

PHYSIOLOGIE VÉGÉTALE. — *Cultures aseptiques de racines de Palmier à huile* (Elaeis guineensis Jacq. var. dura Becc. et son hybride dura × var. pisifera Becc.). Note (\*) de MM. Jean-Pierre Martin, Serge Cas et Henri Rabéchault, présentée par M. Lucien Plantefol.

La culture *in vitro* de racines excisées de Palmier à huile est possible, soit en goutte pendante, soit dans un milieu liquide aéré par rotation sur un clinostat. Les milieux concentrés (3 à 4 g de sels par litre) donnent les meilleurs résultats et provoquent un doublement de la longueur initiale après 15 jours de culture. Les racines sont très sensibles aux auxines ANA, 2,4-D et kinétine. En présence d'ANA ou de 2,4-D ( $2 \cdot 10^{-6}$ ) la croissance se ralentit, puis cesse, et des cals se forment aux dépens du méristème apical de la racine principale et des racines secondaires. Ces cals sont cultivés actuellement et prolifèrent.

La bibliographie sur la culture *in vitro* des racines est trop copieuse pour être résumée ici. Des mises au point sur ce sujet ont été faites par White [(17), (18)] et par Butcher et Street (1), auteurs qui ont le plus contribué au développement des techniques dans ce domaine. Deux événements importants méritent cependant d'être signalés : la première culture réussie est celle de racines de Tomate et de Maïs en 1922-1924 par Robbins et coll. [(13), (14)], tandis que l'on attribue à White [(16), (17), (18)] le mérite d'avoir conçu le premier milieu nutritif adapté à la culture *in vitro* de racines excisées. Depuis, ce sont surtout les racines des Céréales qui ont fait l'objet des études les plus nombreuses. En tête vient le Blé, suivi du Maïs, de l'Orge, du Seigle, de l'Avoine et du Riz.

Enfin, on peut dire que la majorité des connaissances sur la physiologie de la croissance et du développement des racines en culture *in vitro* est le résultat des recherches que Street et coll. [(1), (3)] ont effectuées en Angleterre depuis 1948.

La culture des racines de Palmier à huile n'a, semble-t-il, pas encore été tentée et nous rendons compte ici de nos premiers résultats dans ce domaine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les racines utilisées ont été obtenues à partir d'embryons en culture *in vitro*. Les embryons ont été extraits de graines qui nous ont été obligeamment fournies par la Station de l'IRHO à Pobé (République du Dahomey) ; les méthodes de préparation, d'extraction et de culture ont été précédemment décrites [(8), (9), (10)].

Deux premières séries d'expériences, effectuées à l'aide de segments de racines d'embryons en culture depuis 130 et 56 jours, visaient à rechercher le meilleur dispositif, et à faire l'épreuve des milieux les plus couramment utilisés dans les cultures *in vitro* de racines.

EXPÉRIENCE SUR LES RACINES D'EMBRYONS DE 130 JOURS. — Après avoir choisi les embryons dont les racines étaient à peu près identiques et de même longueur (environ 50 mm), un segment de 5 mm a été prélevé à partir de l'extrémité de la racine principale et ensemencé sur les milieux mentionnés plus loin. Il y avait au minimum 5 répétitions par traitement. Des observations et des mesures de longueur et de diamètre ont été ensuite effectuées chaque semaine à l'aide d'un stéréomicroscope « Zeiss » muni d'un micromètre oculaire.

- 2 JUIN 1972

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

Collection de Référence

n° 5479

Bio Herb

Les milieux employés étaient les suivants :

- MS : milieu de Murashige et Skoog (<sup>7</sup>) + 20 ‰ de saccharose ;
- MSA : milieu MS +  $2 \cdot 10^{-6}$  d'acide  $\alpha$  naphthalène-acétique (ANA) ;
- W : milieu de White [<sup>16</sup>], (<sup>18</sup>) + 20 ‰ de saccharose ;
- WA : milieu W +  $2 \cdot 10^{-6}$  d'ANA.

Ces 4 milieux, ajustés à pH 5,8, ont été distribués dans des boîtes de Pétri de 70 mm de diamètre selon 3 techniques différentes :

a. *Sous forme solide* (addition de 8 ‰ de Bacto agar Difco) : les segments de racines étaient couchés à la surface du milieu coulé dans le fond de la boîte.

b. *Sous forme liquide* : les segments de racines étaient immergés dans une mince couche de milieu liquide disposée au fond de chaque boîte.

c. *Sous forme liquide en goutte pendante* : une goutte de milieu (0,1 ml environ) était placée, à l'aide d'une pipette Pasteur coudée, sous le couvercle de chaque boîte pour y recevoir le segment de racine. On évitait à la goutte de se déplacer pendant les manipulations en l'entourant d'un trait de vaseline stérilisée. Pour limiter l'évaporation, le fond de la boîte avait reçu au préalable une solution aqueuse d'agar à 7 ‰.

