

DOREEN K. S. GOH
I.C.S.B.

MARIE-CLAUDE BON
CIRAD-Forêt

OLIVIER MONTEUUIS
CIRAD-Forêt

INTÉRÊT DES BIOTECHNOLOGIES POUR L'AMÉLIORATION DES ROTINS

Cas du projet Innoprise Corporation et CIRAD-Forêt

Améliorer la qualité des plantations de rotins par les biotechnologies, tel est le sujet de cet article qui prend pour référence le projet I.C.S.B. auquel le CIRAD-Forêt est associé depuis 1989.

Innoprise Corporation Sdn Bhd, en abrégé I.C.S.B., est la filiale commerciale de la Sabah Foundation qui est le plus gros exploitant forestier du Sabah (état de Malaisie situé au nord de l'île de Bornéo), avec une concession de 1 million d'ha. En 1987, I.C.S.B. a lancé un ambitieux programme de plantations commerciales de rotins et 10 000 ha ont déjà été plantés à ce jour.

Depuis 1989, I.C.S.B. collabore activement avec le CIRAD-Forêt à travers le projet « Plant Improvement

and Seed Production », en abrégé « P.I.S.P. », dont le principal objectif est d'améliorer la qualité des plantations de rotins. La collaboration a été renforcée ultérieurement par la création du « Plant Biotechnology Laboratory », destiné à tirer profit des biotechnologies pour les programmes d'amélioration des principales espèces de rotins à intérêt commercial plantées par I.C.S.B., et plus précisément *Calamus manan*, *Calamus subinermis* et *Calamus merrillii*. Cet article se propose de faire le point de la situation.

ISOZYMES POUR L'ÉTUDE DE LA BIODIVERSITÉ

L'utilisation des marqueurs génétiques de type enzymatiques,

conjointe à l'implantation et l'évaluation des parcelles conservatoires, s'inscrit dans le cadre du programme d'évaluation génétique et de conservation *ex situ* des principales espèces commerciales de rotins, initié en 1989.

Une technique d'électrophorèses d'isozymes, mise au point à partir d'échantillons foliaires, a fourni des marqueurs suffisamment polymorphes pour pouvoir aborder l'évaluation de la diversité génétique de ces espèces et de sa distribution spatiale.

En prenant pour base les paramètres classiques de génétique des populations, les analyses ont révélé une diversité génétique importante et similaire pour *Calamus manan* et *Calamus subinermis* (cf. photo 1, p. 53) mais une plus grande structuration de la variabilité génétique chez *Calamus manan* avec une très nette différenciation de la provenan-

ce du Kalimantan par rapport aux autres provenances testées.

Les observations réalisées indiquent des déviations au régime de fécondation allogame strict tel qu'il était attendu pour ces espèces dioïques. Les études sur le mode de reproduction et du flux de gènes intrapopulations devraient permettre d'approfondir ces informations.

ÉTUDES DU POLLEN

Les études ont porté sur le processus de développement du pollen, sa structure, les mécanismes de pollinisation proprement dite et les conditions de conservation compatibles avec un maintien de sa viabilité et de sa vigueur.

Les premiers résultats ont permis d'approfondir nos connaissances en matière de biologie florale des rotins, peu étudiée jusqu'ici. Un protocole approprié de conservation à - 18 °C des pollens de *Calamus manan* et de *Calamus subinermis* a permis de maintenir leur viabilité et leur vigueur après plusieurs mois de stockage (cf. photo 2, p. 55), ce qui est essentiel pour la poursuite des opérations de croisements contrôlés.

GERMINATION IN VITRO

Les protocoles de germination *in vitro* établis pour *C. manan*, *C. subinermis* et *C. merrillii* ont permis de produire des plants avec des taux de germination bien supérieurs à ceux observés classiquement en conditions de pépinière, où la faculté germinative des graines de rotin diminue très rapi-

dement. Le surcoût de l'*in vitro* se justifie pour des lots de graines génétiquement précieux mais quantitativement peu représentés, provenant, par exemple, de croisements contrôlés.

Les semis obtenus en conditions axéniques peuvent être directement acclimatés en conditions *ex vitro*, ou micropropagés en tirant profit de la bonne réactivité organogène de ce matériel très juvénile.

MICROPROPAGATION

La multiplication végétative de génotypes, « en vrac » ou clonale, peut être mise à profit pour les recherches en amélioration génétique ou, d'un point de vue plus pratique, pour la production de plants.

Le recours aux technologies de micropropagation *in vitro* se justifie particulièrement dans le cas des rotins compte tenu de l'inefficacité des techniques horticoles de multiplication végétative.

□ Micropropagation par bourgeonnement

La micropropagation par bourgeonnement repose sur la production de pousses surnuméraires d'origine axillaire, ou éventuellement adventive, qui sont ensuite enracinées par rhizogenèse adventive puis acclimatées *ex vitro*.

