apicale de jeunes plantules élevées aseptiquement et provenant d'embryons isolés. Les racines mises en culture in vitro ont accaparé de nombreux travaux (SMITH & THOMAS, 1973 ; JONES, 1974 ; ONG, 1977).

L'équipe de CORLEY & al (1977) a obtenu sa première plantule à partir d'explants de la zone apicale de plantules cultivées aseptiquement.

2.2.1.2 - Travaux réalisés au sein du Laboratoire de Bondy.

Depuis les premiers travaux réalisés en 1970 par RABECHAULT et al (II.2.1)* où les premiers cals et nodules verdissant à la lumière sont obtenus à partir d'embryons cultivés in vitro, une orientation importante s'est faite par le choix de la partie de la plante utilisée dans la mise en culture.

En effet, si les différents travaux effectués hors du laboratoire se sont portés sur une utilisation prépondérante des racines comme matériel de départ, RABECHAULT et al dès 1972 va régénérer des pousses vertes et des racines sur une même culture à partir de bases pétiolaires de jeunes plants de pépinière. A partir de cette date, le matériel utilisé ne sera plus que des explants de feuilles juvéniles de plant de pépinière en serre, de 2 ans.

Le choix de ce matériel présente 3 avantages : il permet de fournir un nombre très important d'explants = 400 (ce nombre sera porté à plus de 2000 à partir d'un arbre adulte).

- l'arbre donneur n'est pas perdu car ce prélèvement ne le tue point, et il peut réatteindre son développement initial 2 ans plus tard.
- le risque de contamination, à partir d'un matériel de la partie aérienne est beaucoup moins grand que le risque encouru à partir de matériel racinaire.

L'obtention de plantules de Palmier à Huile, issues de l'embryogenèse somatique in vitro, pouvant être isolées et cultivées, est rapportée pour la première fois en 1976 dans les travaux de RABECHAULT et MARTIN.

Les résultats de ces travaux vont conduire à la mise au point du procédé de production de jeunes plantes à partir de tissus foliaires (RABECHAULT & MARTIN, 1976).

Depuis lors, les travaux ont été axés sur une amélioration du procédé. Ces travaux ont été conduits par l'équipe de chercheur ORSTOM-IRHO. La publication de mars 1981 dans Oléagineux sur "la multiplication végétative in vitro du Palmier à Huile par embryogenèse somatique" fait état des derniers résultats acquis par le laboratoire.

Il est mis en évidence le raccourcissement important des différentes phases ; les cals primaires apparaissent au bout de 60 jours et les CCR entre 6 et 12 mois et est devenu fréquent, au lieu des 2 à 3 ans avec une faible fréquence d'apparition au début du procédé.

L'obtention d'embryoïdes et leur évolution en plantules racinées n'est plus un problème majeur.

Dans le but d'accélérer le phénomène, sans avoir à passer par le stade CCR pour l'apparition d'embryogenèse, des travaux ont été réalisés dans le but d'obtenir une organogenèse directement sur cal primaire par PANNETIER et al, 1981. Cette voie a un double intérêt, la rapidité et la plus courte durée d'exposition du matériel aux phytohormones tel que 2,4 - D présentant des dangers dans la conformité ultérieure du matériel produit.

II - Matériel et Méthodes

1. Techniques employées pour la culture de tissu en milieu liquide

1.1 - Matériel végétal

Nous avons utilisé dans nos différentes expériences du matériel végétal de Palmier à Huile à l'état de cals primaires et de cals secondaires ou CCR provenant de 14 clones différents.

Le matériel végétal est constitué de tissus obtenus dans les conditions habituelles du procédé sur milieu gélosé. Il s'agit de cals primaires (cals obtenus sur fragments foliaires) et de tissus appelés CCR (cultures qui apparaissent après un délai plus ou moins long sur les cals primaires et qui ont une vitesse de croissance nettement plus rapide que ces derniers.

Ces deux types de culture diffèrent de façon importante dans leur aspect et leur structure; les cals primaires se présentent le plus souvent en nodules compacts et durs au toucher. L'examen histologique montre une certaine organisation (AHEE et al). Les CCR, par contre, qui représentent très probablement un stade plus poussé de "dédifférenciation", sont constituées d'un tissu diffus, aéré, ne présentant pas de structure particulière. En coupe on observe des zones de cellules méristématiques qui semblent réparties au hasard et entourées de cellules en auxésis

1.2 - Appareillage

L'emploi de la technique de culture de tissu en milieu liquide nécessite un système d'agitation qui permette une bonne aération des tissus. Deux types de matériel d'agitation ont été utilisés.

1.2.1 - Tables d'agitation

Deux tables d'agitation ont été utilisées, pouvant porter des erlens de 100 ml ou de 300 ml. Leur vitesse de rotation est dans les deux cas de 100 tours/mn.

1.2.2 - "Roller-Bottle"

Le Roller-Bottle conçu d'après les plans utilisés par GRIGNENBERGER (thèse 1978) (cf. I.1) * utilise des bouteilles comme flacons de culture de capacité différente : 100, 500, 1000 et 3000 ml.

Les vitesses de rotation sont respectivement de 166, 108, 87 et 59 tours/mn.

Les erlens et les bouteilles sont fermées par des bouchons de mousse permettant des échanges gazeux.

La plupart des essais réalisés sur le Roller-Bottle ont été faits en utilisant la vitesse de 108 trs/mn, vitesse convenant mieux à la croissance (RAJASEKHAR & al, 1971) (cf. I.1.)*

* l'indice accompagnant les noms d'auteurs fait référence aux chapitres correspondants de l'index bibliographique.

1.3 - Milieux de culture

Le milieu de culture comprend les macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (cf. tableau) les microéléments de MURASHIGE et SKOOG modifiés par NITSCH (cf. tableau A) du fer sous forme chélatée Fe EDTA (préparation Jacobson), des vitamines de MOREL (Thiamine, pyridoxine, acide nicotinique, pantothénate de Ca) 1mg/l, de l'hydrolysate de caséine 500 mg/l, du mésoinositol 100mg/l, de l'ascorbate de sodium 100 mg/l, du glucose à la concentration de 20 g/l.

Différentes substances de croissance sont ajoutées à ce milieu, elles varient dans leur nature selon le type de phénomène recherché : croissance ou organogénèse.

Dans le dernier cas il s'agit d'ANA (acide naphthalène acétique) à la concentration 2mg/l et de BAP (6-Benzyl-aminopurine) à la concentration 2mg/l : nous citons l'emploi de ce milieu dans le texte par "milieu organogène". Pour la croissance des tissus on utilise de l'ANA à la concentration 2mg/l.

et du 2,4-D à la concentration 0,5mg/l. Un tel milieu favorisant la croissance est appelé dans le texte "milieu de croissance" ou "milieu d'entretien". Le milieu est ajusté à 5 avant autoclavage.

Les milieux sont autoclavés 20 minutes à 120°C.

Le volume de milieu à distribuer correspond au 1/5 du volume total des flacons de culture.

Des milieux solides ont été utilisés comme témoin dans certaines expériences. Dans ce cas, la concentration en agar est de 8‰.

1.4 - Mise en culture

Toutes les opérations de mise en culture ou de repiquage ont lieu dans une pièce d'ensemencement sous hotte stérile à flux laminaire. Les techniques d'ensemencement en milieu liquide sont les mêmes que celles employées en culture de tissu en général.

Les études de croissance ont du faire appel à des successions de pesées stériles sous hotte (PF), ou à des filtrations et pesées sans conditions stériles pour des mesures de PF et PS (lots perdus).

Le problème essentiel qui distingue le milieu liquide du milieu gélosé concerne la récupération de la "suspension cellulaire" après un certain temps de culture.

Cette opération s'effectue en filtrant la suspension cellulaire sur des tamis de différents maillages ou du papier filtre. Le reliquat recueilli sur le tamis est alors redistribué dans les milieux neufs comme dans les repiquages du procédé sur milieu solide.

Le matériel nécessaire à la filtration d'une suspension cellulaire est relativement simple : Fiole à vide, buchner, papier filtre. Tout ceci est enveloppé dans du papier d'aluminium et passé à l'autoclave 20 minutes à 120°C avant son utilisation. Pour les études de croissance les pesées stériles sont faites en utilisant des petits morceaux d'aluminium ayant été préalablement passés au four Pasteur 30 mn. à 140°C.

Nous avons aussi fait appel, dans certains essais, à la technique d'ensemencement à partir d'une "suspension cellulaire" par prélèvement d'aliquote. La masse de matière fraîche de tissu contenue dans

Macroéléments	mg/l	mM
KNO_3	600	5,9
KH_2PO_4	350	1,5
NH_4NO_3	650	8,1
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	180	1,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	150	0,6
Oligoéléments	mg/l	mM
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	25	0,11
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10	0,03
H_3BO_3	10	0,16
KI	0,83	0,005
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,0001
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,001
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,0001

Composition minérale en mEq/l du milieu de culture utilisé

CATIONS

Co^+	H^+	K^+	Na^+	NH_4^+	Ca^{++}	Cu^{++}	Mg^{++}	Mn^{++}	Zn^{++}
10^{-4}	0,48	7,4	$2 \cdot 10^{-3}$	8,1	2,4	$2 \cdot 10^{-4}$	1,2	0,2	0,06

ANIONS

Cl^-	I^-	NO_3^-	$H_2PO_4^-$	BO_3^{3-}	SO_4^{--}	MoO_4^{--}
2,4	$5 \cdot 10^{-3}$	14	1,5	0,48	1,5	$2 \cdot 10^{-3}$

Tableau A

un volume connu de la suspension à repiquer est déterminée sur une aliquote prélevée stérilement (GRIENENBERGER., 1978 - I.1.)*

Cependant, si les travaux précédemment cités correspondaient à une suspension cellulaire vraie, obtenue à partir de culture de tissu de vigne vierge comportant des cellules ou agrégats de cellules de même diamètre, il n'en n'a pas été de même pour les "suspensions cellulaires" réalisées à partir de CCR de Palmier à huile.

1.5- Méthodes de mesure et de notation

1.5.1 - Méthodes de mesure de la croissance

Nous avons étudié la croissance d'une suspension de cellules et d'agrégats cellulaires issus d'une CCR, pour deux quantités ensemencées différentes = 1 mg de matière/ml de milieu et 10 mg/ml. Ces masses ont été choisies après des essais préliminaires et une étude bibliographique sur les études de la croissance en milieu liquide, STREET & HENSHAW., 1963 (I.1)* SHERIDAN., 1968 -(I.2) *

Ultérieurement une étude comparative de la croissance en milieu liquide et gélosé portant sur 8 clones a été réalisée à partir d'un ensemencement de 10 mg/ml et ceci dans deux types de milieu : l'un, dit de croissance" ou "d'entretien" ; l'autre, dit d'organogenèse.

L'étude de la croissance dans le cas utilisant le milieu de "croissance" s'est faite en déterminant le PF et le PS après des durées de cultures différentes. En récupérant la suspension cellulaire sur un filtre (lavé à l'eau distillée) et en essorant lors de la filtration le liquide en excès, on peut déterminer le poids frais. Une pesée préalable du papier filtre imbibé d'eau et essoré par filtration permet d'apprécier le plus précisément le poids frais réel de la suspension.

Les cellules recueillies sur le filtre sont placées dans une étuve à 90°C pendant 24 heures jusqu'à poids constant afin d'obtenir le PS. Comme précédemment pour donner le plus de précision aux résultats, le papier filtre, après les pesées préliminaires du PF, est placé dans une étuve à 90°C pendant 2 heures, puis pesé.

Le PS est donc : [(papier filtre + cellules desséchées à 90°C pdt 24 heures) - (Psec préliminaire du papier filtre)]

HENSHAW & al., 1966 ; KUBEK & SHULAR., 1978 ; ERIKSSON., 1965 ; HORSCH., KING & JONES., 1980 ; HORSCH & JONES., 1980 (I.1)*

Chaque mesure dans le temps portait sur une valeur moyenne de 6 échantillons (RUYACK & al., 1979).

1.5.2 - Méthodes de mesure de l'organogenèse

Les phénomènes d'organogenèse que nous avons observés lors de nos différents essais appartiennent tous à une embryogenèse somatique. L'expression de l'embryogenèse étant un caractère à la fois qualitatif et à la fois quantitatif s'étendant sur une longue période, il nous a fallu établir une méthode de notation et d'évaluation.

L'étude de l'embryogenèse peut se faire par le comptage du nombre global d'apparitions de structures de nature embryogène ;

Cependant, ces structures présentent des stades de développement différents. En effet, au moment de l'observation d'une culture on observera des embryoides à plusieurs stades que l'on définit comme suit :

- stade nodulaire = agrégat compact, lisse et brillant de 1 à 2 mm de diamètre, de couleur jaunâtre.

- stades embryonnaires :

 stade 1 = masse globulaire de couleur jaune vert, de 2 à 4 mm de diamètre

 stade 2 = Masse verte polarisée

stade 3 = embryotide polarisé avec sortie de la première feuille.

Des essais tendant à observer une embryogenèse éventuelle a utilisé 13 clones différents ; 5 clones ont été suivis, lors des différents cycles de repiquage en milieu organogène par des mesures de la masse ensemencée par des pesées stériles.

L'expression de l'organogenèse pourra donc être représentée avec plus de rigueur, par le calcul d'embryotides apparus/masse de CCR ensemencée à to.

La mesure de la croissance de ces clones à chaque repiquage complètera le tableau de données en fournissant l'étude de corrélations possibles entre la croissance de ces clones et la fréquence embryogène.

1.5.3 - Analyse des résultats par des tests statistiques

L'étude des phénomènes biologiques tels que ceux que nous rencontrons en culture de tissu a un caractère fortement aléatoire du fait de la grande variabilité du matériel végétal. Nous ne pouvons conclure à l'observation d'un phénomène que si celui-ci est reproduit dans un grand nombre de répétitions. Nous pouvons alors attribuer une valeur numérique à des appréciations qualitatives par l'intermédiaire des statistiques. Nous avons fait appel dans nos différentes expériences à des statistiques simples : χ^2 , test t ...

1.3 - Conditions de culture = thermiques et d'éclairage

Les appareillages d'agitation sont placés dans des salles de culture disposant d'un système de climatisation maintenant la température entre 25° et 30° C.

Les salles de culture disposent d'un système d'étagères éclairées de 10 tubes Gro - Lux de 40 W de 1,20 M de longueur.

Chaque étagère reçoit une intensité lumineuse allant de 2,5 W/m (500 lux) à 30 W/m² (420 lux) selon le nombre des tubes en service

La durée d'éclairement est de 12 heures/jour.

Les appareillages d'agitation se trouvent à l'écart des champs lumineux des étagères et reçoivent une lumière diffuse, voisine de 2,1 W/m² (420 lux) pour la table d'agitation et de 0,8 (160 lux)

à 1,6 W/m (320 lux) pour le Roller-Bottle.

Les témoins gélosés des essais réalisés en milieu liquide ont été exposés à la même intensité lumineuse et placé dans les mêmes conditions thermiques.

1.7 - Lecture des références bibliographiques

Les références de travaux d'auteurs cités dans le texte sont accompagnés d'indices se rapportant aux chapitres de l'index bibliographique :

exemple : PANNETIER & al., 1981 (II.2.1)

II - Travaux réalisés à partir d'un matériel végétal appartenant à la classe des Monocotylédones.

1 - Travaux réalisés sur le palmier à huile

2 - Travaux réalisés sur les Palmacées

III - Résultats

A - Etude de la croissance des cals à croissance rapide (CCR)

1 - Etude de la croissance des CCR d'un clone (Tc 12)* en milieu liquide de type "entretien" pour deux masses ensemencées : 1 et 10 mg de matière végétale ensemencée / ml de milieu . (La CCR provient de plusieurs cycles d "entretien" sur gélose)

1.1 - Ensemencement de 1 mg/ml

La technique employée est expliquée dans le chapitre Matériel et Méthodes

1.1.1 - Résultats - cf courbes PF et PS

(g)	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	$\frac{P_1-P_0}{P_0}$	$\frac{P_2-P_0}{P_0}$	$\frac{P_3-P_0}{P_0}$	$\frac{P_4-P_0}{P_0}$	Temps de doublement				
	0	7j	14j	56j	120j					7	14j	56j	120j	
m	0,047	0,1458	0,1461	0,1390	0,1436	1,6	1,5	1,45	1,5	5	10	43	89	
PF	σ	0,007	0,018	0,007	0,01	0,0196	0,33	0,25	0,19	0,2				
	i	0,007	0,02	0,009	0,01	0,02	0,41	0,32	0,2	0,2				
	nbre répét. ions	5	5	5	6	6	5	5	6	6				
PS	m	0,0004	0,0018	0,0014	0,0032	0,0042	3	2	7	11	3	8	13	34
	σ	0,0004	0,0009	0,0002	0,0004	0,0005	2	0,75	1,1	3,3				
	i	0,0004	0,001	0,0003	0,0004	0,0006	2,5	0,94	1,1	4				
	nbre répét. ions	5	5	4	6	5	5	5	6	6				

1.1.2 - Analyse des résultats (courbes 1 et 2)

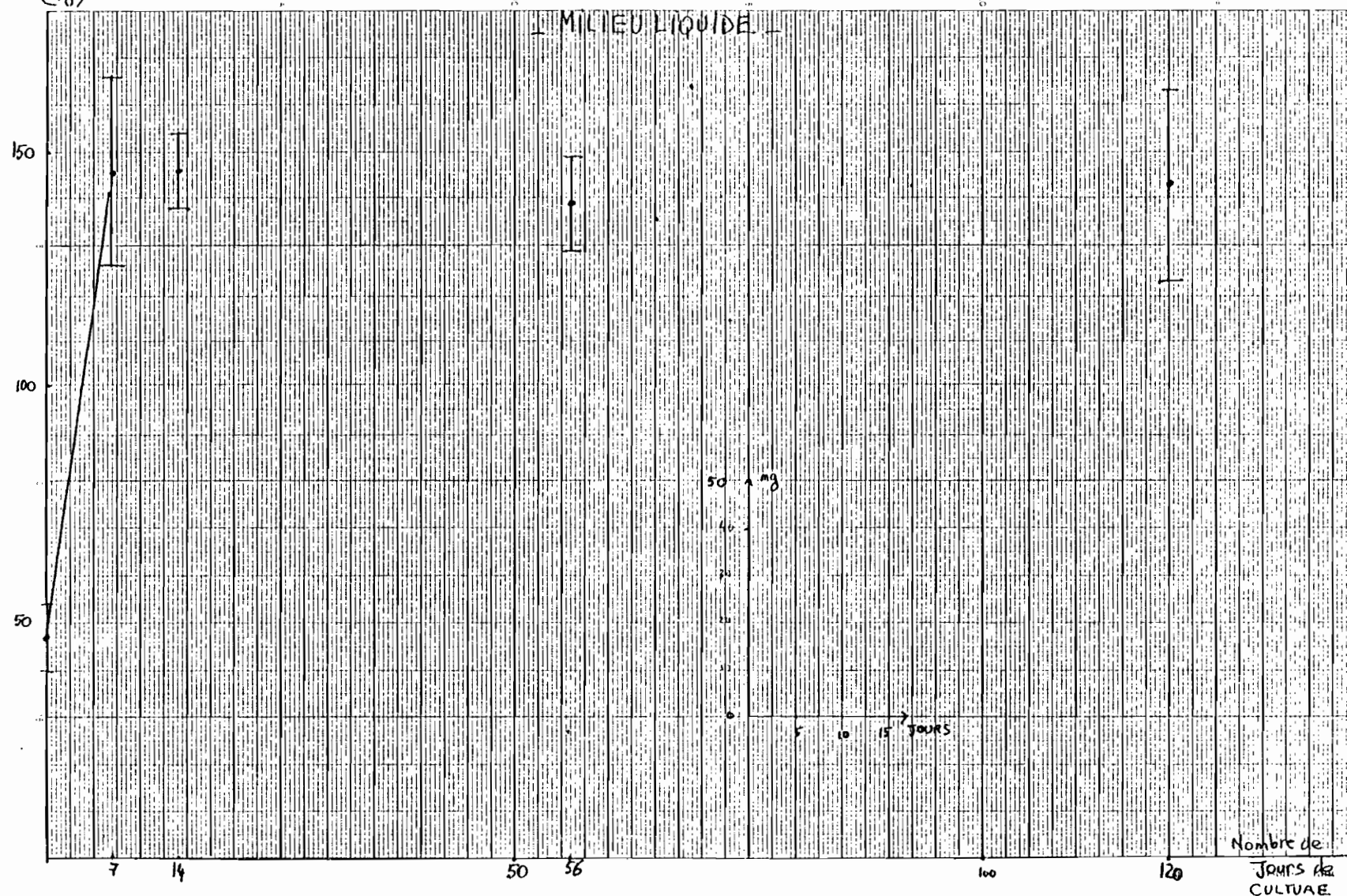
Nous remarquons en analysant les courbes du PF et du PS que le plateau d'arrêt de la croissance est atteint à 7 jours du début de la mise en culture pour le poids frais alors qu'il n'est atteint qu'à 120 jours pour le PS...

