

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

IV. — EFFETS DE LA TENEUR EN EAU DES NOIX ET DE LA DURÉE DE LEUR STOCKAGE

H. RABÉCHAULT, J. AHÉE et G. GUÉNIN

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

Nous avons évoqué récemment [9], dans cette revue, la possibilité d'un effet de l'hydratation des graines sur le développement ultérieur des embryons en culture *in vitro*. Dans une expérience sur l'effet du vieillissement, un lot de graines de récolte récente, qui s'était déshydraté accidentellement pendant le stockage (8,5 %), a donné des embryons à développement irrégulier et lent.

Nous avons cherché à préciser ici les limites des effets de l'hydratation des graines sur le développement *in vitro* des embryons : d'une part lorsque les

embryons sont extraits dès que la teneur en eau prévue est atteinte et, d'autre part, lorsque les embryons sont extraits de graines stockées après humidification à une teneur en eau qui ne provoque pas le développement des embryons lors d'une extraction immédiate.

De son côté, J. VALLADE [14, 15], dans notre laboratoire, a procédé à l'examen cyto-histologique d'embryons en culture *in vitro* issus de graines amenées à diverses teneurs en eau, ce qui nous a permis une meilleure connaissance des phénomènes observés (voir Discussion).

A. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les expériences ont été réalisées à l'aide de noix d'*Elaeis guineensis* JACQ. var. DURA × DELI Lignée Dum 3 (1-00-19-10 D) récoltées le 22 mars 1965 à la Station I. R. H. O. de La Mé (République de Côte d'Ivoire). Ces graines ont été stockées un an à l'obscurité dans une salle climatisée (22 °C ± 0,5 °C). Au moment de l'expérience, leur teneur en eau par rapport au poids sec était tombée à 8,077 %.

Nous avons effectué deux expériences.

Dans l'expérience I : *effets de l'hydratation des graines*, nous avons cultivé *in vitro* les embryons issus de graines amenées à des teneurs en eau de 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 et 22 % par rapport au poids sec, par immersion de celles-ci, dans l'eau distillée, à l'obscurité à 27 °C pendant des temps plus ou moins longs. La teneur 8 % des graines non réhumidifiées servait de témoin.

L'expérience II était consacrée aux *effets du stockage*. Les graines étaient réhumidifiées jusqu'à 18 % d'eau, teneur qui ne provoquait pas un bon développement des embryons *in vitro* dans l'expérience I, puis elles étaient stockées pendant 5, 10 et 15 jours à l'obscurité et à humidité constante dans des sacs en polyéthylène.

Pour ces deux expériences, nous avons extrait aseptiquement, à partir des lots de graines correspondant aux divers traitements, 24 embryons qui ont été

cultivés *in vitro* selon la technique décrite précédemment [8, 9].

Bien que les divers stades du développement *in vitro* des embryons aient déjà fait l'objet d'une description détaillée [8], nous les rappellerons brièvement ici : stade I (augmentation générale du volume-absorption d'eau) ; stade II (l'embryon se courbe) ; stade III (forme en clou par augmentation du volume de l'extrémité opposée à l'haustorium) ; stade IV (apparition de la gemmule) ; stade V (apparition de la radicule).

Afin de faciliter l'examen des résultats obtenus, nous avons groupé les stades I et II sous le terme, peut-être impropre mais commode, d'« embryons indifférenciés » et les stades III et IV, sous celui d'« embryons différenciés ». En effet, au bout d'un mois de culture, les embryons qui ne sont pas parvenus aux stades I et II n'ont guère de chances de poursuivre leur évolution. Tandis que le stade III marque le début des divisions cellulaires qui conduit à la formation d'une jeune plante, VALLADE [14].

L'interprétation statistique des résultats a été effectuée à l'aide de la méthode de l'analyse de la variance (Test F de SNEDECOR) et l'effet de l'augmentation de la teneur en eau a fait l'objet d'une comparaison des moyennes deux à deux par la méthode dite des seuils adaptés selon COCHRAN [4].