Les cultures ont été maintenues à l'obscurité, à  $27^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ .

Les pourcentages d'allongement obtenus sont indiqués dans le tableau I.

TABLEAU I

*Allongement des racines en % après 30 jours de culture en fonction du milieu et du dispositif (5 répétitions par traitement)*

Milieux	Dispositifs de culture		
	goutte pendante	film liquide	milieu gélosé
MS .....	26,0	16,0	7,5
MSA .....	7,0	2,5	11,0
W .....	5,5	4,0	3,5
WA .....	7,5	8,5	4,5

Ces pourcentages, bien que faibles, permettent de classer les allongements observés pour les milieux sans auxine dans l'ordre décroissant : goutte pendante, milieu liquide et milieu gélosé.

Le milieu de Murashige et Skoog favorise mieux la croissance des racines que celui de White.

L'allongement supérieur observé sur le milieu gélosé MSA est dû en réalité à la production d'un cal important au niveau du méristème apical ; cette prolifération cellulaire était de forme arrondie, blanche et relativement ferme. Ultérieurement, il est apparu des racines secondaires qui ont produit à leur tour des cals à leur extrémité ; puis la dédifférenciation cellulaire a gagné le cambium des parties les plus âgées de la racine principale, soulevant par endroits la surface et formant de petites pustules blanches.

Les cals apparus à l'extrémité des racines ont été séparés du reste des tissus à la fin de l'expérience, et repiqués sur un milieu neuf en vue de l'application des techniques mises au point précédemment pour la production d'embryons adventifs et de plantules [(11), (12)].

Nous avons pensé que les faibles accroissements observés étaient dus à l'utilisation de racines âgées, dont certaines étaient partiellement lignifiées, tandis que les meilleurs résultats obtenus avec le dispositif en goutte pendante étaient le fait d'une meilleure aération. Ces raisons nous ont conduits à choisir, d'une part des racines plus jeunes, plus homogènes et sans doute capables d'une croissance plus importante, et d'autre part un dispositif assurant une bonne aération.

EXPÉRIENCE SUR LES RACINES D'EMBRYONS DE 56 JOURS. — Une nouvelle expérience ayant montré que la culture en tubes avec des milieux liquides aérés par rotation sur un clinostat (26 tr/mn) donnait d'aussi bons résultats que la technique en goutte pendante, sans en présenter les inconvénients de manipulation, c'est ce dispositif que nous avons adopté. Les méthodes de prélèvement et les observations (effectuées tous les 15 jours seulement) étaient les mêmes que dans l'expérience précédente.

Nous avons comparé 4 milieux et, de plus, nous avons étudié les effets de l'addition de 2,4-D et de kinétine.

Les milieux de Gamborg (4) et MS (7) sont les plus riches en  $\text{KNO}_3$  (respectivement 2 500 et 1 900 mg/l), mais, tandis que le premier ne comporte pas de  $\text{NH}_4^+$ , le second renferme 1 650 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . Le milieu de Wolter (19) est caractérisé par sa richesse en sulfate de magnésium. Quant à celui de White [(16), (18)], il est deux à trois fois moins concentré que les autres : l'ion prédominant est le magnésium ; il n'a pas de  $\text{NH}_4^+$  et est pauvre en phosphore.

Pour ces 4 milieux, les compléments divers étaient ceux de Murashige et Skoog, la teneur en saccharose de 20 ‰ et le pH ajusté à 5,8.

TABLEAU II

*Allongement (en % et pour 15 jours de culture) des racines excisées d'embryons de 56 jours*

Milieux minéraux (concentration en sels)	Sans auxine	Avec 2,4-D ( $2 \cdot 10^{-6}$ )	Avec 2,4-D ( $2 \cdot 10^{-6}$ ) et kinétine ( $5 \cdot 10^{-7}$ )
Gamborg B 5 (3 184 mg/l) . . . . .	106	58	50
Murashige et Skoog (4 530 mg/l) . . . . .	98	65	50
White (1 393 mg/l) . . . . .	79	63	63
Wolter et Skoog (3 003 mg/l) . . . . .	99	63	55

A l'examen de ce tableau, on remarque immédiatement que les allongements obtenus sont très supérieurs à ceux des racines prélevées sur des embryons de 130 jours (tableau I). Kawata et coll. (5) ont fait des observations analogues en ce qui concerne la croissance *in vitro* des racines de Riz : celles prélevées sur de jeunes plantules ou des germinations de graines fraîches se développent mieux que celles provenant de plantules plus âgées ou de germinations de graines récoltées depuis 1 an.