Cette très forte différence peut être due :

- soit à une hydratation très rapide des tissus au moment du changement des conditions de culture
- soit au biais que présente la méthode de filtration surtout pour de faibles ensemencements

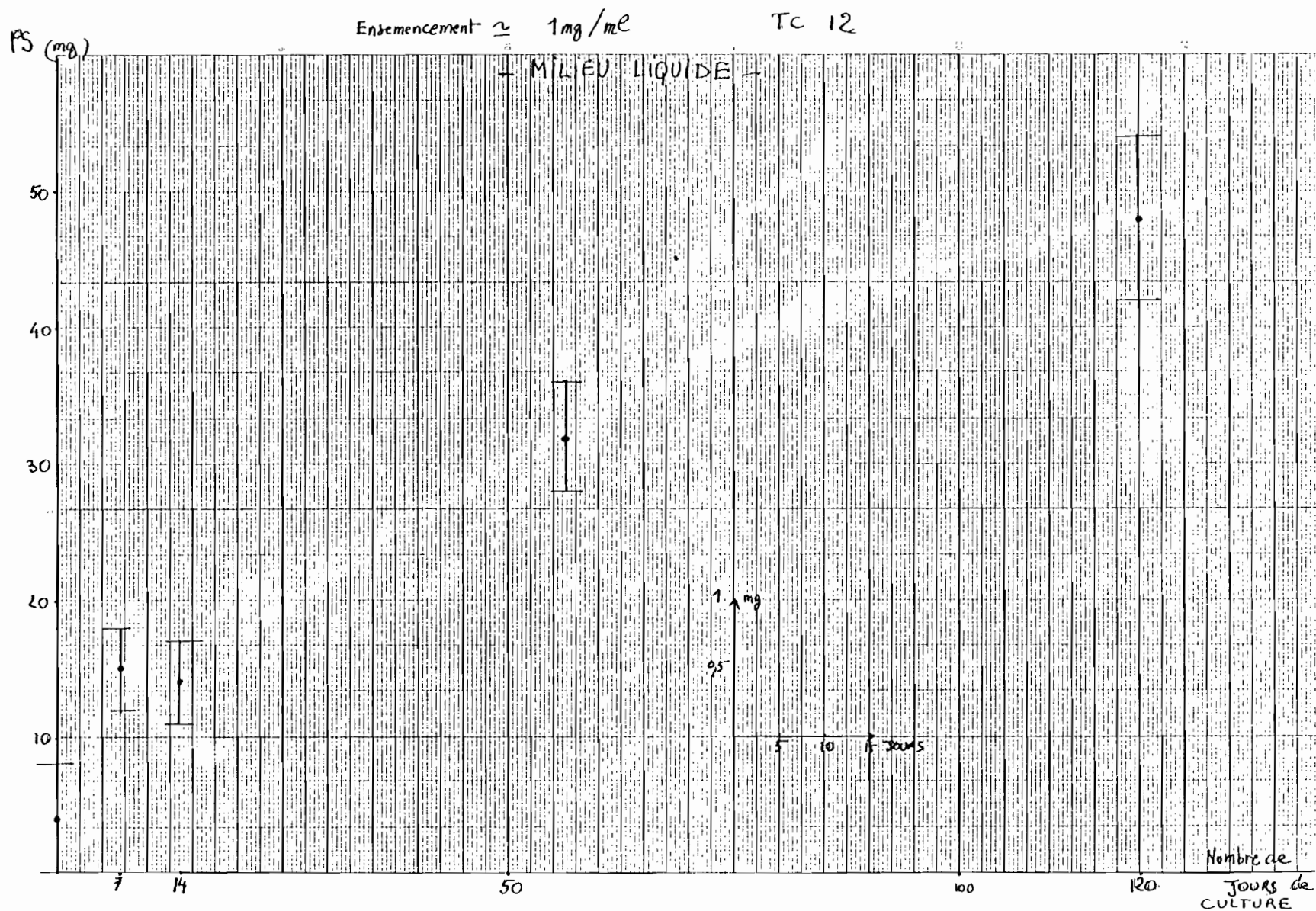
* Numérotation du Laboratoire pour distinguer les CCR ou cals primaires provenant de palmiers distincts.

PF (mg) ENSEMENCEMENT de 1 mg/ml TC 12



Courbe n° 1

Courbe n° 2



1.2 - Ensemencement de 10 mg/ ml

1.2.1 - Résultats - cf courbes PF & PS

(g)		P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	$\frac{P_1-P_0}{P_0}$	$\frac{P_2-P_0}{P_0}$	$\frac{P_3-P_0}{P_0}$	$\frac{P_4-P_0}{P_0}$	temps de doublement			
		0	7 J	14 J	56 J	120 J					7 J	14 J	56 J	120 J
PF	m	0,4743	0,59	0,753	4,06	4,3	0,2	0,6	7,5	7,98	18	23	18	33
	σ	0,019	0,051	0,131	0,31	0,3	0,11	0,27	0,65	0,64	2,4	8	0,65	1
	$\bar{c}$	0,02	0,063	0,163	0,918	0,31	0,13	0,34	0,69	0,67	6	10	0,68	1
	Nbre Répét.	5	5	5	6	6	5	5	6	6	3	5	6	6
PS	m	0,0338	0,043	0,068	0,291	0,26	0,3	1	7	7	18	17	18	36
	σ	0,0028	0,005	0,016	0,024	0,041	0,14	0,47	0,74	0,9	4	4	0,72	2/6
	$\bar{c}$	0,0029	0,006	0,02	0,025	0,043	0,17	0,58	0,78	0,9				
	Nbre Répétitions	5	5	5	6	6	5	5	6	6	3	3	6	6

1.2.2 - Analyse des résultats (courbes 3 et 4)

Pour un ensemencement de 10 mg/ml, on ne constate pas comme précédemment avec un ensemencement de 1 mg/ml cette différence dans les deux courbes de PF et PS ; le plateau est atteint pour les deux courbes à 56 jours de la mise en culture.

A 120 jours, la masse initiale a été multipliée par 7 environ, mais le temps de doublement est passé de 18 à 7 jours, de 36 à 120 jours. La masse augmentant, le volume du milieu disponible par mg de matière diminue et freine la division des cellules, jusqu'à un arrêt d'augmentation de la masse. Le milieu est saturé.

1.3 - Analyse des résultats des deux ensemencements et conclusions

Les tableaux de résultats obtenus pour une CCR d'un même clone, pour deux ensemencements différents, nous indique qu'un faible ensemencement permet d'obtenir dans les dix premiers jours de culture des temps de doublement allant de 5 à 10 jours (pour le PF), ce qui est très important, car les temps de doublement obtenus sur des CCR de divers clones maintenus sur le milieu gélosé du "procédé" n'a donné qu'occasionnellement des temps de doublement compris entre 11 et 12 jours.

Les agrégats cellulaires en milieu liquide, quand ils sont en faible nombre par ml de milieu, ne subissent pas de phénomènes de compétition existant dans des concentrations plus importantes. Leur vitesse de division n'est donc pas limitée ; les tissus se multipliant rapidement arriveront plus vite au niveau de saturation et d'épuisement du milieu, donc le plateau sera atteint plus rapidement et à cette explication correspond la courbe du PF où le plateau est atteint à 14 j !

Pour des ensemencements supérieurs, 10 mg/l, le phénomène de saturation du milieu n'est atteint que beaucoup plus tard (& 56 jours). Ce phénomène peut s'expliquer par les faits suivants :

- dès le départ, le volume de milieu par unité de masse de cellules est plus faible.

- les cellules se repressent les une les autres dans cette course à l'occupation du milieu.

Dans le cas du PS de l'ensemencement de 1 mg/ml dont le plateau a été atteint à 120 jours, une autre interprétation pourra être faite : la concentration d'agrégats par ml de milieu était en-dessous du seuil de "densité de population" décrit par STUART & STREET. :

Les tissus ont besoin d'un temps plus long d'accoutumance (d'accommodation) pendant lequel les divisions se font selon un rythme lent jusqu'à ce que le seuil de "densité de population" soit atteint. A partir de ce stade, les divisions sont plus rapides, puis se ralentissent, repressées par les phénomènes de compétition du milieu, jusqu'au plateau

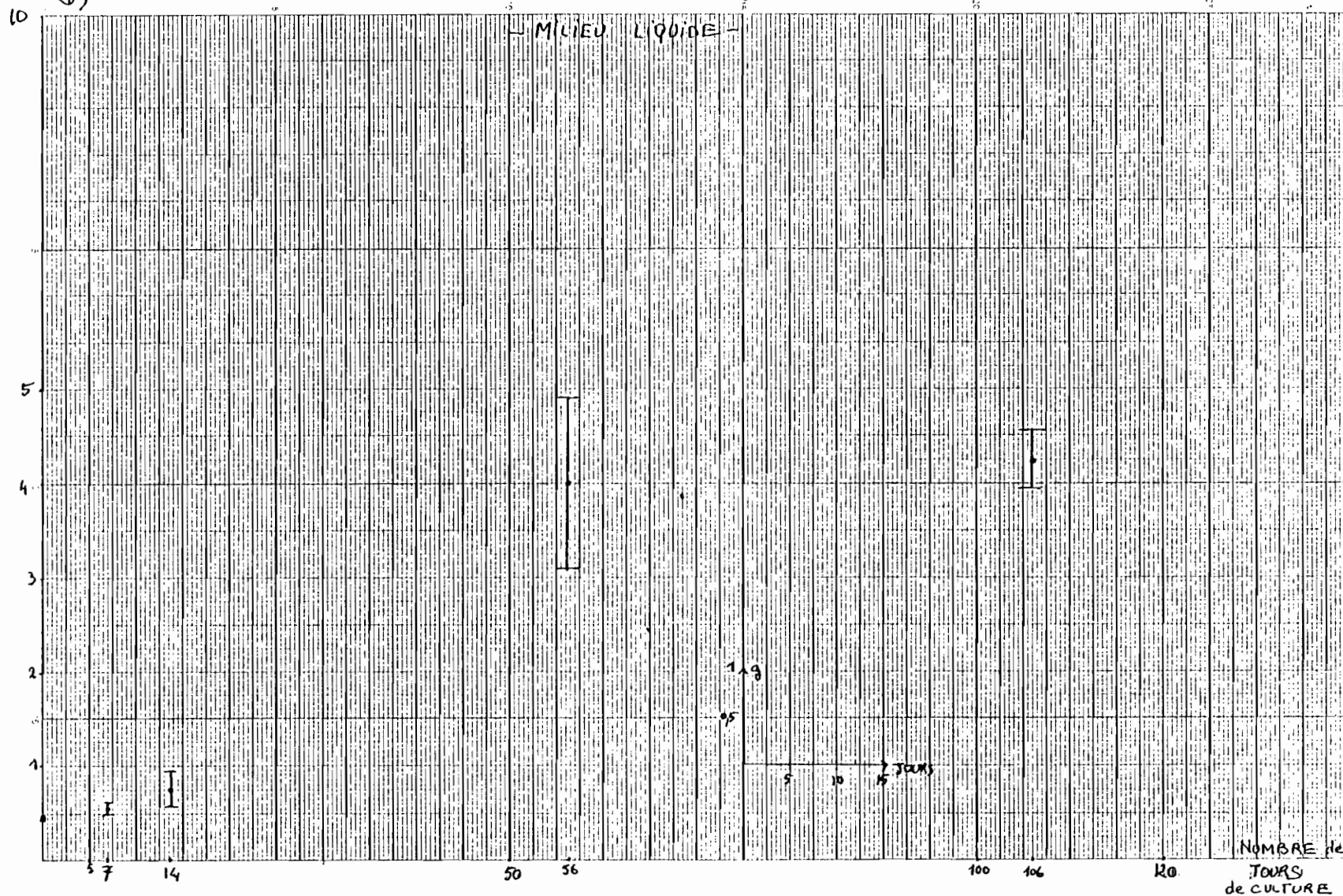
L'aspect des courbes de croissance en milieu liquide, de type sigmoïde, correspondent bien aux courbes de croissance observées sur des cultures de bactéries et des croissances de plantes supérieures (LIORET., 1974)

PF

(9)

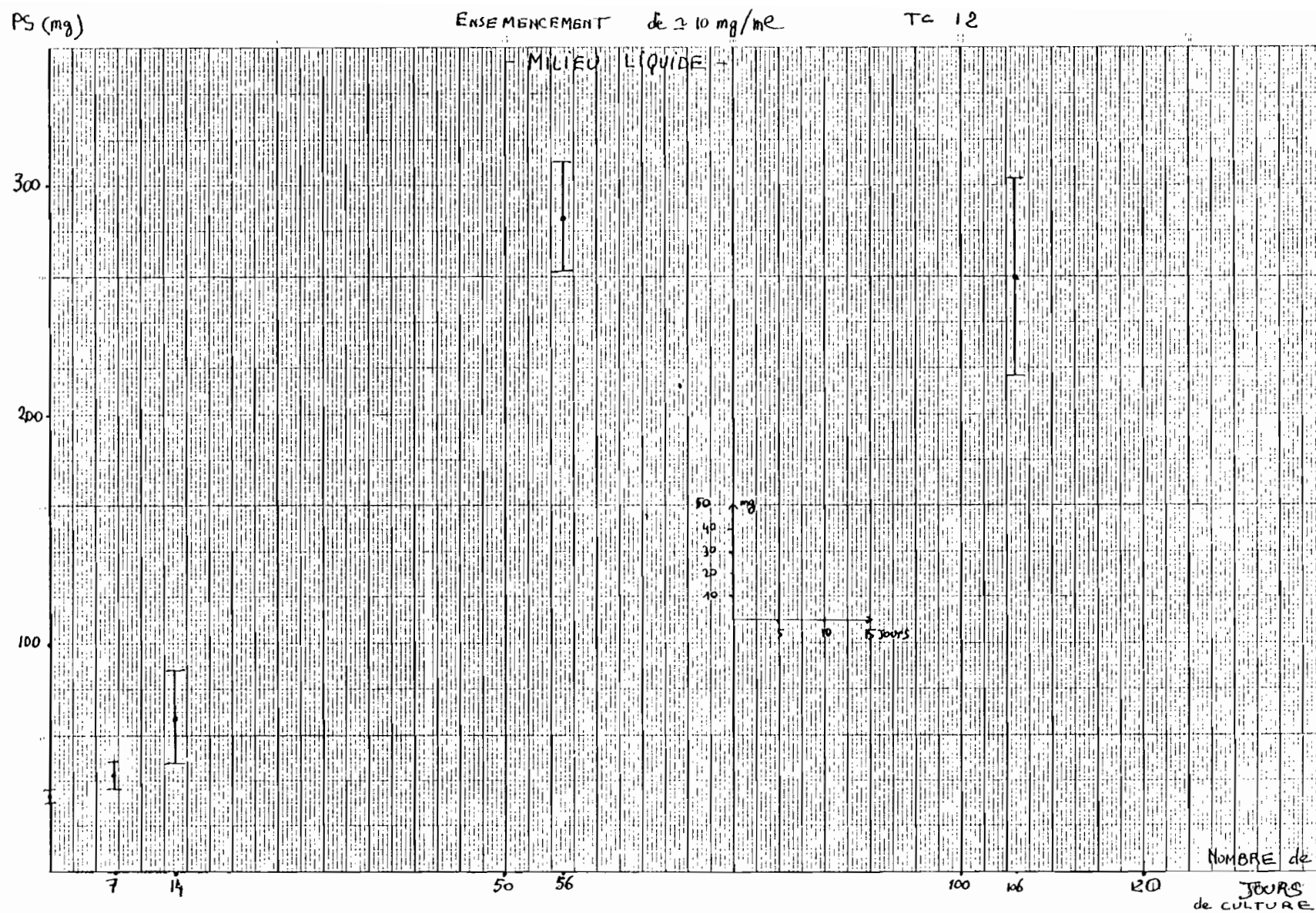
ENSEMENCEMENT de 2 10 mg/ml

Tc 12



Courbe n°3

Courbe n°4



2 - Etude comparée de la croissance en milieu liquide et gélosé de deux clones différents (Tc 8 et Tc 11) issus d'un "entretien" sur milieu gélosé.

Ensemencement de : 10 mg/ml

Technique employée : cf (Matériel et Méthodes)

2.1 - Objectifs de l'essai

Les clones 8 et 11 ayant été utilisés lors d'un essai d'étude de l'induction et de l'expression de l'organogenèse en milieu liquide et gélosé (cf. B 2.2), il a paru intéressant de confronter les résultats à ceux fournis par l'étude de la croissance de ces deux clones en milieu liquide et en milieu gélosé.

2.2 - Résultats et conclusions

Cf tableaux 1 et 2 et courbes 5 à 8 (PF, PS) des deux clones. L'étude des résultats du clone 8 nous met en évidence que la croissance du milieu gélosé est plus importante que celle obtenue en milieu liquide et ceci tout au long de la durée de la culture.

Cette différence n'est pas significative pour les 30 premiers jours de culture.

Il y aurait pour le milieu liquide, comme pour le milieu gélosé un temps de latence dû à une réadaptation au nouveau milieu. Ceci s'explique très bien pour le milieu liquide, cependant, pour le milieu gélosé, la CCR ne devait pas être dans un état physiologique propice à une reprise

rapide de la croissance. La CCR au moment du prélèvement pouvait être dans sa phase de ralentissement, au lieu d'être au début de la phase exponentielle.

Les mesures à 60 jours, puis à 90 jours, montrent que la CCR sur le milieu gélosé, rattrape son équilibre, donnant plus rapidement des taux de croissance de 6 à 19 (PS) au lieu de 1,3 et 0,8 (PS) pour le milieu liquide.

L'étude des résultats du clone 11 (tableau 2, courbes 7 & 8) sont un peu analogues à ceux obtenus avec le clone 8, cependant la quantité de matière finale à 90 jours est supérieure à celle obtenue par le clone 8, pour une masse initiale identique

Les valeurs obtenues en milieu gélosé sont encore supérieures à celles obtenues en milieu liquide, mais leurs différences ne sont pas vraiment significatives.

Cependant nous constatons que la courbe de croissance du milieu gélosé est à chaque fois supérieure à la courbe de croissance du milieu liquide. Cette observation peut montrer que le milieu gélosé a une certaine tendance à se montrer légèrement plus favorable que le milieu liquide.

Si nous nous référons aux résultats d'organogenèse obtenus avec ces mêmes clones (B.2.2), nous constatons que le clone 8, qui a une plus faible croissance par rapport au clone 11, présente une plus grande aptitude à répondre à "l'induction" du passage en milieu liquide organogène.

Peut-on en déduire que la croissance des tissus d'un clone est liée à son organogenèse ? Des essais ultérieurs (cf C) ont essayé d'y répondre.

Une étude de l'évolution de la teneur en eau du matériel végétal à l'état de CCR, placé dans les conditions de milieu liquide, ou restant sur milieu gélosé, vient confirmer l'hypothèse, formulée au paragraphe (A.1), d'un choc osmotique au début de la mise en culture.