23. MAI 1966 O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 20 207

Cote : B. rep 2.

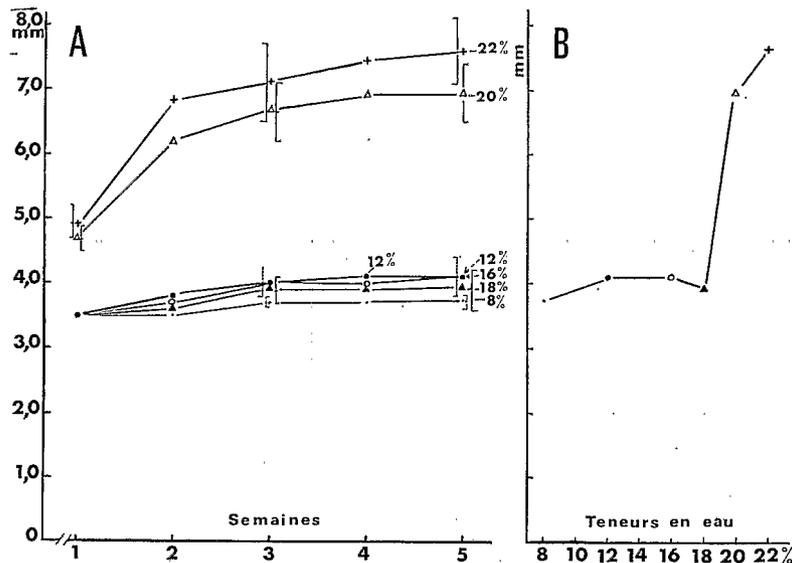
16 MAI 1966

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

Collection de Référence

n° 66

B. — RÉSULTATS



GRAPHIQUE 1. — A, croissance des embryons (longueur haustorium + pétiole cotylédonaire) extraits de graines à différentes teneurs en eau ; B, longueur moyenne des embryons correspondant aux diverses teneurs en eau des noix après un mois de culture.

I. — Effets de la teneur en eau des graines.

Le graphique ci-dessus traduit la croissance moyenne des embryons entiers (haustorium + pétiole cotylédonaire) et montre que celle-ci n'a pas été proportionnelle à la teneur en eau des noix.

L'analyse statistique (comparaison des moyennes deux à deux) a permis de discerner deux groupes : l'un formé par les deux lots les plus hydratés (20 et 22 %) et l'autre par les autres lots dont la teneur était inférieure ou égale à 18 %. Entre chaque groupe, les différences constatées étaient hautement significatives, mais elles ne l'étaient pas ou peu entre les traitements d'un même groupe.

Sur la planche ci-contre, nous avons réuni les photographies des embryons après un mois de culture (traitements les plus représentatifs).

Les embryons extraits de graines à 8 % d'eau par rapport à la matière sèche n'ont pu se développer *in vitro* bien qu'ils aient eu la faculté d'emprunter de l'eau au milieu nutritif qui en renfermait 96 %. Le développement des embryons jusqu'à la teneur 18 % n'était pas satisfaisant non plus puisque le nombre d'embryons indifférenciés est demeuré très élevé : 78 à 99 % (tableau I).

Le développement des embryons du groupe 20-22 % a été bien meilleur ainsi qu'en témoignent les photographies de la planche I et les pourcentages d'embryons différenciés (stades III et IV). Seuls les embryons issus des noix à 22 % ont donné des racines (stade V).

Les premiers stades III et IV, qui marquent le début de la formation de la jeune plante, sont apparus d'autant plus rapidement que les graines étaient plus hydratées. Ainsi, les premières gemmules (stade IV) ont été observées au cours de la 3^e semaine de culture chez les embryons des teneurs 13 à 20 %, et au cours de

TABLEAU I

Pourcentages des stades de développement après un mois de culture

Stades	Teneurs en eau des graines					
	8 %	12 %	16 %	18 %	20 %	22 %
I	90,47	78,26	73,91	87,50	0	4,34
II	9,52	0	17,39	8,33	17,39	8,69
I + II	99,99	78,26	91,20	95,83	17,39	13,03
III	0	8,69	4,34	0	60,56	60,86
IV	0	13,04	4,34	4,16	13,04	26,08
III + IV	0	21,69	8,68	4,16	82,60	87,94

la deuxième semaine chez les embryons des graines à 22 %. Ces derniers ont formé une racine au cours de la 5^e semaine.