Sans auxine, les milieux B 5 de Gamborg, MS et Wolter et Skoog donnent des résultats voisins, bien qu'étant de compositions différentes. C'est donc surtout la concentration en sels de ces solutions qui a un effet bénéfique.

Dans tous les milieux, le 2,4-D et la kinétine ont inhibé fortement la croissance. Il est vrai que les racines sont beaucoup plus sensibles aux auxines que les autres organes. Des cals ont commencé à apparaître au bout de 18 jours de culture, mais uniquement en présence de 2,4-D seul.

CONCLUSIONS. — La culture *in vitro* des racines aseptiques de Palmier à huile est possible, mais, si l'objectif poursuivi concerne des recherches sur la croissance, celles-ci doivent être prélevées de préférence dans les deux mois qui suivent la mise en culture des embryons.

En boîte de Pétri, les accroissements obtenus sont dans l'ordre décroissant : goutte pendante, film liquide, milieu gélosé. Avec des milieux liquides aérés sur clinostats on obtient des allongements au moins aussi satisfaisants que ceux du dispositif en goutte pendante.

Les milieux les plus concentrés, 3 à 4,5 g de sels par litre, sont ceux qui ont produit les allongements les plus rapides dans les conditions de l'expérience.

Les auxines (ANA, 2,4-D, kinétine) inhibent très fortement la croissance. Des cals se sont formés sur milieu gélosé avec ANA, et en milieu liquide aéré sur clinostat avec 2,4-D, aux concentrations  $2 \cdot 10^{-6}$ . Ces cals, transférés sur des milieux neufs, continuent de proliférer.

(\*) Séance du 27 mars 1972.

- (1) J. D. N. BUTCHER et H. E. STREET, *The Bot. Rev.*, 30, 1964, p. 513-586.
- (2) M. S. COHN et T. MERZ, *Nature*, G. B., 183, 1959, p. 412-413.
- (3) K. J. DORMER et H. E. STREET, *Nature*, G. B., 161, 1948, p. 483.
- (4) O. L. GAMBORG, *Canad. J. Biochem.*, 44, 1966, p. 791-799.
- (5) S. I. KAWATA, A. ISHIHARA et S. TSUNODA, *Proceed. Crop. Sc. Soc. Japan*, 37, 1968, p. 442-446 et 447-453.
- (6) E. MAEDA, *Proceed. Crop. Sc. Soc. Japan*, 34, 2, 1965, p. 139-147.
- (7) T. MURASHIGE et F. SKOOG, *Physiol. Plant.*, 15, 1962, p. 473-497.
- (8) H. RABÉCHAULT, *Oléagineux*, 17, 10, 1962, p. 757-764.
- (9) H. RABÉCHAULT, *Comptes rendus*, 264, Série D, 1967, p. 276-279.
- (10) H. RABÉCHAULT, G. GUÉNIN et J. AHÉE, *Oléagineux*, 25, 1970, p. 519-524.
- (11) H. RABÉCHAULT, J. AHÉE et G. GUÉNIN, *Comptes rendus*, 270, Série D, 1970, p. 3067-3070.
- (12) J.-P. COLONNA, G. CAS, H. RABÉCHAULT, *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 60.
- (13) W. J. ROBBINS, *Bot. Gaz.*, 73, 1922, p. 376-390 ; 74, 1922, p. 59-79.
- (14) W. J. ROBBINS et W. E. MANEVAL, *Bot. Gaz.*, 78, 1924, p. 424-432.
- (15) P. R. WHITE, *Plant. Physiol.*, 7, 1932, p. 613-628.
- (16) P. R. WHITE, *Bot. Rev.*, 2, 1936, p. 419-437.
- (17) P. R. WHITE, *Growth.*, 1, 1937, p. 182-188.
- (18) P. R. WHITE, *Ann. Rev. Biochem.*, 11, 1966, p. 615-628.
- (19) K. E. WOLTER et F. SKOOG, *Amer. J. Bot.*, 53, 1966, p. 263-269.

Laboratoire de Physiologie Végétale,  
Services Scientifiques Centraux de l'ORSTOM  
70, route d'Aulnay, 93-Bondy, Seine-Saint-Denis.