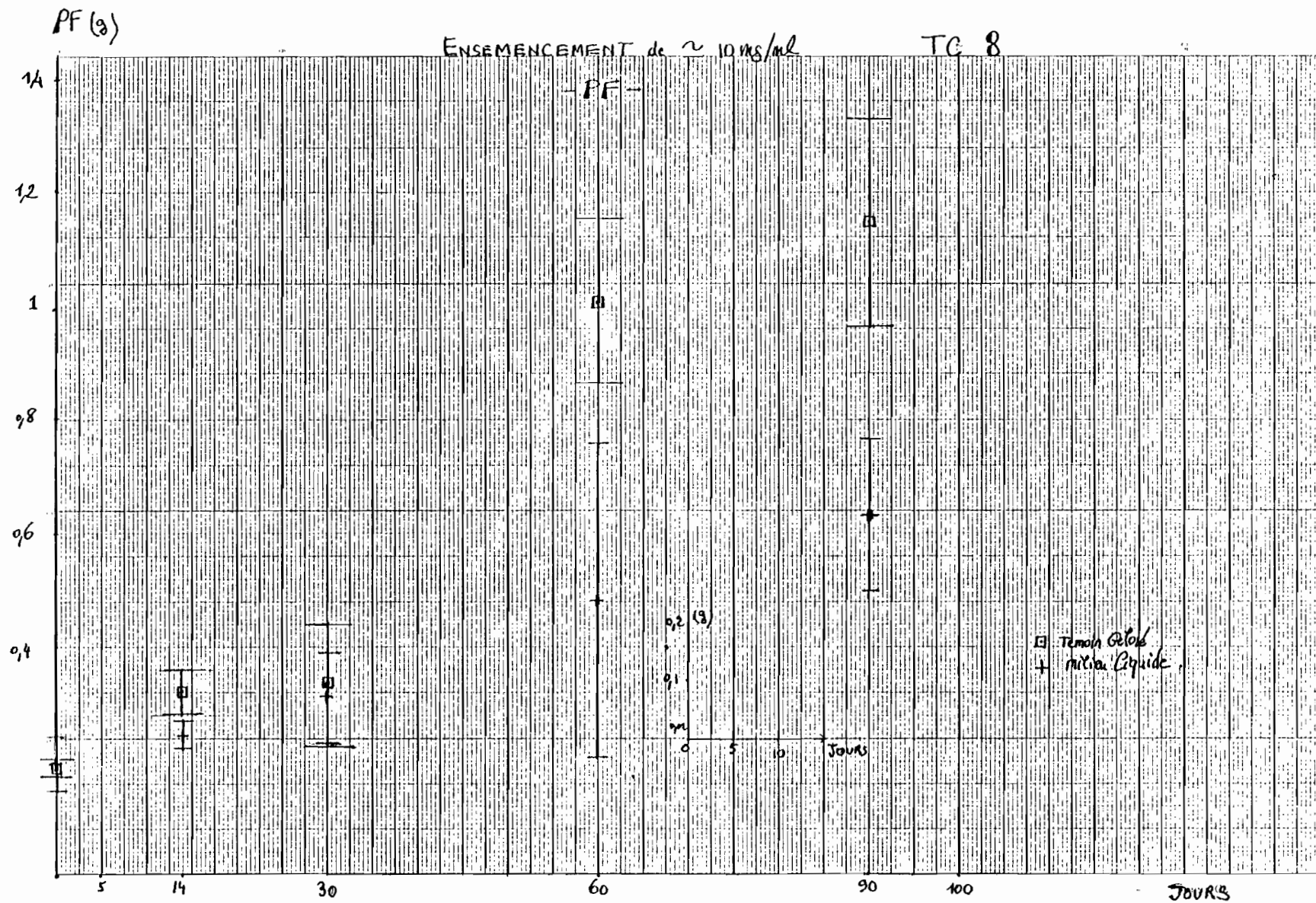
Ce phénomène est observable à t_0 et à 7 jours (les mesures à t_0 s'effectuent après 24 heures de milieu liquide) Il se caractérise par une plus faible teneur en eau des tissus placés en milieu liquide : de l'ordre de 84% au lieu de 95% pour les milieux gélosés.

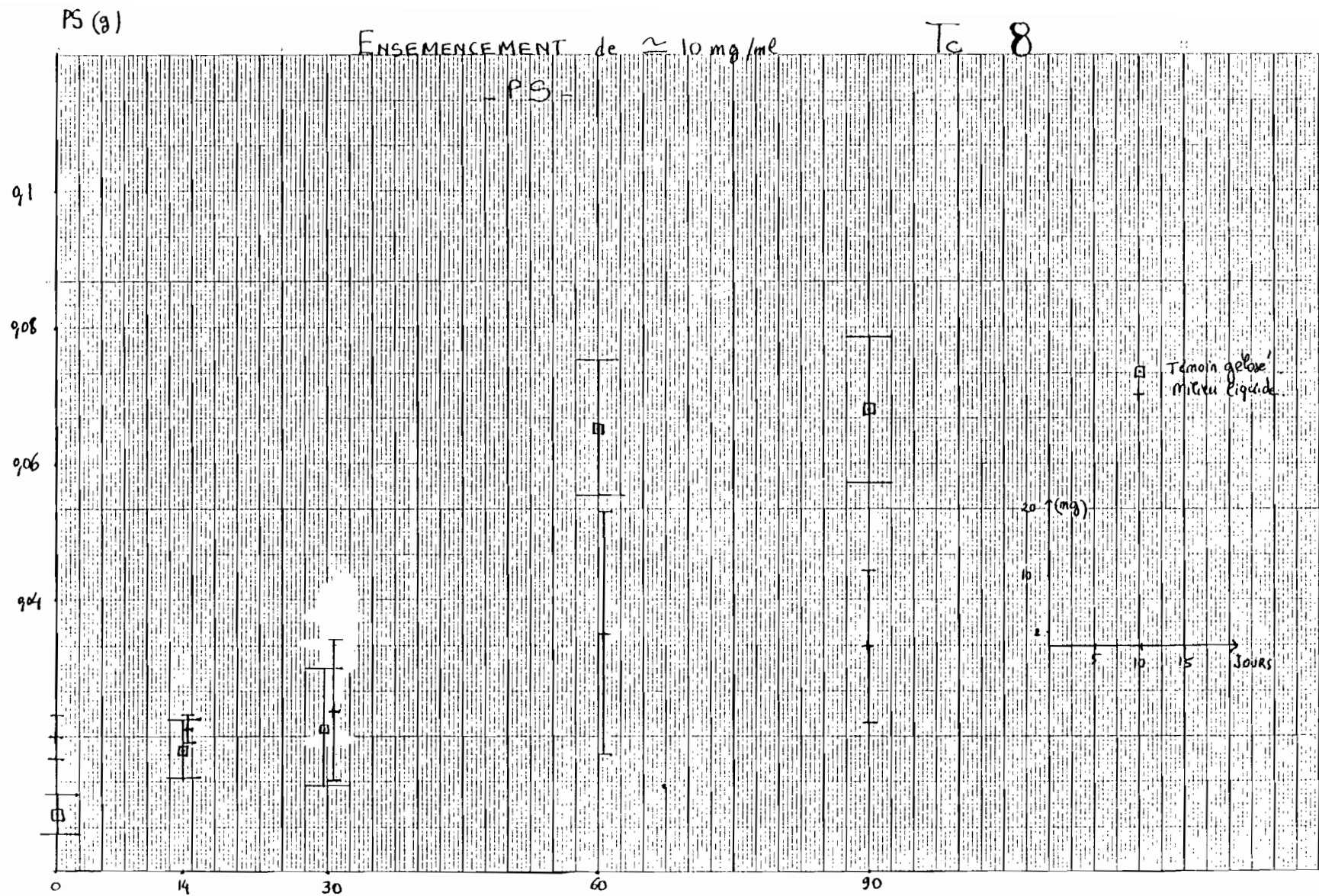
Au bout de 14 jours les différences s'estompent et les teneurs en eau avoisinent 94%.

Cette différence observée pourrait s'expliquer, en particulier, par l'éclatement des cellules en auxesis au moment des changements de conditions de culture.

Tableau n°1 Résultats du clone a 3

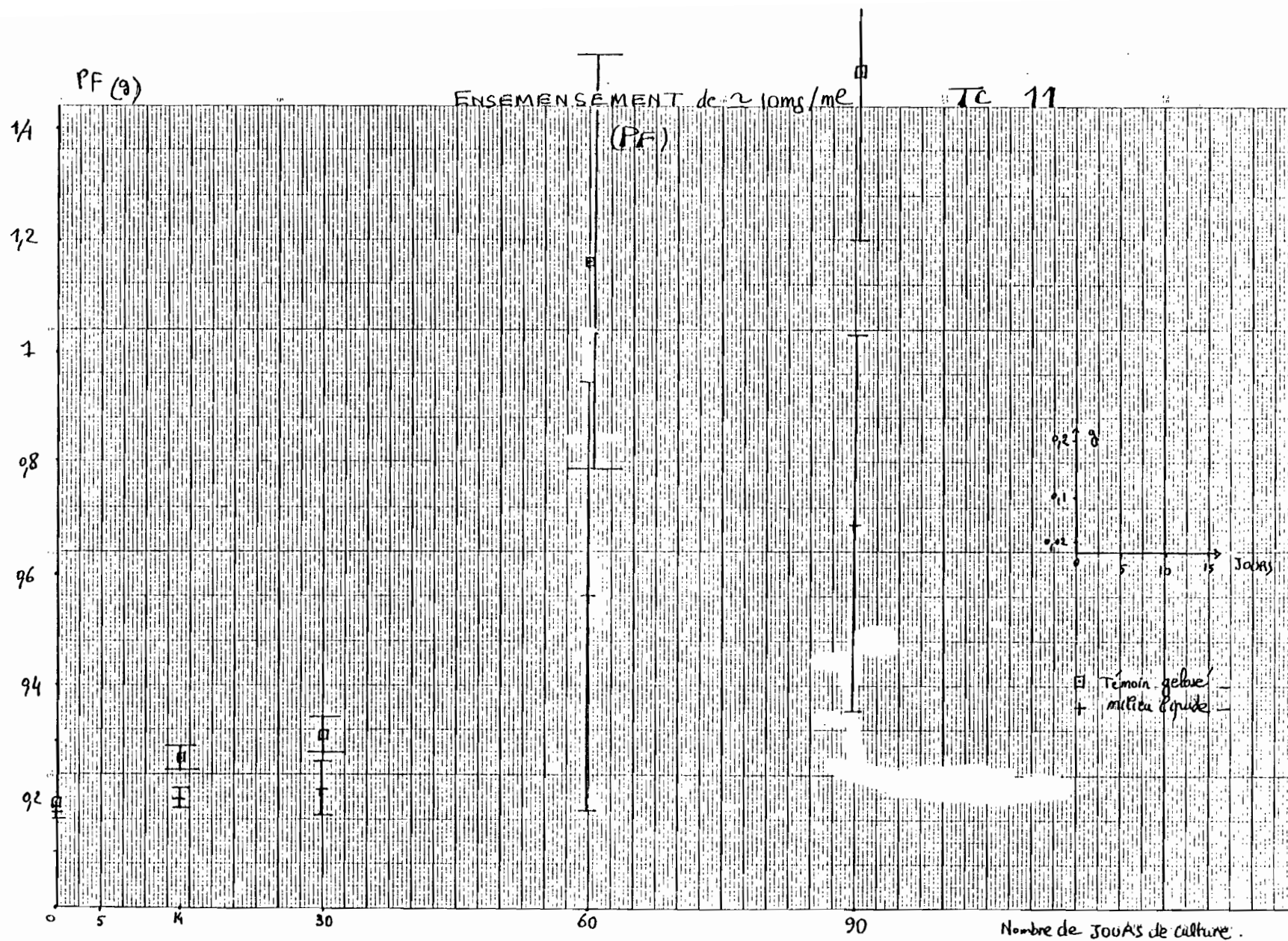
		(y)	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	$\frac{P_1 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_3 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_4 - P_0}{P_0}$	Temps de doublement (j)			
												14j	30j	60j	90j
MILIEU PROVIDE	PF	m	0,1976	0,2552	0,3197	0,4774	0,6032	0,7	0,7	2	2	39	42	41	52
		r	0,444	0,0357	0,08	0,239	0,14	0,15	0,3	0,9	0,7	18	12	14	3
		i	0,55	0,038	0,08	0,25	0,15	0,19	0,4	1,4	0,7				
		n _p	5	6	6	6	6	5	5	4	6	5	5	4	5
	PS	m	0,0196	0,021	0,0236	0,0361	0,0355	0,097	0,4	1,3	0,8	138	117	56	
		r	0,0026	0,001	0,01	0,0187	0,009=	0,056	0,5	0,74	0,5	91	91	17	
		i	0,003	0,002	0,01	0,02	0,011	0,139	0,79	1,7					
		n _t	5	3	6	6	6	3	4	4	6	3	4	4	
MILIEU GROSSE	PF	m	0,1947	0,2313	0,2554	0,0174	1,1535	0,7	1	4	5	19	38	25	35
		r	0,0023	0,0379	0,104	0,153	0,174	0,19	0,53	0,8	1,26	4	14	3	4
		i	0,0025	0,04	0,109	0,16	0,18	0,2	0,83	0,84	1,3				
		n _p	5	6	6	6	6	6	4	6	6	6	5	6	6
	PS	m	0,0095	0,0177	0,021	0,0647	0,068	0,9	1,2	6	19	19	31	22	32
		r	0,0026	0,0041	0,007	0,0092	0,009	0,43	0,7	0,9	8	8	12	2	2
		i	0,003	0,0043	0,009	0,0096	0,01	0,45	0,93	0,9	8				
		n _p	5	6	5	6	6	6	5	6	6	6	5	6	6

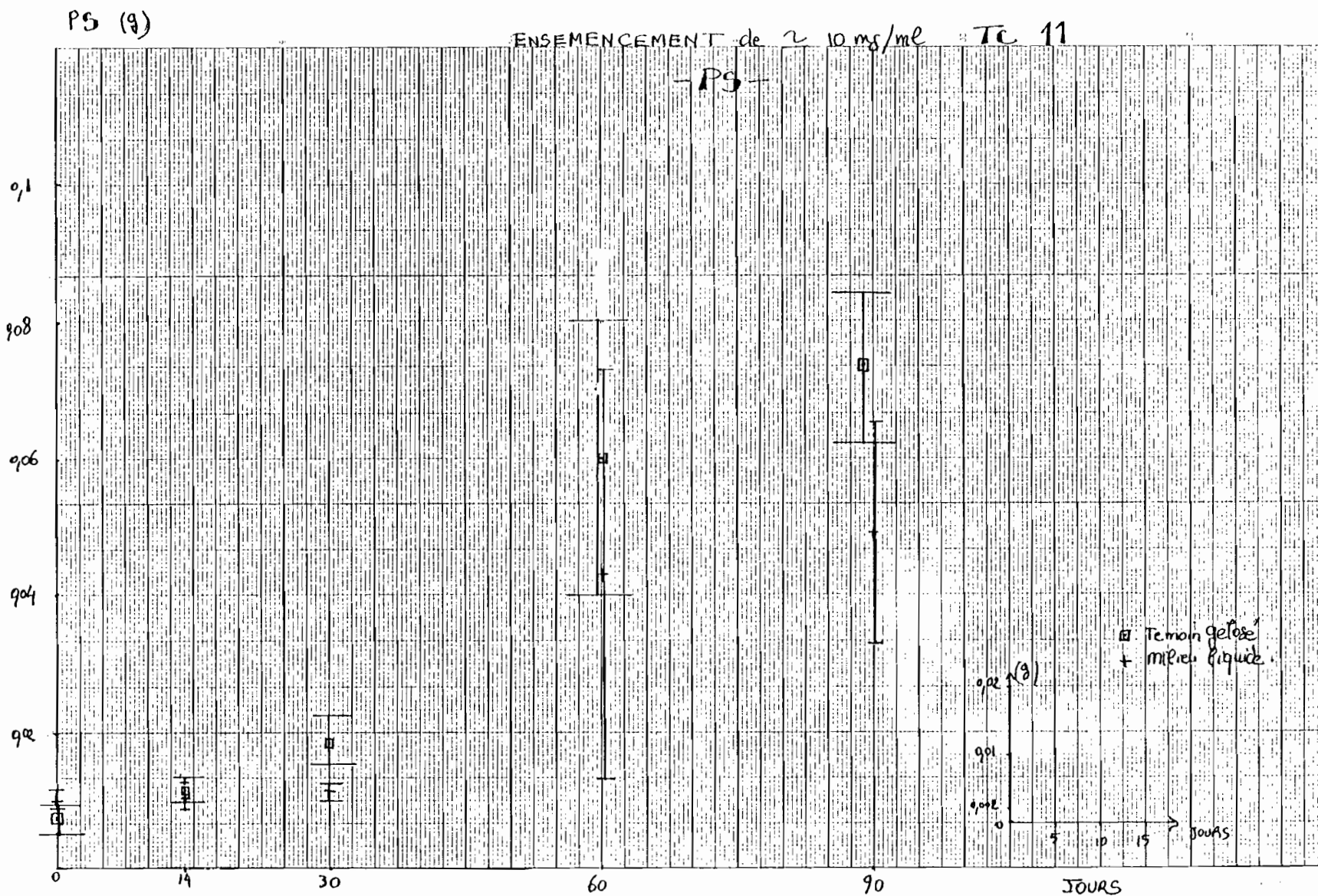




Courbe n° 6

Courbe n° 7





3 - Etude de l'adaptation des CCR en milieu liquide

3.1 - Objectif de l'essai

Nous avons vu précédemment qu'une des causes probables de la plus faible croissance en milieu liquide ; par rapport au milieu gélosé, serait du à l'inadaptation des tissus aux conditions de culture en milieu liquide.

Pour essayer de mettre en évidence la nécessité de préparer les cellules et agrégats cellulaires provenant du milieu gélosé au milieu liquide nous avons comparé la croissance des tissus d'un clone (Tc 31) à leur 1^{ère} subculture (condition II) à leur 3^{ème} subculture (condition I) en milieu liquide.

L'étude de la croissance s'est faite par des pesées PF et PS à 23, 30, 35 et 41 jours selon la technique décrite dans le chapitre Matériel et Méthodes.

3.2 - Résultats

Les résultats sont regroupés dans les tableaux et courbes, PF et PS correspondant aux conditions I et II représentant l'évolution de la croissance au cours du temps.

Analyse des résultats obtenus après : a) 1^{ère} subculture (condition II):

- le milieu gélosé permet d'obtenir une croissance supérieure au milieu liquide. (Tableau n°4 ; courbes n°11 et n°12)

b) 3 subcultures (condition I):

la croissance sur milieu gélosé est supérieure à celle obtenue en milieu liquide. (Tableau n°3 ; courbes n°9 et n°10)

c) Comparaison des croissances entre les conditions I et II.

Les valeurs du PF à 41 jours en milieu liquide comme en milieu gélosé pour la condition I (3 subcultures) sont 4 fois plus grandes que celles obtenues dans la condition II (1 subculture).

Ces résultats nous montrent bien la nécessité de placer les tissus pendant au moins 2 cycles de subculture en milieu liquide afin de les placer dans les meilleures conditions de croissance ; les tissus acquièrent alors une capacité de se multiplier beaucoup plus grande que dans le cas où ils seraient maintenus sur gélose (ce qui est le cas du "procédé") Cette différence est d'un facteur 4.

4 - Influence d'un "passage" en milieu liquide sur la croissance de CCR cultivées sur gélose.

Nous appelons "passage" en milieu liquide le séjour d'un tissu en milieu liquide pendant 1 ou plusieurs cycles avant de retourner sur milieu gélosé.

Cette description correspond en fait à la condition I du paragraphe précédent (clone 31). (Tableau n°3 ; courbes n°9 et n°10)

Nous avons comparé les résultats de croissance obtenus sur le milieu gélosé et en milieu liquide pour cette condition I. Les résultats sont regroupés sur le tableau et les courbes PF et PS correspondants. L'analyse des résultats du PF montre que à 41 jours la masse obtenue sur gélose , par rapport à celle obtenue en milieu liquide, est 1,7 fois plus importante (elle est multipliée par 2 à 35 jours).

Le "passage" en milieu liquide d'un tissu, à l'état de CCR, pendant un ou plusieurs cycles permet d'obtenir une production de masse végétale qui multiplie par 4 celle obtenue par le procédé, le milieu liquide ne permettant qu'une augmentation d'un facteur 2 .