Par conséquent on peut estimer que, dans les conditions de l'expérience, des graines humidifiées jusqu'à 18 % d'eau par rapport à leur poids sec ne peuvent fournir des embryons capables de se développer normalement *in vitro*.

II. — Effets du stockage des graines après réhumidification.

Une expérience préliminaire, qui ne sera pas rapportée ici, nous avait permis de constater que les embryons se développaient bien mieux *in vitro* lorsqu'ils étaient extraits de graines amenées à 13, 17 ou 21,5 % d'eau, puis stockées 10 jours, que lorsqu'ils étaient isolés immédiatement après la réhydratation.

Pendant le stockage, l'eau semble migrer dans la graine puisque la teneur en eau des embryons des

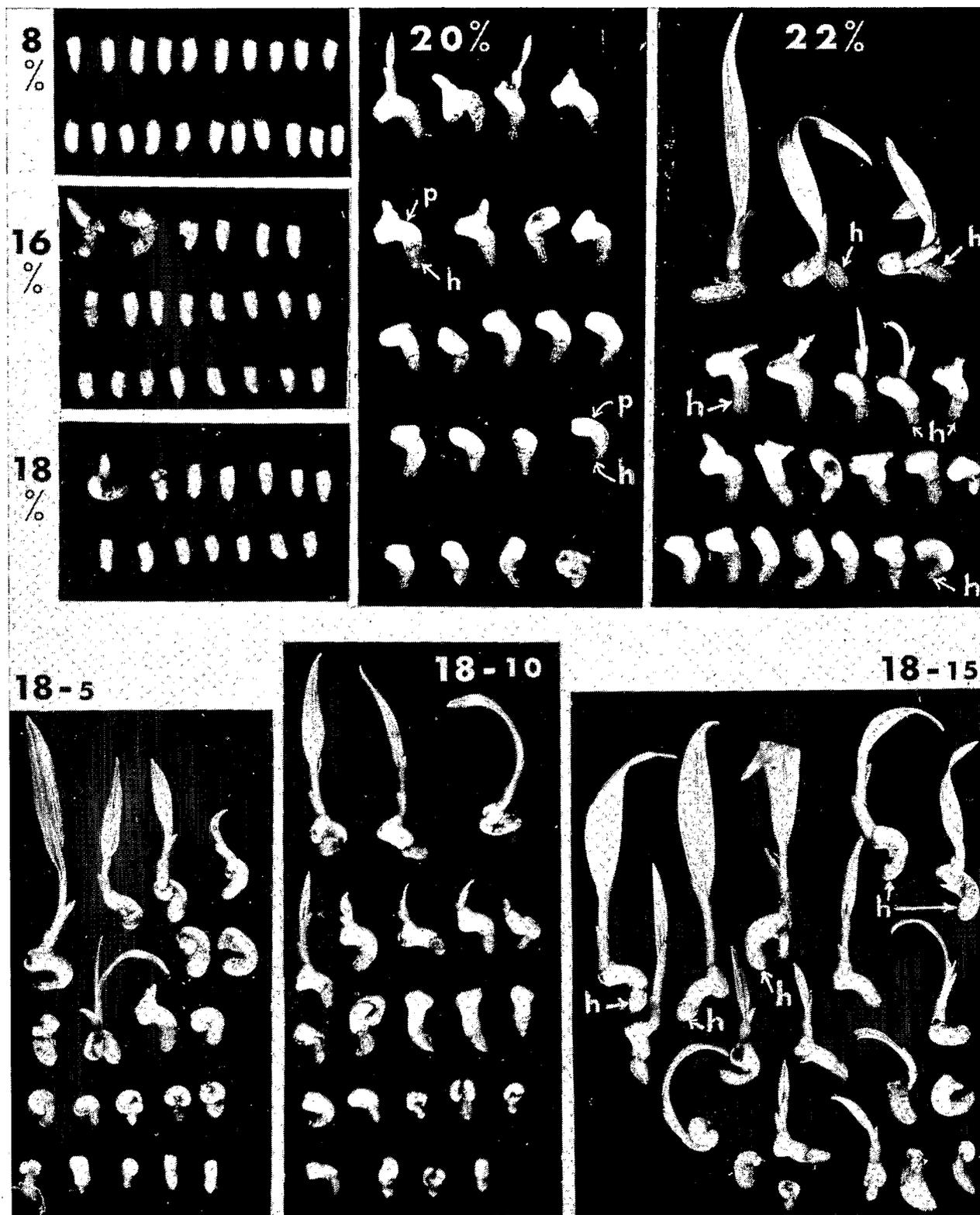


PLANCHE I.

Comparaison du développement d'embryons de palmier à huile après 3 mois de culture *in vitro*. *En haut*, les noix ont été amenées à 8, 16, 18, 20 et 22 p. 100 d'eau, juste avant l'extraction des embryons. *En bas*, les noix ont été amenées à 18 p. 100 puis stockées pendant 5, 10 et 15 jours avant l'extraction.

TABLEAU II

Effets du stockage des graines à 18 % d'eau sur l'allongement moyen de l'haustorium (en mm)

Nombre de jours de culture <i>in vitro</i>	Témoin	Temps de stockage		
		5 jours	10 jours	15 jours
1	3,504 ± 0,156	3,546 ± 0,170	3,829 ± 0,119	3,858 ± 0,152
14	5,545 ± 0,588	5,668 1 ± 0,750	5,645 4 ± 0,574	6,921 0 ± 0,899
28	6,071 ± 0,672	5,870 0 ± 0,786	6,122 7 ± 0,599	7,263 1 ± 0,836

graines à 18 % isolés immédiatement était de 18,036 % par rapport à leur matière sèche, tandis que celle des embryons des graines stockées 5 jours s'élevait à 63,761 %, celle des embryons des graines stockées 10 jours à 64,365 % et celle des embryons des graines stockées 15 jours à 61,448 %.