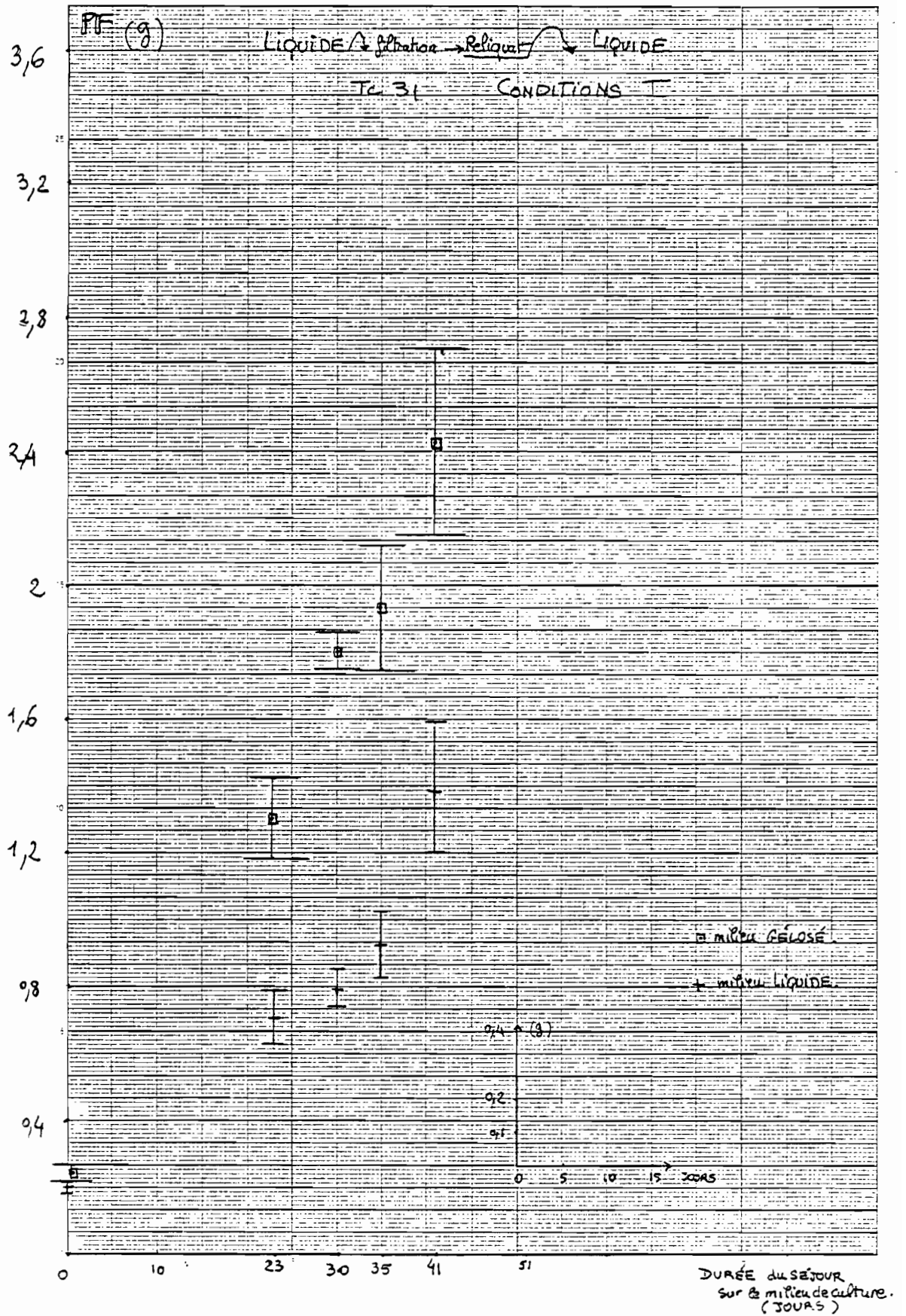
Tableau de résultats du clone 31 - Conditions I

(g)			P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	$\frac{P_1-P_0}{P_0}$	$\frac{P_2-P_0}{P_0}$	$\frac{P_3-P_0}{P_0}$	$\frac{P_4-P_0}{P_0}$	$\frac{P_5-P_0}{P_0}$	$\frac{P_6-P_0}{P_0}$	Temps de doublement (s)				
			0	15	30	35	41									23	30	35	41	
MILLIEU LIQUIDE	PF	m	0,2	0,725	0,791	0,945	1,393			2	3	3	6			12	15	15	14	
		σ	0,01	0,08	0,06	0,1	0,18			0,5	0,4	0,5	0,7			1	1	1	1	
		i	0,01	0,08	0,06	0,1	0,19			0,5	0,4	0,5	0,7							
		R	6	6	6	6	6			6	6	6	6			6	6	6	6	
	PS	m	0,019	0,08	0,085	0,087	0,1026			3	3	4	4			11	14	16	17	
		σ	0,003	0,009	0,002	0,003	0,006			0,7	0,4	0,5	0,5			1	0,4	0,4	0,7	
		i	0,003	0,009	0,002	0,003	0,006			0,7	0,4	0,5	0,5							
		R	6	6	6	6	6			6	6	6	6			6	6	6	6	
MILLIEU GÉLOSE	PF	m	0,21	1,32	1,823	1,931	2,145			5	8	8	10			9	10	11	11	
		σ	0,02	0,14	0,07	0,18	0,28			0,7	0,5	0,7	1,2			0,7	0,5	0,7	0,5	
		i	0,02	0,15	0,07	0,19	0,29			0,7	0,5	0,7	1,3							
		R	6	6	6	6	6			6	6	6	6			6	6	6	6	
	PS	m	0,015	0,08	0,102	0,105	0,1251			4	6	6	7			10	11	12	13	
		σ	0,003	0,008	0,004	0,008	0,01			0,6	0,4	0,6	0,8			0,5	0,4	0,5	0,5	
		i	0,003	0,008	0,004	0,008	0,01			0,6	0,4	0,6	0,8							
		R	6	6	6	6	6			6	6	6	6			6	6	6	6	

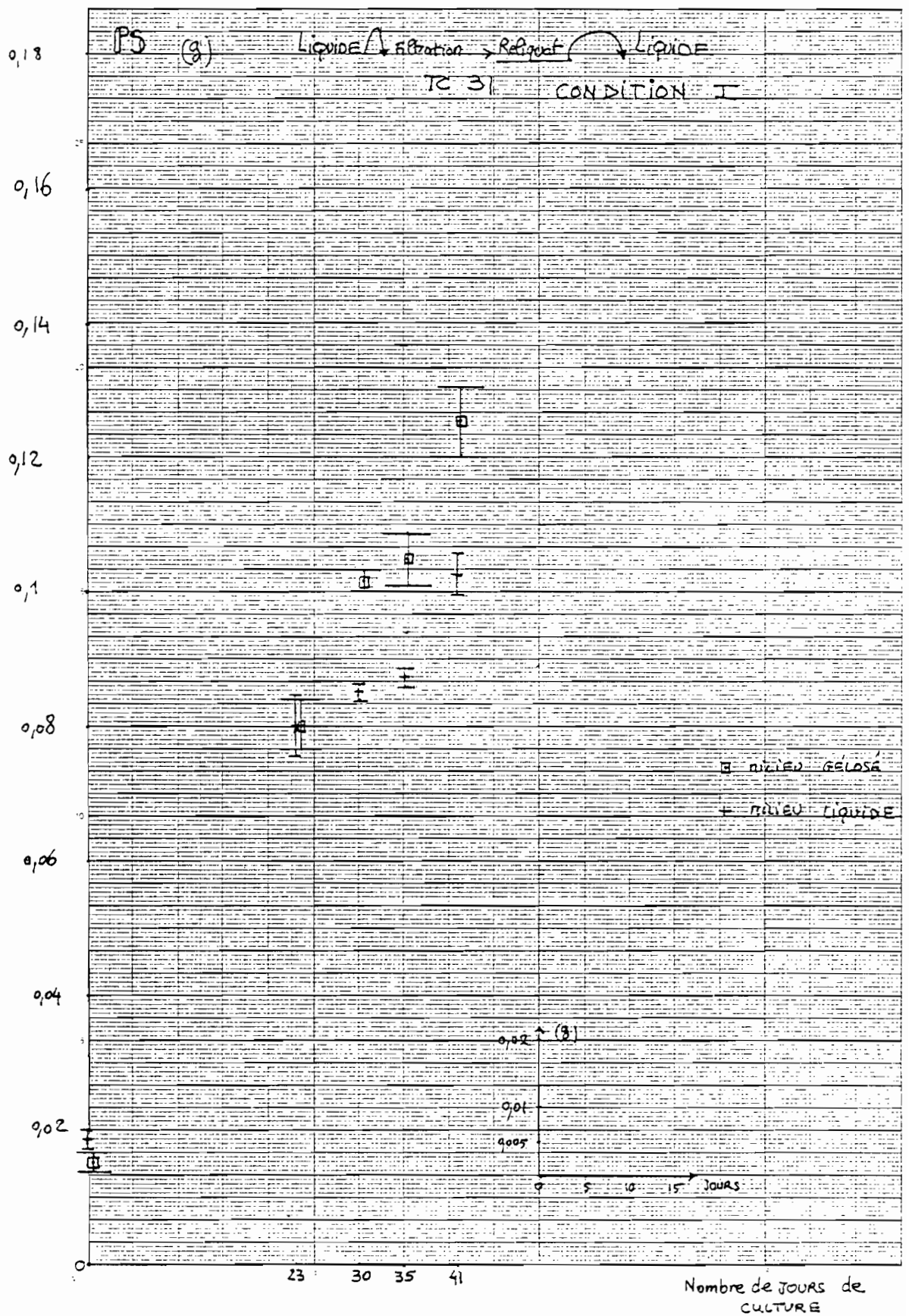
Tableau de résultats du clone 31 - Conditions II

(g)			P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	$\frac{P_1-P_0}{P_0}$	$\frac{P_2-P_0}{P_0}$	$\frac{P_3-P_0}{P_0}$	$\frac{P_4-P_0}{P_0}$	$\frac{P_5-P_0}{P_0}$	$\frac{P_6-P_0}{P_0}$	Temps de doublement (s)					
			0	133	203	353	413									23	30	35	41		
MILIEU LIQUIDE	PF	m	0,107	0,107	0,133	0,154	0,134			0,3	0,3	0,6	2			/	/	66	29		
		σ	0,03	0,03	0,02	0,06	0,14			0,1	0,2	0,5	1,3			/	/	10	11		
		i	0,03	0,03	0,02	0,06	0,17				0,2					/	/				
		R	6	6	6	6	5			2	6	5	5			/	/	5	5		
	PS	m	0,016	0,016	0,014	0,019	0,043			/	/	/	2			/	/	/	35		
		σ	0,003	0,004	0,003	0,007	0,016			/	/	/	1			/	/	/	16		
		i	0,003	0,004	0,003	0,007	0,02			/	/	/				/	/	/			
		R	6	6	6	6	5			/	/	/	5			/	/	/	15		
MILIEU GÉLOSE	PF	m	0,117	0,301	0,414	0,436	0,629			2	2	3	4			18	17	19	17		
		σ	0,002	0,07	0,08	0,07	0,12			0,8	0,8	0,8	1			5	4	12	2		
		i	0,002	0,07	0,08	0,07	0,13				0,8	0,8	1								
		R	6	6	6	6	6			6	6	6	6			6	6	6	6		
	PS	m	0,015	0,019	0,027	0,021	0,047			0,4	0,8	1	2			/	/	37	25		
		σ	0,003	0,005	0,006	0,005	0,006			0,3	0,4	0,3	0,4			/	/	13	3		
		i	0,003	0,005	0,006	0,005	0,006				0,4	0,3	0,4			/	/				
		R	6	6	6	6	6			4	6	6	6			/	/	6	6		

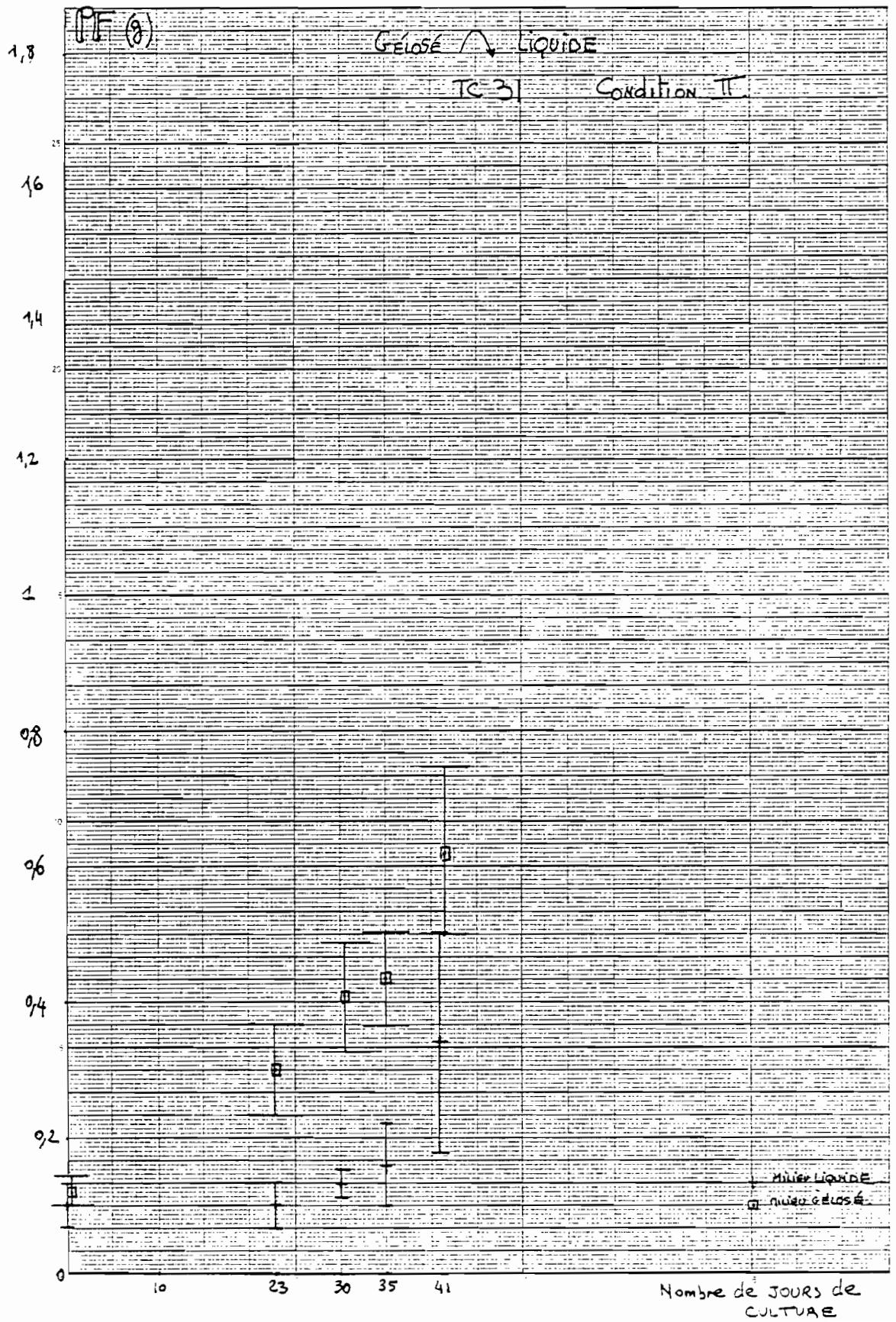
Courbe n° 9



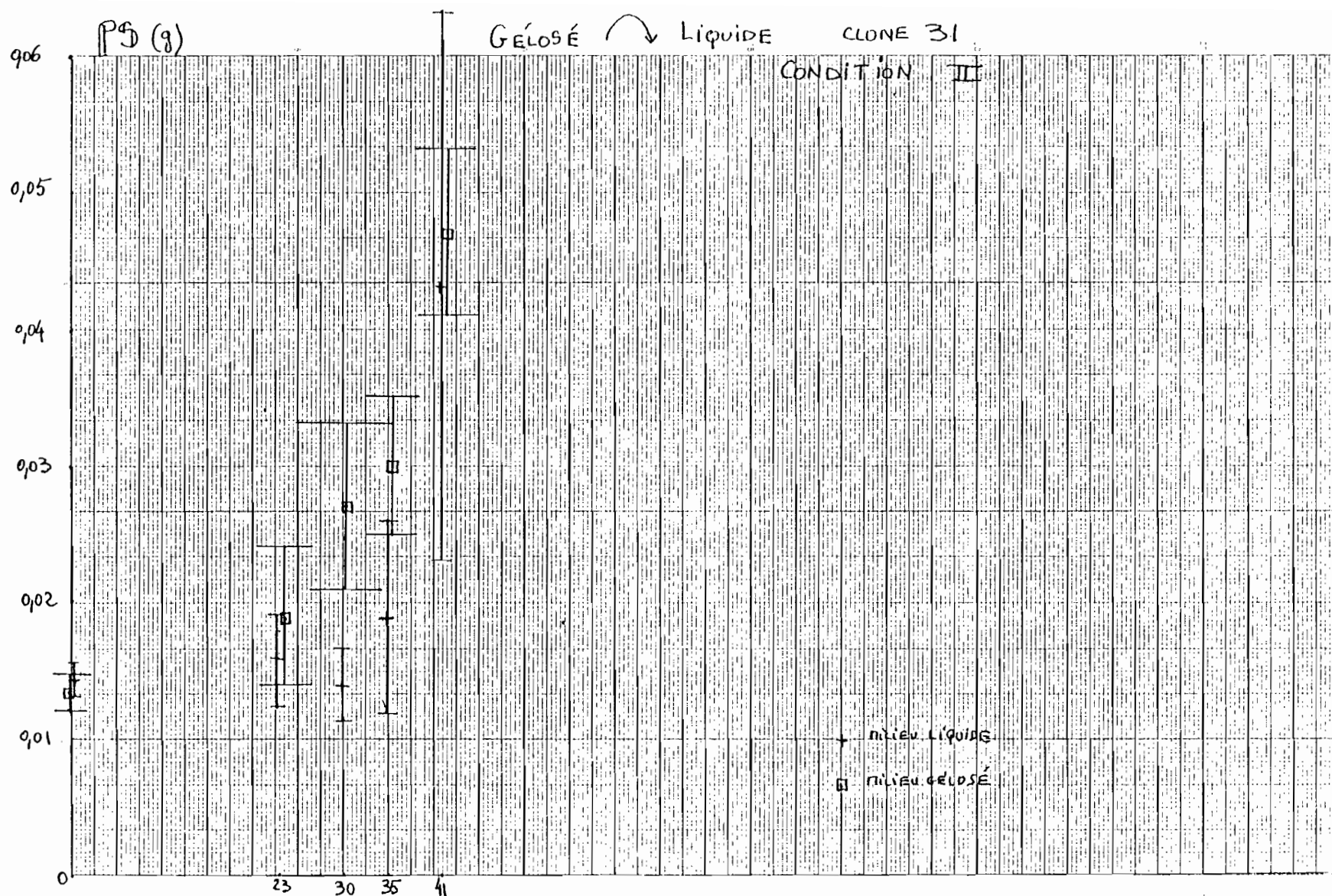
Courbe n° 10



Courbe n° 11



Courbe n° 12



III Résultats

B - Etude des capacités des tissus (CCR ou cals primaires) à exprimer leur potentialité organogène

1 - Organogenèse directe en milieu liquide

1.1 - A partir de CCR

L'étude du comportement de 5 clones différents à l'état de CCR en milieu liquide a permis de constater pour certains clones l'apparition au cours du temps de différentes formes organogènes directement dans la suspension d'agrégats.

La vitesse d'apparition de ces formes et l'évolution de celles-ci diffèrent selon l'origine de ces clones (cf photos 1 à 5)

N° de tête de clone	77 15 A	12	8	56	17
Nbre de jrs de cult. entre l'ensem ^t et l'apparition des 1 ^{ères} formes organogènes	20	-	23	19	81
Nbre de formes organogènes apparues à 80 jours	67	-	2	1	1
type de structure	nodules & emb. stade 1	-	emb. stade 1	emb. stade 1	racine

Le milieu utilisé est de type "organogène" (cf. paragraphe milieux, Matériel et Méthodes)), pour ces 5 clones

Les résultats, obtenus à partir du clone 77 15 A sont détaillés ci-dessous :

- le milieu de culture, à l'ensemencement initial, était de type "organogène" les premiers embryoides sont apparus dans ce milieu, 20 jours après l'ensemencement.

- Au 26^{ème} jour, les embryoides, ayant l'air d'évoluer en racines, sont recueillis sur filtre et redistribués sur 4 milieux différents en ce qui concerne leur composition en phytohormones

traitement phytohormones	A	B	C	D
ANA (mg/l)	1	0	2	0
BAP (mg/l)	2	2	2	0

Les observations de nodules et embryoides faites à 80 jours après l'ensemencement en milieu liquide sont regroupées dans le tableau ci-après

variante taille des nodules et emb ^{des}	A	B	C	D
+++	2	2	3	-
++	10	4	20	3
+	5	5	10	3
Nombre total de nodules et emb ^{des} / variante	17 25%	11 16%	33 49%	6 9%
Importance du verdissement	+++	+	++	-

L'analyse de nombre de nodules et embryoides pour les 4 variantes par le test du X² montre que la différence entre les 4 variantes est hautement significative (X² = 24,7 ; ddl = 3).

La variante C (ANA 2 mg/l, BAP 2 mg/l) employée dans le "procédé" pour l'organogenèse sur gélose donne aussi les meilleurs résultats pour les cultures de CCR en milieu liquide.

1.2 - Embryogenèse directe en milieu liquide à partir de cals primaires.

1.2.1 - Méthodes et Techniques

Les cals utilisés dans cet essai proviennent tous du même arbre Melanococca x Guineensis (TC 31). Ces cals ont été répartis et maintenus sur 13 variantes pendant 2 mois et repiqués aux 8 nouvelles variantes, pendant encore 2 mois.

Ces traitements portent sur la nature et la concentration en phytohormones. Le choix des variantes a été dicté par les résultats obtenus au Laboratoire dans l'utilisation des milieux gélosés.

La première partie de l'essai sur "roller-bottle", dans des bouteilles de 500 ml contenant 100 ml de milieu. La seconde partie s'est faite en tube sur "roller-tube" (vitesse de rotation 2,5 t/mn) dans le but d'obtenir un plus grand nombre de répétitions par variante.

Les tableaux ci-après donnent les concentrations en phytohormones pour les différentes variantes :

1^{ère} subculture

m/g/e	A	B	C	D	E	F	G	H	J	K	L	M	N
ANA	1	0	2	-	0	2	1	-	-	-	-	-	-
2-4D	-	-	-	-	-	0,5	-	0,5	0,5	0,5	1	1	2
BAP	2	2	2	-	1	-	1	2	2	2	1	1	2
ADENINE S *	-	-	-	-	-	-	-	-	40	40	40	40	40
CHARBON	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-	200	-

2^{ème} subculture

m/g/e.	A	F	G	M	⊗	P	Q	R
ANA	1	2	1	-	2	2	-	-
2-4D	-	0,5	-	1	-	0,5	0,5	1
BAP	2	-	1	1	0,1	0,5	0,5	1
ADENINE S *	-	-	-	40	-	30	30	30
CHARBON.	-	-	-	200	-	-	-	-

1.2.2 - Résultats

A la suite de la 1^{ère} subculture ; seuls les tissus placés sur les variantes A, F, G, M ont pu être repiqués. Tous les autres tissus présentaient des brunissements importants, souvent accompagnés de brunissements dans le milieu ; ces cals ont dû être éliminés.

En ce qui concerne la 2^{ème} phase de l'essai, il n'est apparu d'embryoïdes que dans 3 variantes. Le tableau suivant donne la succession de milieux subis par les cals, ayant donné des embryoïdes.

Variantes de la 1 ^{ère} subculture	G	G	C
" " 2 ^{nde} " "	A	G	R
Nbre de jours écoulés depuis le début de la 2 ^{nde} subculture	18	60	60
Nbre de répétitions à la 2 ^{ème} culture	3	3	3
Nombre de tubes ayant répondu	1	1	1

*

* les photos (6,7 et 8) correspondent à ce cas-ci

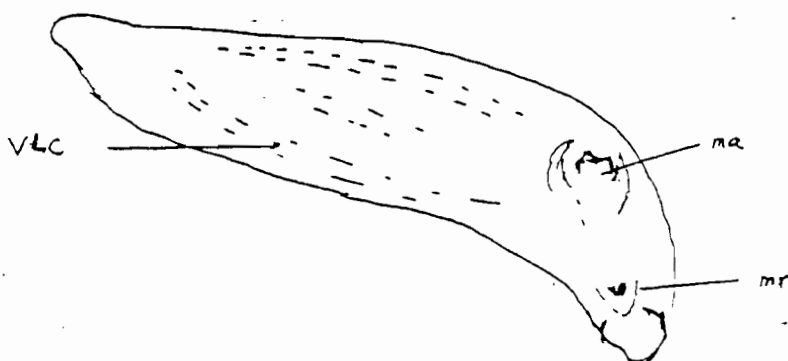
Des observations préliminaires nous avaient montré qu'il y avait, après l'apparition de l'embryoïde" en milieu liquide, un léger développement suivi d'un blocage. Nous avons donc essayé d'obtenir la poursuite de leur développement en les repiquant sur milieu gélosé sans phytohormones.

1.3 - Développement des embryoïdes apparus en milieu liquide

En ce qui concerne les embryoïdes apparus à partir de CCR nous avons réalisé un certain nombre d'observations

Une étude à la loupe binoculaire d'une coupe d'une de ces "formes organogènes", taite à main levée et colorée à l'hématoxyline nous a confirmé qu'il s'agissait bien d'embryoïdes

VLC : vascularisation du
limbe cotylédonnaire
ma : méristème apical
mr : méristème racinaire



Ce type d'organisation correspond à celle décrite sur les embryons de graines d'Elaeis guineensis Jacq. (VALLADE 1965).

L'ensemble des structures observées sur les photos (4, 5 et 6) correspondent à ce type d'embryoïdes avant la sortie de la première feuille.

Mais nous n'avons pas observé par la suite de développement du méristème apical, caractérisé par la sortie de la première feuille.

Les embryoïdes apparus en milieu liquide (photos 1, 2 et 3) sont assez semblables à ceux obtenus par KONAR, THOMAS et STREET, 1972 (I.2).

1.4 - Conclusions

Les résultats obtenus dans l'étude de l'organogenèse sont très fragmentaires, du fait du trop faible nombre de répétitions par essai (en particulier dans le cas des cals primaires).

Cependant nous pouvons faire certaines remarques :

- les phénomènes d'organogenèse à partir de cals primaires est possible en milieu liquide. Des embryoïdes et des racines ont été obtenus dans certaines conditions :

- on a pu obtenir dans un certain nombre de cas le développement de ces embryoïdes en jeunes plantes.

Rappelons qu'il ne s'agit pas ici de suspension de cellules isolées mais de culture de tissu en milieu liquide.

Les embryoïdes issus de cals ont eu des devenir très différents. Nous avons eu trois types de réponse :

1) le cycle de subcultures $G \rightarrow A$ a donné un embryoïde vrai (photos 6 et 7) avec un limbe cotylédonnaire bien blanc.

Après son repiquage sur milieu gélosé sans phytohormones, son développement s'est poursuivi laissant apparaître, 4 mois après la formation de l'embryoïde, une première feuille par une déchirure du cotylédon (ph. 8)

2) Pour le cycle de subculture $G \rightarrow G$, la structure obtenue avait plutôt l'apparence d'une masse proembryonnaire (HALPEIN 1966 ; KONAR & al., 1972 - a. b) I.2., capable par la suite de redonner des embryoïdes par embryogenèse adventive. Nous n'avons pu cependant obtenir ce phénomène après transfert sur gélose.

3) L'embryoïde apparu dans le cycle de culture $C \rightarrow R$ s'est nécrosé après avoir été placé sur sur gélose.



PLANCHES PHOTOS

Légende des figures

1) Embryogenèse en milieu liquide à partir de CCR

Fig. 1, 2 et 3 : Embryoïdes apparus en milieu liquide après 20 jours de culture (fig.1 x 1,5 ; fig. 2 x 1,9 ; fig.3 x 1).

Fig. 4 : Les mêmes embryoïdes après 5 mois de culture (x 5,6)

Fig. 5 : Les mêmes embryoïdes après 5 mois de culture (x 4,8)

2) Embryogenèse en milieu liquide à partir de cals primaires

Fig. 6 : Embryoïde avec son limbe cotylédonnaire blanc rattaché au cal primaire dont il est issu (x5) (à 96 jours de la mise en culture)

Fig. 7 : Le même embryoïde repiqué sur gélose (x 5,4)

Fig. 8 : Le même embryoïde ayant formé sa première feuille à 246 jours de la mise en culture (x 3,8).

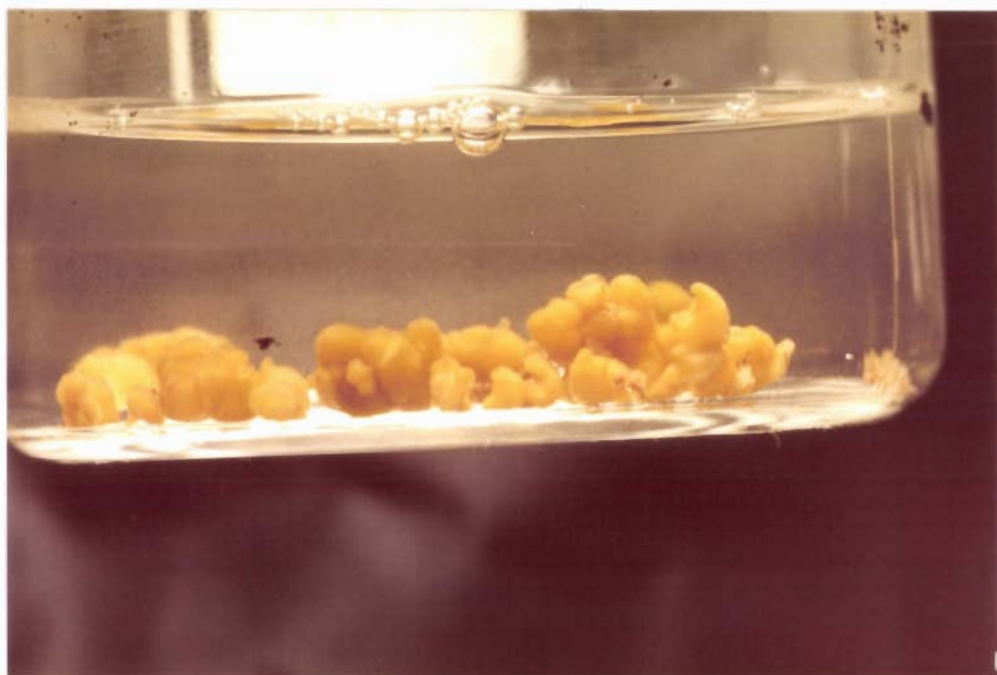


FIG. N° 1



FIG. N° 2

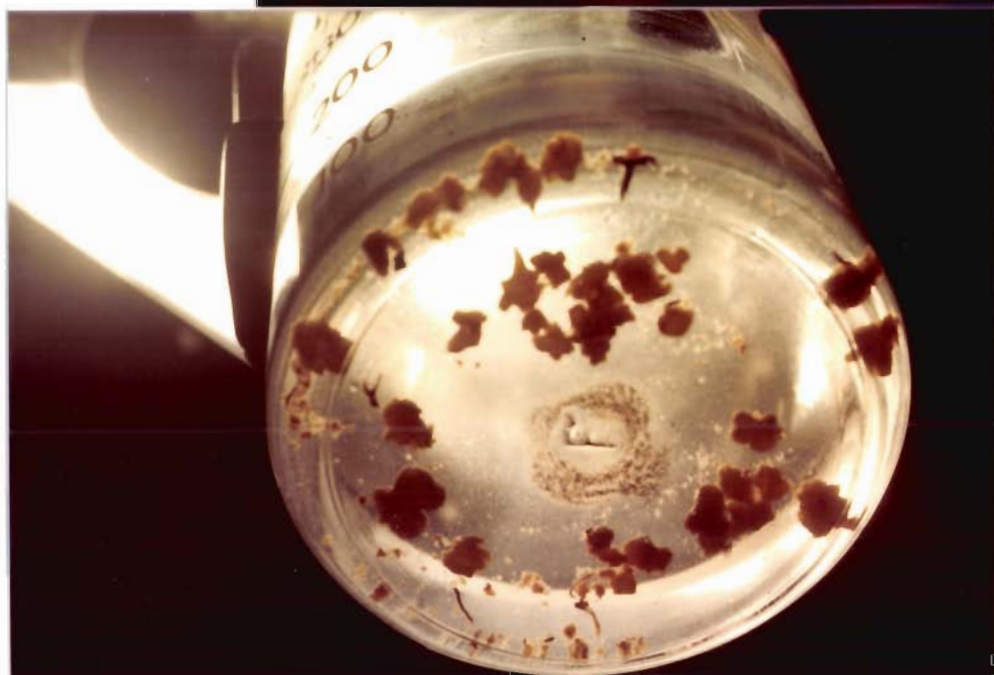


FIG. N° 3

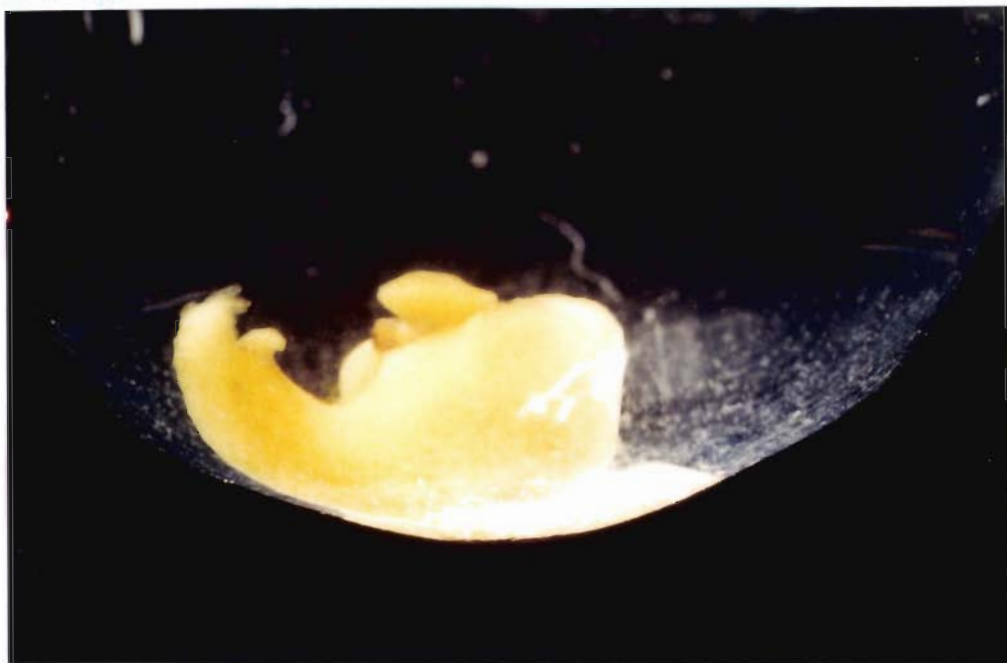


Fig. N° 4

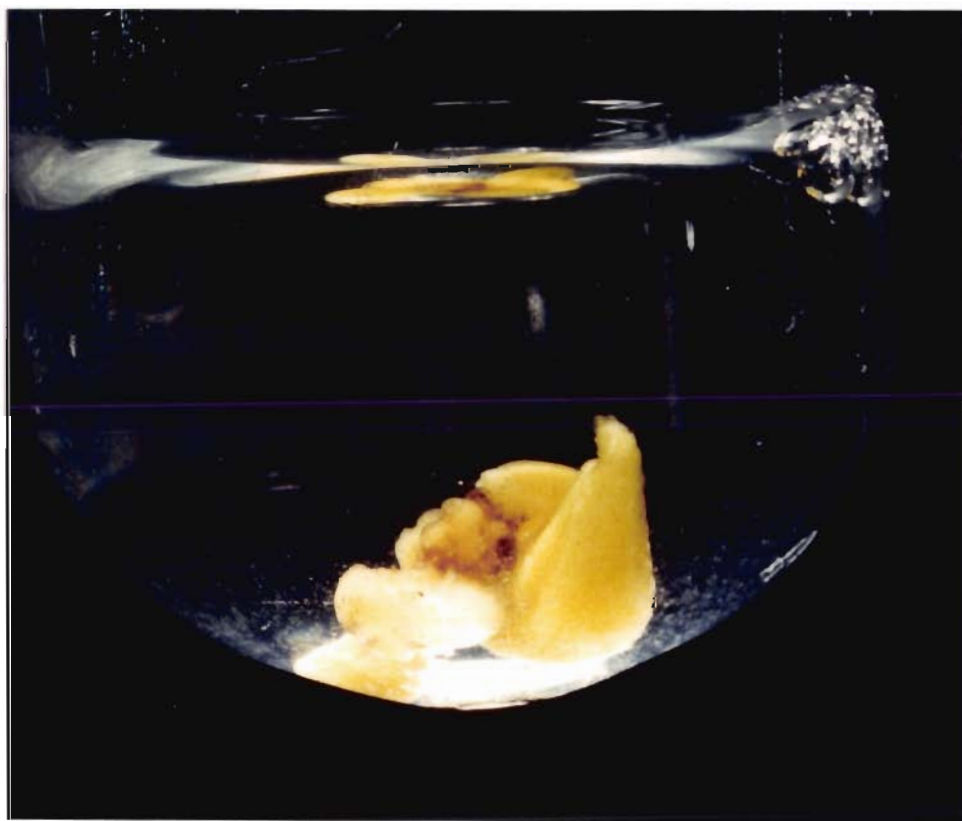


Fig. N° 5



FIG. N° 6

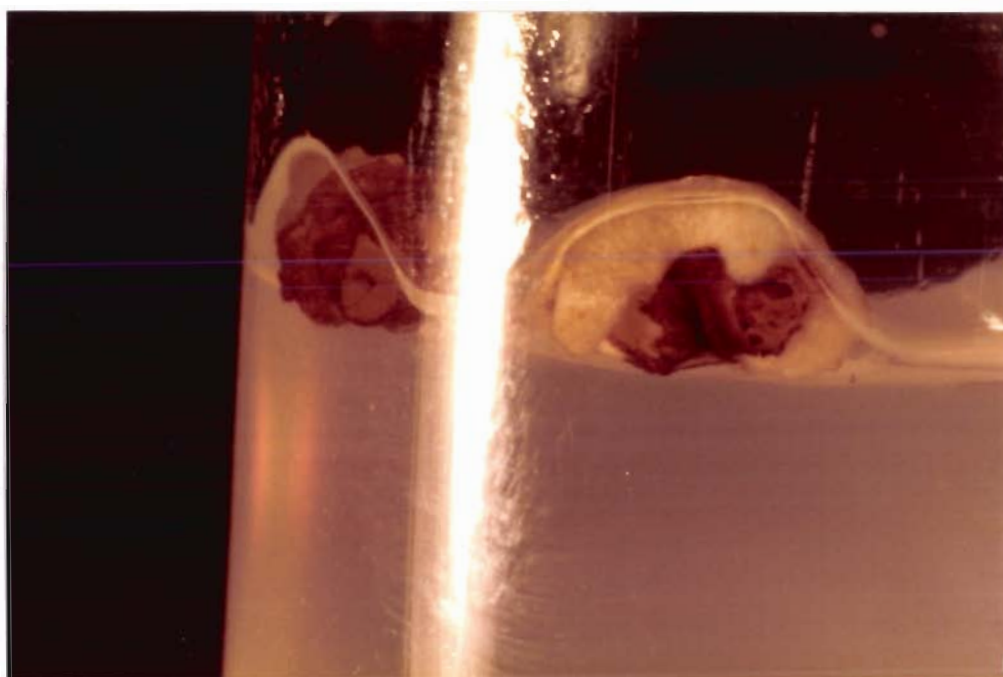


FIG. N° 7

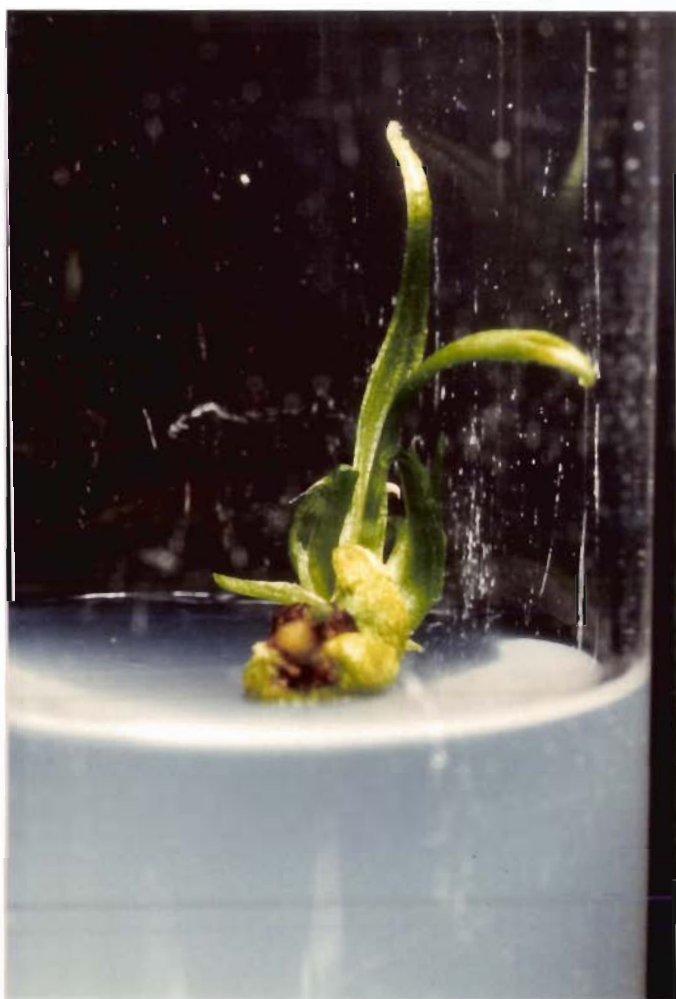


Fig. N° 8

2 - Organogénèse sur milieu gélosé = Influence d'un passage en milieu liquide

2.1 - Techniques et méthodes employées
matériel végétal = 6 CCR issus de 5 individus différents.