Les trois photographies du bas de la planche, qui représentent les embryons issus des noix humidifiées à 18 % puis stockées respectivement pendant 5, 10 et 15 jours, montrent bien que le traitement a été bénéfique et ceci proportionnellement à la durée.

Les allongements moyens de l'haustorium consignés dans le tableau II présentent d'ailleurs des différences significatives (test de COCHRAN) excepté entre le stockage 5 jours et le stockage 10 jours après 14 jours de culture et entre le témoin et le stockage 5 jours après 28 jours de culture.

Il en est de même en ce qui concerne la hauteur de la partie aérienne et le nombre de feuilles produites au bout de trois mois ; dans ce cas, les différences constatées n'étaient significatives qu'entre les traitements 5, 10 et 15 jours, mais non entre le témoin (sans stockage) et le stockage 5 jours.

Le dénombrement des divers stades de développement après 1, 2 et 3 mois de culture (tableau III)

indique une augmentation progressive du pourcentage d'embryons « différenciés » (stades III, IV et V) en relation avec le temps de stockage.

TABLEAU III

Effets du temps de stockage des graines à 18 % d'eau sur le pourcentage d'embryons « différenciés » (Stades III + IV + V)

Période de culture	Temps de stockage		
	5 jours	10 jours	15 jours
14 jours.....	30,00 %	63,63 %	78,94 %
1 mois	50,00 %	77,27 %	84,21 %
2 mois	50,00 %	81,81 %	84,21 %

L'analyse statistique des résultats du dénombrement des stades n'a pas permis de discerner de différence significative entre le témoin et le traitement 5 jours, mais au contraire les différences constatées entre les traitements témoin (sans stockage) ou 5 jours et les traitements 10 jours ou 15 jours étaient hautement significatives.