Dans chaque cas étudié, à un lot passant en milieu liquide, correspond un lot témoin maintenu sur milieu gélosé.

Flaconnage = bouteilles de 500 ml pour le milieu liquide et flacons de 100 ml.

a) Clones utilisés : 8, 12 A, 12 M2, 20 et 56.

4 variantes ont été confrontées au matériel. Elles portent sur le type de milieu dans lequel sont placés les clones au 1^{er} cycle : "entretien" ou "organogène". Le tableau ci-dessous explique leurs caractéristiques.

N° de la variante		1	2	3	4	
N° cycle	Type de milieu					
1 ^{er} cycle 30 jours	L I Q U I D E	organogène	+			
		entretien		+		
	G É L O S É	organogène			+	
		entretien				+
2 cycles suivants	Milieu organogène gélosé	+	+	+	+	

b) clones utilisés : 8 et 11

Milieus liquide et gélosé comportent 6 variantes en phyto-hormones. Le flacon de culture est le même que pour a)

tableau des variantes ci-après

mg/L	1	2	3	4	5	6
ANA	1	2	—	—	2	2
BAP	2	0,1	0,5	1	2	0,5
2-4 D	—	—	0,5	1	—	0,5
Adénine Sulfate	—	—	30	30	—	30

L'emploi de cette technique, par "un passage en milieu liquide", reposait sur l'hypothèse de la présence d'inhibiteurs au sein des tissus de CCR restés sur milieu gélosé bloquant ou freinant le phénomène d'organogenèse. Le passage en milieu liquide devait alors débarrasser les tissus des inhibiteurs, rejetés dans le milieu liquide au moment de la filtration, à la fin de ce passage.

2.2 - Résultats

2.2.1 - Résultats concernant les clones 8, 12 M2, 20 et 56.

Le but de cet essai était surtout de comparer l'action d'un cycle liquide "organogène" ou "entretien", de même durée, sur la fréquence d'apparition de nodules et d'embryoïdes après retour sur un milieu organogène gélosé.

Sur les 5 clones, mis en jeu dans cet essai, 2 ont exprimé leur organogenèse, pendant la 1^{ère} phase en milieu liquide.

Les résultats ont été décrits dans le paragraphe (B.1.1).

D'après nos observations au cours de l'essai et à partir des tableaux (5 et 6), nous avons pu estimer qu'il existait, pour un type de milieu donné, un effet favorable du passage en milieu liquide sur l'expression des capacités organogènes.

Cet effet favorable d'un passage en milieu liquide est sensiblement marqué pour le clone 56. Le nombre d'embryoïdes à 120 jours de culture pour le traitement 1 est supérieur aux trois autres.

■ La comparaison du nombre d'embryoïdes moyen par flacon, pour le clone 56 quelque soit leur stade de développement et par stade respectif de développement, pour les conditions 1 et 2, est présentée dans le tableau ci-après.

Tableau 5

CLONE 56

Observations à 60 jours du début de l'essai

VARIANTES Nbre et type de structures observées / Effectif observé / Effectif TOTAL		1	2	3	4
		N/T	N/T	N/T	N/T
NOMBRE DE NODULES		15/163	83/163	51/163	14/163
NOMBRE D'EMBRYOÏDES		193/207	14/207	—	—
Nbre de NODULES & EMBRYOÏDES		208/370	97/370	51/370	14/370
Nbre de FLACONS ayant répondu / à l'effectif TOTAL		9/9	4/4	3/8	3/4
Nbre MOYEN d'EMBRYOÏDES et NODULES par FLACON		23	24	6	3

Observations à 120 jours

VARIANTES Nbre et type de structures observées / Effectif observé / Effectif TOTAL		1	2	3	4
		N/T	N/T	N/T	N/T
NOMBRE D'EMBRYOÏDES PAR STADE DE DÉVELOPPEMENT	STADE 1	307/481	65/481	87/481	22/481
	STADE 2	137/250	53/250	48/250	12/250
	STADE 3	11/15	1/15	3/15	—
Nbre TOTAL d'EMBRYOÏDES		455/746	119/746	138/746	34/746
Nbre de flacons ayant répondu par rapport à l'effectif TOTAL		8/8	4/4	8/8	5/5
Nbre MOYEN d'EMBRYOÏDES par flacon		57	30	17	6,8
IMPORTANCE de l'ATTAQUE des EMBRYOÏDES		++++	++	+++	+

Tableau 6

CLONE 8

Observations à 60 jours

Nbre d Type de Structures observées	VARIANTES			
	1	2	3	4
	N/T	N/T	N/T	N/T
NOMBRE de NODULES	85/121	20/121	5/121	11/121
NOMBRE d' EMBRYOÏDES	20/25	4/25	—	1/25
Nbre de NODULES & d' EMBRYOÏDES	105/146	24/146	5/146	12/146
Nbre de FLACONS ayant répondu / à l'effectif TOTAL	8/8	5/5	5/7	3/4
Nbre MOYEN de nodules et Embryoïdes par FLACON	13	4,8	0,7	3

Observations à 120 jours

VARIANTES		1	2	3	4
Effectif observé / Effectif TOTAL.		N/T	N/T	N/T	N/T
NOMBRE D'EMBRYOÏDES PAR STADE DE DEVELOPPEMENT	STADE 1	41/56	5/56	4/56	6/56
	STADE 2	2/3	1/3	0	0
Nbre TOTAL d'EMBRYOÏDES		43/59	6/59	4/59	6/59
Nbre de FLACON ayant répondu / à l'effectif TOTAL		8/8	3/4	2/6	3/4
Nbre MOYEN d' Embryoïdes par FLACON		5,4	1,5	0,6	1,5
Importance de la taille des Embryoïdes		++	+	+	+

Stade de développement de l'embryon	Conditions de culture	Nbre d'embryonides moyen par flacon	Ecart type	ddl	Valeur de t_c	Degré de signification
Stade 1	1	38,1	6,8	10	4,951	HS
	2	16,2	2,6			
Stade 2	1	16,9	4,7	10	0,127	NS
	2	13,2	5			
Stade 3	1	1,2	1,2	10	4,8	HS
	2	0,25	0,5			
Embryonides totaux	1	53,4	7,4	10	4,44	Signifique $0,01 < \alpha < 0,05$
	2	29,7	6,8			

L'étude statistique, pour le test t, du nombre d'embryonides observés, par stade de développement, pour le clone 56, nous a montré que la différence entre la condition 1 et la condition 2 est hautement significative en ce qui concerne les stades 1 et 3.

Cette différence est significative lors de la comparaison des embryonides totaux des deux conditions.

■ ■ Comparaison du nombre d'embryonides moyen par flacon pour le clone 8 dans les traitements 1 et 2.

Stade de dev. de l'emb.	Conditions de cult.	Nbre moyen emb. / flacon	Ecart type	ddl	valeur de t_c	Degré de signification
Stade 1	1	5,12	1,9	10	0,123	NS
	2	1,25	0,96			
Stade 2	1	0,25	0,46	10		NS
	2	0,25	0,5			
Embryonides totaux	1	5,25	1,8	10	0,24	NS
	2	1,5	1,29			

L'étude des résultats du clone 8 montre aussi un nombre d'embryoïdes par flacon plus grand dans la condition 1 que dans les 3 autres, mais cette différence n'est pas significative.

Des 2 clones, la comparaison de la moyenne des embryoïdes par flacon pour les conditions 3 et 4 montre que le passage en milieu liquide "entretien" n'apporte rien de plus.

2.2.2 - Résultats concernant l'utilisation de milieux différents par leur composition en phytohormones.

A la suite des résultats précédents obtenus avec les clones 8 et 56 nous avons confronté de nouveaux matériels à cette technique en n'utilisant dans ce cas-ci que des milieux organogènes différents par leur composition en phytohormones.

Des 2 clones 8 et 11, le 8 a été pris comme témoin. Le clone 11, quant à lui présente de grandes difficultés à exprimer son organogénèse dans les conditions du "procédé". Les observations faites à 137 jours au début de l'essai (soit après 30 jours de milieu liquide et de 2 subcultures sur gélose) sur le nombre de flacons par variante ayant répondu pour les 2 clones, à l'induction organogénétique, sont regroupées dans les 2 tableaux ci-dessous.

CLONE 8		1	2	3	4	5	6	total des effectifs
MILIEU LIQUIDE	Nbre de flac. obs vis	0	0	1	1	0	4	6
	Effectif total.	5	5	5	5	5	5	30
MILIEU GÉLOSÉ	Nbre de flac. obs vis						1	1
	Effectif total.	5	5	5	5	5	5	30

CLONE 11		1	2	3	4	5	6	total des effectifs
MILIEU LIQUIDE	Nbre de flac. obs vis	0	1	0	0	0	1	2
	Effectif total.	5	5	5	5	5	5	30
MILIEU GÉLOSÉ	Nbre de flac. obs vis	0	0	0	0	0	0	0
	Effectif total.	5	5	5	5	5	5	30

L'analyse des résultats nous montre que la variante en phytohormones la plus efficace pour le clone 8 est la variante 6 (ANA 2 mg/l ; BAP 0,5 mg/l ; 2,4 -D 0,5 mg/l ; Adénine sulfate 30 mg/l).

Il est intéressant de voir dans cet essai que la variante comportant les concentrations en phytohormones présentes dans le "procédé" ne donne aucun résultats (variante 5 = ANA 2 mg/l ; BAP 2 mg/l).

Une comparaison des résultats obtenus en milieu liquide et en milieu gélosé pour le clone 8 quelque soit la variante en phytohormones montre que le milieu liquide a une action plus favorable sur l'organogénèse.

Cette différence est significative : (X^2 corrige de YATES = 4,2 , significatif au risque $0,02 < \alpha < 0,05$; ddl = 1).

2.3 - Conclusions

La différence des résultats entre le clone 8 et le 56 pour les conditions I et II peut prêter à plusieurs interprétations sachant que pour les 2 clones l'ensemencement initial a été analogue.

Le plus grand nombre d'embryoïdes observés sur le clone 56 est le fait :

- soit de sa plus forte capacité à exprimer son organogénèse
- soit de la forte croissance de ses CCR = en effet on peut supposer que plus on aura de masse de tissu et plus on aura des embryoïdes.

- soit de la plus grande rapidité à exprimer son organogénèse.
- les deux derniers facteurs pouvant jouer simultanément.

Cette corrélation éventuelle entre les capacités de multiplication et d'organogénèse sera étudiée dans le chapitre C.

Nous avons vu dans l'étude des 2 cas précédents, avec les clones 8 et 56 et, 8 et 11, que finalement, le passage en milieu liquide a favorisé de façon significative l'expression organogène, au moins pour 2 clones (8 et 56). Comme dans la majorité de nos études, ces essais ont mis en évidence l'importance d'hétérogénéité entre les CCR d'origines différentes.

L'hypothèse d'inhibiteurs de l'organogénèse, présents dans les CCR et éliminés de ces tissus par le passage en milieu liquide, ne s'est pas vraiment vérifiée dans nos essais. En effet, sur les 6 CCR issues de 5 individus différents, 2 seulement, ont été sensibles à ce passage.

3 - Etude de l'action d'un milieu conditionné sur la vitesse et la fréquence d'apparition des embryoïdes.

L'étude des travaux de STUART et STREET (1969 et 1972) et de GATHERCOLE et al (1976) (II) et un certain nombre d'observations que nous avons pu faire sur notre matériel végétal, nous ont conduit à réaliser une expérience utilisant le principe de conditionnement des milieux de culture.

Nous avons fait l'hypothèse que les tissus embryogènes émettaient dans le milieu des substances activatrices pour la formation des embryoïdes. Nous avons en effet souvent fait l'observation suivante :

la formation d'un embryoïde entraîne au sein du tissu l'apparition consécutive de nombreux embryoïdes et ceci en des points de la culture distants.

3.1 -Matériel et Méthodes

L'expérience a été réalisée de la manière suivante : une culture à croissance rapide présentant habituellement des capacités organogènes importantes issue (TC 56) a été mise en culture en milieu liquide. Au bout d'une vingtaine de jours, de petits nodules jaunes sont apparus (très jeunes embryoïdes). Le milieu de culture a été alors récupéré en le filtrant sur filtre de diamètre de pores 0,22 μ .

Le filtrat a ensuite été distribué dans des milieux liquides et gélosés. Les proportions sont de 1 volume de milieu conditionné (dans lequel la CCR organogène a été placée pendant 20 jours) et de 3 volumes de milieu neuf. Un témoin constitué uniquement de milieu neuf a été réalisé.

2 cultures à croissance rapide ont été utilisées : clone 3 et 17.

Effectif de l'essai

Tc	Dilution	Liquide	Gélosé
3	100%	3	12
	75%	3	12
17	100%	3	2
	75%	3	2

- Les cultures en milieu liquide ont été faites dans des bouteilles de 500 ml contenant 100 ml de milieu.

- Les cultures en milieu gélosé ont été réalisées dans des flacons de 100 ml contenant 20 ml de milieu.

3.2 - Résultats

Les observations faites pendant les 60 premiers jours, n'ont pas permis de noter de différences entre les milieux conditionnés et non conditionnés qu'ils soient liquides ou gélosés.

Des deux cycles suivants, après retour sur milieu gélosé, aucun n'a permis d'observer de manifestation de l'embryogenèse.

Cependant le phénomène d'embryogenèse n'a pas été totalement impossible en milieu liquide pour le clone 17 : nous avons observé la formation d'embryoïdes au stade 1 dans un flacon maintenu en agitation depuis 3 mois sans repiquage. Le milieu était "organogène" non conditionné. Le peu de résultats nous empêche d'apporter toute conclusion.

4 - Etude de l'influence des dilutions d'une suspension d'agrégats cellulaires sur les potentialités organogènes d'une CCR

4.1 - Matériel et Techniques

Devant le peu de réponses des clones 3 et 17 dans l'essai précédent nous avons modifié la technique. Pour cela nous nous sommes inspirés des travaux de VASIL & VASIL., 1981 (II.1) sur Pennisetum americanum.

Ces travaux montrent qu'il existe une certaine relation entre la dilution de la suspension cellulaire dans le milieu (ml de suspension : ml de milieu neuf) et la croissance, la couleur, la texture de la suspension cellulaire et enfin le développement d'embryoïdes organisés.

Il est encore précisé dans cet article que les faibles dilutions 1 : 1 et 1 : 2 favorisaient le développement d'embryoïdes déjà apparus.

Les fortes dilutions 1 : 3 et 1 : 4, quant à elles, favorisent la formation de cellules embryogènes.

Nous avons ainsi mis en pratique ces renseignements, en utilisant une CCR du clone 31 maintenue en milieu liquide durant 2 subcultures.

Les dilutions utilisées ont été une faible dilution = (1 : 1) et une forte dilution (1 : 4).

Les flacons de culture utilisés étaient des erlens de 100 ml contenant 30 ml de culture.

Pour chaque dilution, 10 répétitions ont été réalisées. Les 10 répétitions ont été effectuées avec des aliquots comportant une même quantité de masse de cellules et agrégats.

La moyenne des ensemencements pour les deux dilutions est:

- 1 : 1 20,5 mg / ml

- 1 : 4 21 mg / ml

Les cultures ont été maintenues en milieu liquide pendant 56 jours sans repiquage.

4.2 - Résultats

Les résultats correspondent à des observations faites à 56 jours du début de l'essai.

Comparaison de la moyenne du nombre de nodules apparus

Dilutions	Nombre de répétitions	m	s	ddl	t	Degré de signification
1 : 1	10	4	1,3	18	8,68	HS*
1 : 4	10	6,9	4,5			

* significatif au niveau 1%

Le test t montre qu'il existe une différence hautement significative entre une faible dilution 1 : 1 et une forte dilution 1 : 4 sur l'expression des capacités organogènes.

Dans notre essai les fortes dilutions 1 : 4 ont une action plus favorable sur la formation de cellules embryogènes au stade nodule.

Les nodules sont plus nombreux et plus gros que ceux obtenus avec la dilution 1 : 1.

Le résultat est assez similaire à ceux obtenus par VASIL & VASIL.

L'état d'avancement de nos résultats ne nous a pas permis de mettre en évidence l'action favorable de la faible dilution sur le développement ultérieur des nodules obtenu soit dans le cas 1 : 1 soit dans le cas 1 : 4.

Etant donné les quelques données positives portant sur un seul clone il serait bon de poursuivre une telle manipulation avec un matériel d'origines différentes.

C - Analyse simultanée de l'embryogenèse et de la croissance pour des tissus provenant de 5 arbres différents.

1 - Matériel et Méthodes

5 CCR différentes ont été utilisées : Tc 31, 32, 34, 62, 71.

Chaque clone utilisé dans cet essai a été ensemencé en milieu liquide (avec 10 mg de tissu par ml de solution)

Un lot témoin sur gélose est réalisé et 20 répétitions sont effectuées dans chaque cas. La combinaison des phytohormones utilisée est ANA 2 mg/l, BAP 2 mg/l dans le but d'obtenir une embryogenèse.

Dans chaque clone, 10 répétitions sont remises sur milieu gélosé après une durée de 30 jours en milieu liquide (une première pesée stérile P1 est alors effectuée) (traitement 1).

Les 10 dernières répétitions sont remises sur milieu gélosé après une durée de 60 jours (la première pesée (P1) de ce lot correspond à la 2^{de} pesée du 1^{er} lot) (traitement 2).

D'autres pesées stériles ont été effectuées à 90 et 120 jours permettant de mesurer la croissance de ces clones.

La réalisation de cet essai nous a permis d'exprimer les résultats en nombre d'embryoïdes produits, par unité de masse en fonction de la durée du cycle et par clone.

2 - Résultats

2.1 - Embryogenèse des 5 clones étudiés

L'embryogenèse s'est manifestée avec une vitesse variable selon les clones :

■ Vitesse d'apparition de l'embryogenèse pour les 5 clones

Croisements	N° du clone	Nbre de jrs de culture
DP x Dabou	71	50
E. Melanococca x E. Guineensis	31	63
E. " " "	34	63
L2T x DSD	62	93
E. Melanococca x E. Guineensis	32	Absence d'embryogenèse

Les résultats d'une étude à 120 jours du nombre d'embryoïdes totaux observés par clone pour les 2 traitements, en milieu liquide et sur milieu gélosé sont regroupés dans le tableau ci-dessous

Milieu	Milieu liquide		Milieu gélosé	
N° Clone \ Traitement	1	2	1	2
34	36	0	95	177
31	3	0	3	6
71	11	42	2	0
62	9	0	0	6
32	0	0	0	0

Ces différents résultats montrent qu'il existe une forte hétérogénéité de réponse du matériel végétal à l'embryogenèse.

Celle-ci se manifeste au sein d'un même clone pour un effectif ayant subi la même histoire, mais aussi entre clone appartenant à un même croisement interspécifique = les arbres des clones 31, 32 et 34 sont tous trois des hybrides melanococca ayant eu pratiquement la même histoire depuis leur mise en culture et cependant le clone 34 est fortement embryogène, le 31 un peu, le 32 pas du tout.

Le tableau (7) exprimant le nombre d'embryoïdes par masse de tissu à t0, 30, 60, 100 et 120 jours pour les 4 clones remet en évidence ce phénomène d'hétérogénéité du matériel végétal.

Tableau n° 7

Nombre d'embryoïdes par masse de tissu à to, 30, 60, 100 et 120 jours pour les 4 clones ayant présenté le phénomène d'embryogenèse

N° du CLONE	Durée en passage en milieu liquide	Nombre de jours de culture, au moment de l'observation	Nb Embryoïdes M0 total		Nb E M1 total		Nb E M2 total		Nb E M3 total		Nb E M4 total	
			L	G	L	G	L	G	L	G	L	G
34	30J	100J	10	29	10	15	1	4	0,8	2	0,6	1,4
		120J	20	47	20	24	15	19	14	3,2	1,1	2,3
	60J	100J	0	29	0	4,5	0	2	0	4,5	-	-
		120J	0	26,8	0	13,4	0	5,8	0	4,3	-	-
71	30J	100J	2,4	1	0,2	0,05	0,01	0,03	0,05	0,02	0,05	0,02
		120J	5,4	1	0,5	0,05	0,2	0,03	0,1	0,02	0,1	0,02
	60J	100J	18	0	1,8	0	1	0	0,7	0	-	-
		120J	20,6	0	2,1	0	1,1	0	0,8	0	-	-
31	30J	100J	1	1,5	1	0,4	0,2	0,1	0,07	0,07	0,05	0,07
		120J	1,5	1,5	1,5	0,4	0,3	0,1	0,1	0,07	0,08	0,07
	60J	100J	0	1	0	0,1	0	0,06	0	0,05	-	-
		120J	0	2,9	0	0,3	0	0,2	0	0,1	-	-
62	30J	100J	2	0	0,7	0	0,1	0	0,07	0	-	0
		120J	4,4	0	1,7	0	0,3	0	0,2	0	-	0
	60J	100J	0	2,5	0	0,1	0	0,1	0	-	-	-
		120J	0	3	0	0,2	0	0,1	0	-	-	-

Légende = L = passage en milieu liquide
G = Témoin resté sur gélose

Cependant nous pouvons observer que le passage en milieu liquide peut être favorable pour certains clones (71 et 62), défavorable pour d'autres (34 et 31). Toutefois la durée de ce passage en milieu liquide, la durée du cycle en général peut inhiber fortement l'embryogenèse. En effet, le cycle de 60 jours (traitement 2) inhibe l'embryogenèse des clones 34, 31 et 62 en milieu liquide et du clone 71 sur gélose.

2.2 - Etude comparative liquide-gélose de la croissance en condition organogène pour 5 clones 31, 32, 34, 71 et 62.

Traitement 1 = Passage en milieu liquide de 30 jours.

Traitement 2 = Passage en milieu liquide de 60 jours.

2.2.1 - Influence de la durée du passage sur la croissance.

Pour une meilleure compréhension des résultats, sur les tableaux (8 à 12), notons que les valeurs de P2, P3 et P4 pour le traitement 1 correspondent, dans le temps, respectivement aux valeurs P1, P2 et P3 du traitement 2.

La comparaison des résultats obtenus sur gélose entre les deux traitements, montrent que les rapports des résultats du traitement 1 pour les 5 clones passent de 0,97 à 2,5.

traitement 2

Pour les résultats obtenus en milieu liquide, les rapports vont de 1,5 à 3.

N° des clones	Milieu gélosé	Milieu liquide
31	1 à 1,2	1,9 à 2,3
32	1,5	1,9 à 3
34	0,97	1,5 à 2
71	2 à 2,5	2 à 2,4
62	1,5	2,4

La croissance des clones 34, 31 sur gélose pour les 2 traitements est identique. Pour les clones 32 et 62 légèrement supérieur pour le traitement 1.

2.2.2 - Comparaison du passage en milieu liquide par rapport au témoin gélosé pour les traitements

Comparaison des taux de croissance par rapport au poids initial

<u>Gélosé</u> <u>Liquide</u>	Traitement 1	Traitement 2
N° CLONE		
31	0,7 à 2,5	1,2 à 2,8
32	1,3 à 1,7	1,5 à 2,7
34	1,1	1,9 à 3
71	0,9 à 2	1 à 1,8
62	1,1 à 2,5	1,8 à 2,8

* Les valeurs indiquées correspondent au rapport des taux de croissance en fonction du poids initial du milieu gélosé/milieu liquide.

Nous observons que le traitement 2 provoque des différences beaucoup plus marquées entre le milieu liquide et le milieu gélosé.

La différence s'atténue au cours du temps.

Ce phénomène d'atténuation de la différence entre milieu liquide et milieu gélosé s'observe sur les taux de croissance partiels entre P2 et P1, P3 et P2 et P4 et P3 (cf tableaux 8 à 12)

La croissance se ralentit de façon identique à 120 jours pour le milieu liquide comme pour le milieu gélosé.

Ce qui correspond vraisemblablement à un épuisement du milieu de culture ou à un ralentissement de la vitalité de la culture

2.3 - Conclusions

L'idée de la croissance de l'organogenèse des 5 clones n'a pu aboutir à la mise en évidence de corrélation entre ces 2 paramètres. L'hétérogénéité constatée à la fois sur la croissance et à la fois sur l'organogenèse et le trop petit nombre de répétitions par traitement et par clone peut être une des causes.

Cependant le passage en milieu liquide n'a pas empêché l'apparition d'embryoïdes sur 4 clones des 5 clones utilisés dans cet essai.

Clone 31 - Tableau 8

		P_0	P_1	P_2	P_3	P_4	$\frac{P_1 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_3 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_4 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_1}{P_1}$	$\frac{P_3 - P_2}{P_2}$	$\frac{P_4 - P_3}{P_3}$	Temps de DOUÈLEMENT en Jours			
		PASSAGE de 30 JOURS											30, 60, 100, 120,				
CULTURE INDIVIDUELLE	m	0,207	0,167	0,167	2,107	3,615	0	1	13	17	5	2,4	0,41	>	31	27	29
	s	0,003	0,02	0,165	0,516	0,29	0	2,3	2,7	1,4	2	1	0,2	0	11,3	21	
	i	0,002	0,015	0,133	0,14	0,2	0	1,6	1,1	1,1	1,4	0,7	0,15	0			
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	7	10	10	10	9	10	10	9	10	10	10	9
CULTURE MIXTE	m	0,202	0,118	2,313	4,215	4,397	3	10	20	21	2	0,9	0,07	15	17	24	27
	s	0,002	0,116	0,15	0,28	0,14	0,6	2,6	1,3	1,7	0,4	0,3	0,08	1,6	1,8	0,7	
	i	0,002	0,108	0,14	0,2	0,14	0,4	1,8	0,9	1,8	0,3	0,2	0,08				
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	6	10	10	10	6	10	10	6	10	10	10	6
		PASSAGE de 60 JOURS															
CULTURE INDIVIDUELLE	m	0,206	0,187	1,498	1,588	—	3	6	6,7	—	1	0,1	—	—	29	39	41
	s	0,004	0,37	1,67	0,7	—	1,7	3,28	3,6	—	0,4	0,2	—	—	7	1,5	
	i	0,003	0,26	0,5	0,5	—	1,2	2,3	2,6	—	0,3	0,1	—	—			
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	—	10	10	10	—	10	10	—	—	10	10	10
CULTURE MIXTE	m	0,204	1,720	3,409	4,066	—	7	16	19	—	1	0,2	—	—	20	26	28
	s	0,003	0,237	0,46	0,5	—	1,1	2,3	2,3	—	0,2	0,08	—	—	1,2	1,5	
	i	0,002	0,17	0,3	0,4	—	0,8	1,3	1,8	—	0,14	0,06	—	—			
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	9	—	10	10	9	—	10	9	—	—	10	10	9

Clone 32 - Tableau 9

		P_0	P_1	P_2	P_3	P_4	$\frac{P_1 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_3 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_4 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_1}{P_1}$	$\frac{P_3 - P_2}{P_2}$	$\frac{P_4 - P_3}{P_3}$	Temps de DOUPEMENT en Jours			
														30,	60,	100,	120,
PASSAGE de 30 JOURS																	
CYCLES DE DOUPEMENT	m	0,205	0,972	3,19	4,669	—	1	14	22	—	2,7	0,5	—	14	15	24	—
	s	0,004	0,338	0,56	0,47	—	1,7	2,7	2,3	—	1,5	0,2	—	31	0,8	0,9	—
	i	0,003	0,24	0,24	0,31	—	1,2	1,7	1,6	—	1,1	0,1	—				—
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	—	10	10	10	—	10	10	—	10	10	10	—
PASSAGE de 60 JOURS																	
CYCLES DE DOUPEMENT	m	0,206	1,673	4,606	6,198	—	7	21	29	—	1,8	0,3	—	10	13	22	—
	s	0,005	0,228	0,435	0,64	—	0,44	2,2	3,2	—	0,4	0,08	—	0,6	0,5	0,7	—
	i	0,004	0,16	0,31	0,5	—	0,7	1,5	2,3	—	0,3	0,06	—				—
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	—	10	10	10	—	10	10	—	10	10	10	—
PASSAGE de 60 JOURS																	
CYCLES DE DOUPEMENT	m	0,201	1,663	1,69	—	—	7	7	—	—	0,1	—	—	—	20	35	—
	s	0,006	0,353	0,31	—	—	1,6	1,2	—	—	0,1	—	—	—	2,4	2,8	—
	i	0,004	0,25	0,2	—	—	1,1	0,9	—	—	0,07	—	—	—			—
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	—	—	10	10	—	—	10	—	—	—	10	10	—
PASSAGE de 60 JOURS																	
CYCLES DE DOUPEMENT	m	0,202	2,586	4,157	—	—	12	19	—	—	0,6	—	—	—	16	25	—
	s	0,004	0,43	0,51	—	—	1,8	2,5	—	—	0,2	—	—	—	0,9	1,3	—
	i	0,003	0,31	0,4	—	—	1,3	1,8	—	—	0,1	—	—	—			—
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	—	—	10	10	—	—	10	—	—	—	10	10	—

Clone 34 - Tableau 10

		P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	$\frac{P_1 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_3 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_4 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_1}{P_1}$	$\frac{P_3 - P_2}{P_2}$	$\frac{P_4 - P_3}{P_3}$	Temps de DOUPEMENT en Jours						
		PASSAGE de 30 JOURS															30,	60,	100,	120,
CYCLES-DOUPE	m	0,202	0,2043	1,0947	2,540	3,241	0,01	4	11	15	4	1,9	0,4	>	26	27				
	s	0,0039	0,044	0,95	1,3	1,2	0,229	4,7	6,4	6,1	3,3	1,2	0,3		10	5				
	i	0,0028	0,03	0,68	0,9	0,9	0,16	4,3	4,6	4,4	2,4	0,9	0,2							
	RéPÉTITIONS	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10		7	8				
		PASSAGE de 60 JOURS																		
CYCLES-DOUPE	m	0,202	0,4031	1,336	2,734	4,058	1	6	15	19	2	1,6	0,4	42	28	26				
	s	0,0026	0,112	0,673	0,687	0,9	0,15	3,3	3,3	4,2	0,9	0,97	0,18	30	14	3				
	i	0,0019	0,08	0,48	0,15	0,6	0,14	2,4	2,4	3	0,6	0,7	0,1							
	RéPÉTITIONS	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10				
CYCLES-DOUPE	m	0,203	0,448	1,653	2,107	-	2	8	10,6	-	4	0,3	-	-	37	35	-	-		
	s	0,006	0,354	0,88	1	-	1,7	3,7	3,8	-	3,3	0,4	-	-	16	13	-	-		
	i	0,005	0,13	0,6	0,7	-	1,3	2,8	2,9	-	2,5	0,3	-	-			-	-		
	RéPÉTITIONS	9	9	9	9	-	9	9	9	-	9	9	-	-	4	8	-	-		
CYCLES-DOUPE	m	0,204	1,32	3,035	4,117	-	6	14	14,2	-	1,4	0,5	-	-	23	26	-	-		
	s	0,007	0,74	0,37	1,2	-	2,9	1,7	6,1	-	0,6	0,2	-	-	4,3	1,3	-	-		
	i	0,006	0,153	0,28	0,9	-	2,1	1,3	4,7	-	0,5	0	-	-			-	-		
	RéPÉTITIONS	9	9	9	9	-	9	9	9	-	9	9	-	-	9	9	-	-		

Clone 62 - Tableau 11

		P_0	P_1	P_2	P_3	P_4	$\frac{P_1 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_3 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_4 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_1}{P_1}$	$\frac{P_3 - P_2}{P_2}$	$\frac{P_4 - P_3}{P_3}$	Temps de DOUBLEMENT en Jours			
														30,	60,	100,	120,
PASSAGE de 30 JOURS																	
CYCLES DE RÉPÉTITIONS	m	0,203	0,537	3,39	5,762	—	2	16	27	—	6,4	0,7	—	27	15	22	—
	s	0,005	0,28	1,1	0,5	—	1,1	5,404	8,6	—	4	0,9	—	10	2,8	9,6	—
	i	0,004	0,2	0,79	0,4	—	1	3,7	1,9	—	2,9	0,6	—	—	—	—	—
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	—	10	10	10	—	10	10	—	10	10	10	—
PASSAGE de 60 JOURS																	
CYCLES DE RÉPÉTITIONS	m	0,202	1,187	5,139	6,428	—	5	24	31	—	3,9	0,2	—	13	13	21	—
	s	0,004	0,512	0,5	1	—	2,5	2,4	5,4	—	1,5	0,2	—	3,2	0,4	1	—
	i	0,003	0,37	0,4	0,7	—	1,8	1,7	3,9	—	1,1	0,1	—	—	—	—	—
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	—	10	10	10	—	10	10	—	10	10	10	—
PASSAGE de 60 JOURS																	
CYCLES DE RÉPÉTITIONS	m	0,202	1,36	2,321	—	—	6	11	—	—	1,2	—	—	4	21	32	—
	s	0,003	0,8	1,3	—	—	4	6,6	—	—	1,4	—	—	—	4,6	8	—
	i	0,002	0,6	1	—	—	2,5	5	—	—	1	—	—	—	—	—	—
	RÉPÉTITIONS	10	9	9	—	—	9	9	—	—	10	—	—	—	10	9	—
PASSAGE de 60 JOURS																	
CYCLES DE RÉPÉTITIONS	m	0,203	3,602	4,251	—	—	17	20	—	—	0,2	—	—	—	14	25	—
	s	0,006	0,261	0,6	—	—	1,5	2,7	—	—	0,1	—	—	—	0,5	1,2	—
	i	0,004	0,2	0,4	—	—	1,1	2,1	—	—	0,07	—	—	—	—	—	—
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	—	—	10	10	—	—	10	—	—	—	10	10	—

Clone 71 - Tableau 12

		P_0	P_1	P_2	P_3	P_4	$\frac{P_1 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_3 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_4 - P_0}{P_0}$	$\frac{P_2 - P_1}{P_1}$	$\frac{P_3 - P_2}{P_2}$	$\frac{P_4 - P_3}{P_3}$	Temps de Doucement en jours			
		PASSAGE de 30 JOURS												30,	60,	100,	120,
MOYENNE	m	0,205	2,202	5,216	7,239	10,48	10	241	44	50	1,5	0,8	0,21	9	13	19	24
	s	0,008	0,115	0,658	1,375	2,2	3,55	3,6	13	11	0,7	0,4	0,5	1,05	0,66	1	1
	l	0,004	0,151	0,47	1	1,8	2,54	2,57	5,2	9	0,5	0,28	0,4				
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	8	10	10	10	8	10	10	8	10	10	10	8
		PASSAGE de 60 JOURS															
MOYENNE	m	0,202	4,257	6,324	8,516	10,496	20	30	41	52	0,5	0,3	0,2	7	12	20	21
	s	0,004	0,219	0,406	1,37	2,2	1,12	2	8,7	11	0,1	0,3	0,1	0	0,3	1,2	
	l	0,003	0,161	0,29	1	1,6	0,8	1,43	6,2	7,9	0,07	0,2	0,07				
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
		PASSAGE de 60 JOURS															
MOYENNE	m	0,204	2,003	3,826	5,193	-	9	18	24	-	0,9	0,3	-	-	18	26	26
	s	0,003	0,125	1,57	2,2	-	1,08	7,9	11	-	0,7	0,1	-	-	2,06	3,3	
	l	0,002	0,31	1,1	1,8	-	1,19	5,6	7,2	-	0,5	0,08	-	-			
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	8	-	10	10	8	-	10	8	-	-	10	10	8
		PASSAGE de 60 JOURS															
MOYENNE	m	0,201	3,48	3,906	4,583	-	16	18	22	-	0,1	0,2	-	-	14	25	27
	s	0,0023	0,236	0,31	0,7	-	1,37	1,4	3,5	-	0,08	0,1	-	-	0,5	0,7	
	l	0,0016	0,17	0,2	0,5	-	0,22	1	2,5	-	0,06	0,07	-	-			
	RÉPÉTITIONS	10	10	10	10	-	10	10	10	-	10	10	-	-	10	10	10

Conclusions & Discussion

La présente étude nous a permis d'apporter un ensemble de résultats, sur le comportement des tissus de palmier à huile en milieu liquide et sur l'intérêt de celui-ci par rapport au milieu gélosé.

Ces résultats intéressent deux phénomènes physiologiques différents, la croissance et l'embryogenèse, dont nous présentons ci-dessus les conclusions.

I - Croissance

1) Les courbes de croissance des cultures à croissance rapide en milieu liquide comme en milieu gélosé sont de type sigmoïde.

2) L'étude des courbes de croissance en milieu liquide et en milieu solide, montre qu'il semble que ce dernier soit plus favorable à l'augmentation en masse bien que nous n'ayons pu mettre en évidence de différences significatives dans nos conditions d'expérience.

3) La nécessité d'une adaptation des tissus en milieu liquide, avant que ceux-ci ne parviennent à leur développement optimum, a été mise en évidence. Cette adaptation est rendue possible par un ou plusieurs passages(ou subcultures) en milieu liquide, permettant à la fois de raccourcir le temps de latence d'augmenter la vitesse de croissance et d'aboutir à une masse plus importante de tissus.

4) Un passage de plusieurs cycles en milieu liquide permet, après retour sur gélose, d'obtenir de très bons taux de croissance = ceci nous a permis dans nos essais de multiplier par un facteur 4 la masse de CCR produite, comparativement au "procédé" sur gélose.

II - Embryogenèse

Les tissus de Palmier à Huile à l'état de cal primaire et à l'état de CCR ont montré leur capacité à exprimer une embryogenèse directement en milieu liquide adapté. Cependant ce phénomène s'est avéré peu fréquent dans nos divers essais.

L'embryogenèse a été beaucoup plus sensible au passage en milieu liquide ; 4 clones sur 8 ont répondu de façon significative à l'induction par passage en milieu liquide.

Ce type de traitement, bien que présentant une forte hétérogénéité de réponse interclonale, a permis d'augmenter la néoformation d'embryoïdes et d'en raccourcir la phase d'obtention.

La recherche de corrélation entre la croissance des clones et l'embryogenèse n'a pu aboutir, du fait de la trop grande hétérogénéité du matériel.

Il a pu être mis en évidence, dans le cas de tissu de Palmier à Huile, de l'influence des dilutions d'une suspension d'agrégats cellulaires sur l'embryogenèse.

Ce fait avait déjà été observé par VASIL et VASIL., (1981) sur Pennisetum americanum

Les conditions d' éclairement des cultures dans lesquelles nous avons été contraints d'opérer [$0,8 \text{ W/m}^2$ (160 lux) à $2,1 \text{ W/m}^2$ (420 lux)] nous ont permis de reconfirmer la précarité de l'emploi d'un éclairement trop fort pour l'expression de l'embryogenèse.

Des essais préalables, réalisés par des membres de laboratoire avaient montré qu'une intensité de $2,4 \text{ W/m}^2$ suffisait pour l'expression de l'embryogenèse.

Notre étude montre donc qu'il est possible de faire croître des tissus de Palmier à Huile en milieu liquide.

Un passage de un ou plusieurs cycles dans ce même milieu permet une croissance des tissus sur gélose accrue par rapport à celle obtenue dans les conditions du "procédé". Ces passages pourraient ainsi permettre, si besoin est, d'accélérer l'obtention d'une masse définie de CCR.

Ces mêmes passages, ayant une action stimulatrice de l'embryogenèse de certains clones, pourraient être ainsi utilisés pour l'accélération de production d'embryoïdes pour des CCR définies.

L'action favorable du passage en milieu liquide sur la croissance et sur l'embryogenèse de certains clones peut nous suggérer qu'il y a eu par ce traitement, un effet de "réjuvénation" des tissus. Dans l'état actuel de nos travaux nous ne pouvons répondre à une telle hypothèse.

On peut donc penser que si l'on souhaite généraliser l'utilisation du milieu liquide, il faudra, auparavant, chercher à faire intervenir des facteurs nouveaux tel que : des milieux variant par leur composition et leur concentration : en macroéléments (tel que le rapport $\frac{\text{NH}_4}{\text{NO}_3}$) et en sucre. Ces travaux pourraient ainsi être

comparés aux résultats déjà obtenus sur ces facteurs par des membres du laboratoire, et apporter des données sur les besoins spécifiques de chaque clone.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Nous avons, dans l'étude bibliographique, distingué les travaux réalisés à partir de Dicotylédones, des travaux réalisés à partir de Monocotylédones pour deux raisons principales :

1) Tout d'abord, l'essentiel des premiers travaux portant sur les techniques de culture de tissu en milieu liquide ont été effectués à partir de Dicotylédones. Celles-ci ont présenté dès le début une grande aptitude à supporter les conditions d'une culture de tissu in vitro.