C. — DISCUSSION

Après leur récolte, les graines de palmier à huile se déshydratent progressivement. Pour les faire germer aussi bien que pour obtenir un développement convenable des embryons *in vitro*, il est nécessaire de les réhydrater. GALT [3] en 1953 a mis l'accent sur la nécessité de réhumidifier les graines pour obtenir une bonne germination. HUSSEY [5] a précisé ensuite que leur teneur en eau ne devait cependant être ni trop faible ni trop forte. Enfin REES [11, 12], qui a étudié minutieusement l'effet de la déshydratation des noix pendant leur stockage sur la perte de leur viabilité, a pu obtenir [13] la germination à 92 % de graines maintenues pendant un an à 34 °C et dont la teneur en eau était tombée à 8,5 % en les réhumidifiant jusqu'à 21,5 %.

Le vieillissement étudié précédemment [9] comme la perte d'eau pendant le stockage semblent donc avoir plus d'influence sur la viabilité des embryons excisés, que sur celles des embryons *in situ*.

Nos expériences montrent ici que des embryons isolés de graines de un an ne peuvent se développer *in vitro* que si les noix ont absorbé au cours de leur réhumidification plus de 18 % d'eau. Les embryons issus des noix réhumidifiées à 20 et 22 % par rapport à leur poids sec sont ceux qui se développent le mieux. Il est curieux de constater que ces teneurs en eau sont voisines de celle qui a été définie dans la littérature [5, 11, 12, 13] comme optimale pour la germination naturelle (21,5 %).

Chez les embryons extraits de graines sèches, c'est l'haustorium qui est le plus touché par la déshydratation ; celui-ci reste brun ou meurt. Il présente souvent des « abscissions », sortes de lésions qui conduisent parfois jusqu'à le séparer plus ou moins complètement du reste de l'embryon. Chez les embryons de graines à 20 ou 22 %, l'haustorium se développe mieux bien qu'il prenne souvent une coloration brune.

J. VALLADE, au cours d'une étude cyto-histologique

[14] comparative effectuée dans notre laboratoire sur des embryons en culture *in vitro* issus de graines sèches (9,5 %) et de graines humides (21,5 %), a constaté que l'effet d'une déshydratation des graines se fait surtout sentir sur les organes les plus différenciés : le limbe cotylédonaire (haustorium) et la zone radriculaire (située à l'extrémité du pétiole cotylédonaire). Il a en effet observé la présence de zones de tissus désorganisés sur l'haustorium des embryons des graines sèches, zone qui pouvait atteindre les faisceaux libéroligneux et la zone « M » (radriculaire). Il a constaté aussi, après 6 jours de culture *in vitro*, que les régions méristématiques (apex, feuilles) étaient en général préservées et pouvaient entrer seules en activité mitotique chez les embryons de graines sèches cultivés *in vitro*, tandis que des divisions cellulaires avaient lieu dans tous les tissus des embryons extraits de graines humides. De même l'allongement cellulaire n'était visible au bout de trois jours que chez 1 embryon sur 5 provenant de graines sèches et 3 embryons sur 5 provenant de graines humides.

Le brunissement de l'haustorium peut sans doute être rapproché de celui de certaines cultures de tissus. Ainsi, selon une étude récente de KOBBLITZ, GRÜTZMANN et HAGEN [6], l'oxydation des tanins et polyphénols serait à l'origine de l'inhibition de la prolifération cellulaire de tissus de *Papaver somniferum* L. en culture *in vitro*.

CONCLUSIONS

Le développement *in vitro* d'embryons extraits de graines de palmier à huile sèches (8 %) est à peu près nul. Comme pour la germination naturelle, il est nécessaire de réhumidifier les graines entre 20 et 22 % par rapport au poids sec pour obtenir de bons résultats.

L'haustorium et la région radriculaire sont les plus atteints par la déshydratation naturelle des graines après leur récolte.

Les embryons issus de graines à 18 % d'eau se développent mal, mais le stockage de ces graines avant extraction des embryons améliore le développement de ces derniers proportionnellement à la durée du

Le stockage de graines dont la teneur en eau était insuffisante (18 % dans les conditions de l'expérience) a amélioré de façon significative et spectaculaire le développement des embryons *in vitro*. Pour un stockage d'une durée de 15 jours, non seulement l'allongement de l'embryon mais aussi la vitesse de différenciation et le nombre des stades les plus avancés III, IV et V étaient supérieurs à ceux d'embryons de graines à 22 % non stockées de la première expérience.

A 22 % sans stockage, l'haustorium s'est développé mais il est resté souvent marron clair à brun, tandis que celui des embryons des graines à 18 % avec 15 jours de stockage étaient presque toujours de couleur clair jaune à jaune vert.

Pendant le stockage, l'eau continue à migrer vers l'embryon qui en absorbe davantage même que la teneur en eau globale de la graine (témoin 18,06 % ; stockage 5 j. 63,761 % ; 10 j. 64,365 % ; 15 j. 61,448 %). Mais l'effet bénéfique du stockage (expérience II) comme celui d'une forte hydratation des graines (expérience I) n'est certainement pas le résultat du seul enrichissement en eau de l'embryon, puisque les embryons extraits de graines sèches ont la faculté de se réhydrater sur le milieu nutritif (96 % d'eau environ). L'albumen cède non seulement de l'eau à l'embryon mais aussi certainement des substances stimulantes dont nous aborderons prochainement l'étude.

traitement. Non seulement l'allongement, mais le nombre d'embryons différenciés (stades III, IV et V), la longueur de la partie aérienne, le nombre de feuilles sont supérieurs à ceux d'embryons de graines à 22 % non stockées. Le brunissement des haustoriums diminue et souvent disparaît avec 15 jours de stockage.

Il est possible que la teneur en eau des noix ne soit pas seule en cause (expérience I) pas plus que celle de l'embryon qui augmente au cours du stockage (18,03 % témoin ; 64,36 % stockage 10 j.), car les embryons issus de graines sèches ont la faculté de se réhydrater aux dépens du milieu nutritif (96 % d'eau).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOUVINET J., H. RABÉCHAULT. — C. R. Acad. Sci. 260, pp. 5336-5338, 1965.
 [2] BOUVINET J., H. RABÉCHAULT. — Oléagineux, 20^e année, 2, pp. 79-87, 1965.
 [3] GALT R. — J. West. Afric. Inst. for Oil Palm Res., 1, pp. 76-87, 1953.
 [4] GOULDEN C. H. — Methods of Statistical analysis. Chapman and Hall, London, 1952.
 [5] HUSSEY G. — J. West. Afric. Inst. for Oil Palm Res., 2, 8, pp. 331-354, 1959.
 [6] KOBBLITZ H., K. GRÜTZMANN, I. HAGEN. — Z. Pflanzenphysiol. 56, pp. 27-32, 1967.
 [7] PREVOT P. — Cahiers ORSTOM, Physiol. Plantes Trop. Cult., 1, 1, pp. 1-39, 1962.
 [8] RABÉCHAULT H. — Oléagineux, 17^e année, 10, pp. 757-764, 1962.
 [9] RABÉCHAULT H., J. AHÉE. — Oléagineux, 21^e année, 12, pp. 729-734, 1966.
 [10] RABÉCHAULT H. — C. R. Acad. Sci., 264, sér. D, pp. 276-279, 1967.
 [11] REES A. R. — J. West. Afric. Inst. for Oil Palm Res., 7, 3, pp. 477-489, 1959.
 [12] REES A. R. — Ann. Bot., 26, pp. 569-581, 1962.
 [13] REES A. R. — J. Nigerian Inst. for Oil Palm Res., 4, 15, pp. 317-324, 1965.
 [14] VALLADE J. — Diplôme d'Etudes Supérieures. Université de Dijon, Docum. multigr. 73 pages, 1965.
 [15] VALLADE J. — C. R. Acad. Sci., Paris, sér. D., pp. 989-992, 1966.



Extrait de la revue « Oléagineux »,
Avril 1968, p. 233-237.