2) Le Palmier à Huile appartenant à la classe des Monocotylédones, il nous a fallu présenter à la fois les travaux réalisés en milieu liquide sur cette dernière classe et les travaux réalisés sur gélose à partir de plantes appartenant aux Palmées, ces dernières n'ayant jamais été confrontées au milieu liquide.

Une troisième partie de l'index regroupe les travaux concernant la variabilité du matériel végétal en culture de tissu, cette notion ayant une importance évidente.

Bibliographie sur la Culture de tissu en milieu liquide

I - Travaux réalisés à partir d'un matériel végétal appartenant à la classe des Dicotylédones.

1 - Obtention de suspensions cellulaires.

DOUGALL D.K., 1964 - A method of plant tissue culture giving high growth rates.
Exp. Cell. Research. 33, 438-44

ERIKSSON Tage., 1965 - Studies on the growth requirements and growth measurement of cells cultures of Haplopappus gracilis
Physiologia Plantarum vol 18, 976-993

GATHERCOLE & al., 1976 - Carbon dioxide as an essential requirement for cultured sycamore cells.
Physiol. Plantarum. vol 37, 3, 213-217

GAMBORG & al., 1968 - Nutrient requirements of suspension culture of soy bean root cells.
Exp. Cell. Res. 50, 151-158

GAMBORG O.L., 1970 - The effects of aminoacids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture.
Plant. Physiol. 45, 372-375

GOULD & STREET., 1975 - Kinetic aspects of synchrony in suspension cultures of Acer pseudoplatanus L.
J. Cell. Sci. 17, 337-348

GRIENENBERGER J.M., 1978 - Etude du métabolisme des acides ribonucléiques des cellules végétales. Application au problème du "crown-gall".
Thèse Paris Sud ORSAY

HENSHAW & al., 1966 - Studies on the growth in culture of plant cells.
I - Growth patterns in batch propagated suspension culture.
J. exp. Bot. 17, 362-377

HORSCH & al., 1980 - Measurement of cultivated plant cell growth on filter paperdisc.
Can. J. Bot - 58, 2402- 2406

HORSH R.B. & JONES G.E., 1980 - A double filter technique for plating cultured plant cells.
In vitro. 16, 103-108

- KING P.J. & STREET H.E., 1973 - Growth pattern in cell cultures.
in : Street, H.E. (Ed) : Plant tissue and cell culture.
pp 209-337
- KUBEK D.J. & SHULAR M.L., (1978) A rapid quantitative method to
to measure growth of plant cell suspension cultures.
Can. J. Bot 56 : 2340-2343
- LAMPORT D.T.A., 1964 - Cell suspension cultures of higher plants :
isolation and growth energetics.
Exp. cell Res. 33, 195-206
- LIORET C., 1974 L'analyse des courbes de croissance
Physiol. Vég. 12 (3), 413 -434
- MANASSE R.J., 1972 - A new culture flask for plant tissue suspension
cultures.
Experientia 28 : 723-724
- MILLER R.A & al., 1968 - Phytostat for continuous culture and automa-
tic sampling an plant cell suspensions.
Science, 159 ; 540-542
- MUIR W.H. & al., 1958 - The preparation, isolation and growth in cul-
ture of single cells from higher plants.
Amer. Jour. Bot. 45, 589-597
- NICKELL L.G. & TULECKE W. 1960 - Submerged growth of cells of
higher plants.
J. biochem. microbiol. technol. Engrs.2, 287-297
Biotechnology & bioengenering (changement de titre
1962).
- RAJASEKHAR E.W. & al., 1971 - Studies on the growth in culture of
plants cells.
XI : The influence of shaking rate on the growth of
suspension cultures.
J. Exp. Botany, 22, 107-117
- RUYACK J. & al., 1979 - Growth of callus and suspension culture cells
from cotton varieties (Gossypium hirsutum L.) resis-
tant & suceptible to xanthomonas malvacearum.
In vitro, vol 15, n° 5, 368-373
- SREET & HENSHAW., 1963 - Cell division and differenciation suspension
cultures of Higher plant cells.
Symp. Soc. Exp. Biol. 17, 234 - 56.

- STUART. R & STREET H.E., 1969 - Studies on the growth in culture of plant cells.
IV : the initiation of division in suspensions of stationary phase cells of Acer pseudoplatanus L.
J. Exp. Bot. 20, 556-571
- STUART & STREET ., 1971 - Studies on the growth in culture of plant cells.
X : Further Studies on the conditioning of culture media by suspensions of Acer pseudoplatanus L. cells.
J. Exp. Bot. 22, 70, 96 - 106 .
- SUNG Z. R., 1976 - Turbidimetric measurement of plant cell culture growth.
Plant. Physiol. 57, 460 - 462.
- TORREY J.G. & REINERT. J ., 1961 - Suspension cultures of higher plant cells in synthetic media.
Plant physiol. 36, 483 - 491
- TORREY S.G. & al ., 1962 - Mitosis in suspension cultures of higher plant cells in synthetic medium.
Am. J. Botany 49, 420 - 425
- TULECKE & NICKELL., 1960 - Methods, problems and results of growing plant cell under submerged conditions.
Trans. N.Y Acad. Sci. 22, 196 - 206
- WILSON & al., 1971 - Studies on the growth in culture of plant cells.
XII : A versatile system for the large scale batch or continuous culture of plant cell suspensions.
J. Exp. Bot. 22, 177 - 207
- 2 - Embryogenèse somatique à partir de suspensions cellulaires
- BUTTON & al ., 1974 - Fine structure of an embryoid development from embryogenic ovular callus of " shamouti orange "
(citrus snensis osb.) J. exp. Bot. 25, 446 - 457
- BROWN & al., 1976 - The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures.
Physiol. Plant 37 (1), 73 - 79.
- DUDITS & al ., 1979 - Reversible inhibition of somatic Embryo differentiation by bromodeoxyuridine in cultured cells of Daucus carota .
Cell Differ. 8 (2) : 135 - 144
- FUSIMURA & KOMAMINE ., 1975 - Effects of various growth regulators on the Embryogenesis in a carrot cell suspension culture.
Plant Sci. Lett. (6), 359 - 364.

- FUJIMURA & KOMAMINE., 1979 - Synchronisation of somatic embryogenesis in a carrot. Daucus carota cell suspension culture.
Plant Physiol. (Bethesda) 64 (1) , 162 - 164
- FUJIMURA & KOMAMINE. , 1979 (received 1980) - Involvement in endogenous auxin insomatic. Embryogenesis in carrot Daucus carota cultivar Kurodagosum cell suspension culture.
Z pflanzen physiol. 95 (1), 13 - 20
- FUJIMURA & KOMAMINE. , 1980 - The serial observation of Embryogenesis in a carrot. Daucus carota cultivar Kurodagosum cell suspension culture.
New physiol. 86 (2), 213 - 218
- FUJIMURA & al., 1980 - Aspect of DNA - RNA & proteines synthesis during somatic embryogenesis in a carrot, Daucus carota cultivar Kurodagosum cell suspension culture.
Physiol. Plant 49 (2) , 255 - 260
- GROET & KIDD., 1980 - Embryogenesis in callus and suspension cultures of milkweed Asclepias - syriaca & A. tuberosa.
Plant Physiol. 65 (6), 36
- HALPERIN & JENSEN., 1967 - Ultrastructural changes during growth and Embryogenesis in carrot, Daucus carota, cell cultures.
J. Ultrastruct. Res. 18, 428 - 443
- HALPERIN & WETHERELL., 1964 - Adventive embryony in tissue cultures on the wild carrot, Daucus carota.
Am. J. Bot. 51, 274 - 83
- HALPERIN W., 1966 - Alternative morphogenetic events, in cell suspension
Am. J. Bot 53, 443 - 453
- HALPERIN W. 1967 - Population density effects on embryogenesis in carrot cell cultures.
Expl. cell. Res. 48, 170 - 3
- HALPERIN W., 1970 - Embryos from somatic plant cells.
in : Control mechanisms in the Expression of cellular Phenotypes.
ed. H.H. Padykula. Symp. Int. Soc. Cell. Biol. 9,
169 - 91 Acad. Press N. Y
- HALPERIN & WETHERELL., 1965 - Ontogeny of adventive embryos of wild carrot.
Sciences. 147 , 756 - 758

- HUBER & al., 1978 - A cell counting procedure applied to Embryogenesis in cell suspension cultures of anise, pimpinilla-anisum.
Plant Sci. lett. 12 (3/4) 209 - 216.
- KAMADA H. & KAMADA H., 1979 - Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures : Effect, of growth regulators on somatic Embryogenesis and root formation.
Z Pflanzen Physiol. 91 (3), 255 - 266.
- KONAR & NATARAJA., 1965 - Experimental studies in Ranunculus sceleratus L. plantlets from freely suspended cells and cells groups.
Phytomorphology 15, 206 - 211.
- KONAR & al., 1972a - The diversity of morphogenesis in suspension cultures of Atropa belladonna L.
Ann. Bot. 36, 249 - 59
- KONAR & al., 1972b - Origin and structure of Embryoïds arising from epidermal cells of the stem of Ranunculus sceleratus
J. cell. Sci. II ; 77 - 93
- KOHLLENBACH H.W., 1977 - Basic aspect of differentiation & plan Regeneration from cell & tissue cultures.
In : Plant tissue culture & its Bio-technological Application. Ed by W. BARTZ., E. REINHARD., M.H. ZENK, SPRINGER-VERLAG, BERLIN.
355 - 366
- Mc WILLIAM & al., 1974-75 - The origin and development of embryoïds in suspension cultures of carrot (Daucus carota).
Ann. Botany 38, 243 -250
- PHILIPS G.C., 1980 - Somatic embryogenesis from cell suspension culture of red clover.
Crop. Sci. USA, 1980, 20 (3), 323 -326
- PHILIPS & COLLINS., 1980 - Somatic embryogenesis from cell suspension cultures of red clover trifolium-pratense cultivar Arlington.
Crop. Sci. 20 (3) 323-327
- PRICE & ROBERTA., 1979 - Somatic Embryogenesis in suspension cultures Gossypium Klotzschianum
Planta (Berl.) 145 (3), 305-307
- REINERT J., 1973 - Aspects of organisation. Organogenesis and Embryogenesis.
in: Plant tissue & cell culture. Street H.E ed oxford..

- SANGWAN & HARADA., 1975 - Chemical regulation of callus growth, organogenesis plant regeneration, and somatic embryogenesis in Antirrhium magus tissue & cell cultures.
J. Exp. Botany 26, 868-881
- SHERIDAN., 1968 - Tissue culture of the monocotyledones Lilium
Planta Arch. Wis. Bot. 82, 189 -192
- SHERIDAN ., 1975 - Tissue culture of maize. I. Callus induction and growth.
Physiol. Plant., 33, 151-156
- SMITH & STREET., 1974 - The decline of Embryogenic Potential as callus and suspension cultures of carrot (Daucus carota L.) are serially subcultured.
Ann. Bot 38, 223 - 241
- STEWARD., 1958 - Growth and organized development of cultured cells.
Amer. J. Bot. 45, 709-713
- STEWARD and al., 1958 - II - Organisation in cultures from freely suspended cells.
Ann. J. Bot. 45, 705 -708
- STEWARD & al., 1964 - Growth & development of cultured plant cells
Science, N.Y., 143, 20-27
- TORREY & SHIGEMURA., 1957 - Growth & Controlled morphogenesis in pea root callus tissue grown in liquid media.
Amer. J. Bot. 44, 334-344
- THOMAS & STREET., 1970 - Organogenesis in cell suspension cultures Atropa belladonna L. and A. belladonna cultivar lutea Döll.
Ann. Bot. 34, 657-69
- THOMAS & STREET., 1972 - Factors influencing morphogenesis in excised roots and suspension cultures of Atropa belladonna L.
Ann. Bot. 36, 239-47
- VASIL & al., 1964 - Endives plantlets from freely suspended cells and cell groups in vitro.
Science, N.Y.; 146, 76-77
- VASIL & HILDEBRANDT., 1966 - Variations of morphogenetic behaviour in plant tissue cultures I. cichorium endivia.
Ann. J; Bot. 53, 860-869

VERMA D.C. & D.K.DOUGALL., 1978 - DNA-RNA and protein content of tissue during growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures.
In vitro, 14 (2), 183-191

VERMA D. & D.K.DOUGALL., 1979- Biosynthesis of myoinositol and its role of a precursor of cell wall polysaccharides in suspension culture of wild carrot cells Daucus carota.
Planta (Berl) 146 (1), 55-62

II - Travaux réalisés à partir d'un matériel végétal appartenant à la Classe des Monocotylédones.

1 - Travaux réalisés sur des plantes n'appartenant pas aux PALMACEES

ATKIN & BARTON., 1973 - The establishment of tissue cultures of Temperate grasses
J. Exp. Bot., 24, 689-699

CONSTABEL F. & al., 1971 - Histological studies on embryos produced from cell cultures of Bromus inermis.
Can. J. Bot., 49, 1415-17

CONSTABEL & al., 1971 - Embryogenesis & regeneration of plant, from suspension culture of Bromus inermis.
In vitro 6 (5), 399-400

Fischer J.B., 1977 - Callus, cell suspensions and organogenesis in tissue cultures of purple nutsedge (Cyperus rotundus)
Bot. GAZ, 138, 291-297

GAMBORG O.L. & al., 1970 - Embryogenesis & production of albino plant from cell cultures of Bromus inermis.
Planta Arch. wiss. Bot., 95, 355-358

GAMBORG & EVELEIGH., 1968 - Culture methods and detection of glucaneas in suspension cultures of wheat and Barley.
Can. J. Biochem. 46, 417-421

JULLIEN.N., 1975 - Contribution à l'étude des cultures in vitro de cellules séparées de tissu foliaire et leur potentialités organogènes chez quelques plantes supérieures, en particulier chez Asparagus officinalis. L.
Thèse Doct. Spécialité (physi.ves) PARIS VI

- KAUL & STABA ., 1968 - Dioscorea tissue culture
I - Biosynthesis and isolation of diosgenin from Dioscorea
deltoïda callus and suspension cells
LLoydia, 31, 171-179
- MAEDA. E. , 1969 - Multiplication of rice cells freely suspended in vitro.
Proc. Crop. Sci. Soc. Jap. , 38, 535-546
- NAKANO & MAEDA ., 1979 Shoot differentiation in callus of oryza sativa.
ZPlanzenphysiol. 93, 449 458
- SCHENK & HILDEBRANDT., 1972 - Medium & techniques for induction and
growth of Monocotyledones and dicotyledonous plant cell
cultures
Can. J. Bot., 50, 199-204
- SHERIDAN W. F. , 1975 - Tissue culture of Maize
I : Callus induction and growth
Physiol. plant; 33, 151-156
- SPRINGER & al. , 1979 - A histological examination of tissue
Culture initiation from immature Embryos of Maize
Protoplasma 101. 269-281
- STEWART & MAPES. , 1971 - Morphogenesis and plant propagation in
aseptic culture of Asparagus -
Bot. Gab, 132, 70-79
- VASIL & VASIL. , 1980 - Isolation and culture of cereal protoplast .
2 : Embryogenesis & plantlet formation from proto-
plast of Pennisetum americanum.
Ther. Appl. Genet., 56 (3) 97 -100
- VASIL & VASIL ., 1981 ., Somatic Embryogenesis and plant regeneration
from suspension cultures of pearl millet (pennisetum
americanum).
Ann. Bot., 47, 669 - 678
- WILMAR & HELLENDORRN. , 1968 - Growth and morphogenesis of
Asparagus cells cultures in vitro.
Nature, Lond. 217, 369 -370
- YAMAGUCHI & al ., 1970 - Growth of barley cells in shaking culture.
Jap. J. Breed., 20, 160-164

2 - Travaux réalisés sur les Palmacées

2.1 - Travaux réalisés sur le Palmier à Huile en
culture in vitro sur milieu solide

- AHEE J. & al., 1981 - La multiplication végétative in vitro du Palmier à Huile par embryogenèse somatique.
Oléagineux, 36, 3, 113-118
- CORLEY R. H. V. 1977 - First clonal oil Palms planted in the field.
Planter, 53, 616, 311-332
- CORLEY & al., 1977 - Vegetative propagation of oil palm via tissue culture.
in : International Development in Oil Palm Inc; soc, Planters. Kuala Lumpur. Malaysia.
in : Oil Palm News n° 22, 2 -7
- CORLEY & al., 1979 - Progress with vegetative propagation of oil palm.
Planter, 55, 641, 377-380
- JONES L. H. 1974 - Propagation of clonal Oil Palms tissue culture.
Oil Palm News, 17, 1-8.
Planters 1974, 50, n° 585, 374-381
- MARTIN & al., 1972 - Cultures aseptiques de racines de Palmier à Huile (Elaéis guineensis Jacq.)
C.R. Acad. Sci. Paris, 274, D, 2171-2174
- ONG HEAN TATT., 1977 - Studies into tissue culture of oil palm.
in : International Development in oil palm. Inc. Soc. Planters, Kuala Lumpur, Malaysia
- PANNETIER & al., 1981 - Néoformation de jeunes plants d'Elaéis guineensis à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés in vitro.
Oléagineux 36, n° 3, 119-122
- RABECHAULT & al., 1970 - Colonies cellulaires et formes embryoides obtenues in vitro à partir de cultures d'embryons de Palmier à Huile(Elaéis guineensis Jacq. var. Dura Becc.)
C.R. Acad. Sci. Paris - 270, D, 3067-3070
- RABECHAULT & al., 1972 - Recherches sur la culture des tissus de Palmier à Huile (Elaéis guineensis Jacq.)
Oléagineux, 27, 11, 531-534
- RABECHAULT H. & MARTIN J. P., 1976 - Multiplication végétative du Palmier à Huile (Elaéis guineensis Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires.
C.R. Acad. Sci. Paris, 283, D, 1735-1737

- SMITH W.K. & THOMAS S.A. 1973 - The isolation and in vitro cultivation of cells of Elaëis guineensis
Oléagineux 28, 3, 123-127
- STARITSKY G., 1970- Tissue culture of Oil Palm (Elaëis guineensis Jacq) as a tool for vegetative propagation.
Euphytica 19, 288-292
- VALLADE Jean., 1965 - Recherches morphologique et cytologique sur l'embryon d'Elaëis guineensis Jacq. quiescent et en cours de germination
D.E.S. Faculté des Sciences - Dijon
2. 2 - Travaux portant sur la culture in vitro d'autres plantes appartenant à la famille des Palmacées
- AMMAR & BENBADIS., 1977 - Multiplication végétative du Palmier dattier (Phoenix dactylifera L.) par la culture de tissus de jeunes plantes issues de semis.
Cr. Acad. Sci. Paris Ser. D, 284 , 1789 -92
- Eeuwens C. J. , 1976 - Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (cocos nucifera) and cultured in vitro.
Physiologia 36 , 23-8
- EEUWENS & BLAKE J. 1977 - Culture of coconut and date palm tissue with a view to vegetative propagation.
Acta Horticulturae 78 , 277-86
- REUVENI O., 1979 - Embryogenesis and plantlet growth of date palm (phoenix dactylifera L.) derived from callus tissue.
PL. Physiol. 63 , 138
- REUVENI & al. , 1972 - A study of new and rapid methods for the vegetative propagation of date palms
Date grower Inst. Rpt. 49 , 17-24
- REYNOLD & MURASHIGE., 1979 - Asexual embryogenesis in callus cultures of Palms
In vitro 15 , 383-7
- TISSERAT . , 1980 -Propagation of date palm (Phoenix dactylifera L.) in vitro.
J. exp. Bot. 30 , 1275- 83
- TISSERAT & de MASON., 1980 - A histological study of development of adventive embryos in organic cultures of Phoenix dactylifera L.
Ann. Bot. 46 , 465-472

III - Bibliographie sur l'aspect de la variabilité du matériel végétal en culture de tissu.

- BLAKELY & STEWARD., 1964 - Growth and organized development of cultured cells.
V . The growth of colonies from free cells on nutrient agar.
Amer. Jour. Bot. 51, 780-791
- MURASHIGE & NAKANO., 1966 - Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants.
J. Heredity, 57, 115-118
- SMITH & STREET., 1974 - The decline of Embryogenic Potential as callus and suspension cultures of carrot (Daucus carota) are serially subcultured.
Ann. Bot. 38, 223-241