Les semis germés *in vitro*, placés sur des milieux de culture adéquats contenant des cytokinines exogènes (BAP), produisent un nombre de pousses très variable d'un explant à un autre. Sur *C. manan*, on a pu dénombrer jusqu'à 60 pousses virtuelles par explant, mais seules 2 à 4 en moyenne s'allongent suffisamment pour être préle-

vées et enracinées *in vitro* en présence d'auxine (A.I.A.) avec 75 % de succès. Quelque 1 000 tigelles de *C. manan* et *C. subinermis* ont déjà été produites, puis acclimatées avant d'être transplantées au champ pour étudier la conformité de leur développement (cf. photos 3 à 6, p. 57).

La mise en culture d'extrémités végétatives prélevées sur des plants *in situ* a permis de constater que la capacité organogénique des rares explants exempts de contaminations était supérieure à celle des semis, du moins dans les premiers stades de culture. Les problèmes de contaminations microbiennes constituent toujours un sérieux handicap à la micropropagation clonale à partir de ce type de matériel.

L'optimisation de la micropropagation par bourgeonnement semble exiger des compositions de milieux de culture différentes en fonction des espèces. *C. manan*, *C. subinermis* et *C. merrillii* ont montré, en outre, une très forte hétérogénéité de capacités organogènes d'un explant à l'autre.

□ Micropropagation par embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique peut être utilisée comme technique de micropropagation clonale. Ses principaux atouts sont :

- La possibilité d'induire le processus à partir d'explants primaires autres que les extrémités apicales, et donc de préserver la plante-mère dans le cas d'espèces ne possédant qu'un seul méristème terminal caulinaire, comme *C. manan*.
- Des coefficients de multiplication potentiellement énormes.
- La régénération de lignées uniformes, ontogénétiquement rajeu-

nies à partir de « têtes de clones » sélectionnées âgées. La production de clones sous forme de semences artificielles, éventuellement cryo-conservés, constituerait l'achèvement de cette technologie, nonobstant les risques de variations somaclonales.

Les recherches entreprises sur ce thème dans le cadre du projet ont privilégié *C. manan* du fait de son importance pour I.C.S.B. et du caractère strictement monocaulé de cette espèce de rotins.

Des embryons somatiques, dont l'origine a été précisée par des coupes histologiques, ont été obtenus pour *C. manan* à partir de pointes racinaires (cf. photos 7 à 11, p. 60). Celles-ci semblent plus réactives que les portions de folioles pour la production de cals embryogènes chez *C. manan* et *C. subinermis*, à l'inverse de *C. merrillii*.

Les premiers essais d'induction d'embryogenèse somatique, à partir de pointes racinaires et de folioles prélevés sur des individus matures *in situ*, se sont révélés infructueux, principalement du fait de protocoles de désinfection inadaptés.

L'embryogenèse somatique a également été induite à partir d'embryons zygotiques germés *in vitro*, en vue d'obtenir, plus rapidement que par les autres voies de micropropagation, des descendances clonales homogènes.

Là encore, il semble que l'optimisation des protocoles dépend strictement des espèces.

SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

Le choix des espèces de rotins plantées par I.C.S.B. s'est fait ini-

tialement sur la base de critères économiques. Rapidement, on a pris conscience qu'on pouvait augmenter les profits en améliorant le matériel végétal planté ; d'où diverses actions entreprises dans le domaine des biotechnologies.

La mise au point et l'application de technique de marquage génétique de type isoenzymatique aux principales espèces commerciales de rotins ont permis d'apprécier la grande diversité génétique des populations naturelles résiduelles. Les informations générées ont servi notamment pour les dispositifs de collection du matériel, la mise en place des conservatoires *ex situ* et des populations de base. Les résultats de l'étude du régime de reproduction dont les conséquences sur la structuration génétique sont importantes devraient être pris en compte lors de l'établissement des futurs peuplements semenciers du programme d'amélioration. Une autre application envisageable des marqueurs moléculaires pourrait être le déterminisme précoce du sexe chez ces espèces strictement dioïques afin de mieux contrôler le « sex ratio » dans les parcelles mises en place.

La possibilité de conserver le pollen de *C. subinermis* et de *C. manan* a été déjà mise à profit pour obtenir des hybrides artificiels dont l'intérêt est manifeste pour les programmes d'amélioration. Compte tenu de la faible faculté germinative des graines et des limites actuelles de la multiplication *in vitro*, le pollen peut représenter une autre alternative, économique de surcroît, pour les actions de conservation *ex situ*. Les banques de pollen peuvent représenter de larges populations et l'haploïdisation pourrait être po-

tentiellement utile pour les programmes d'amélioration futurs.

Les techniques de germination *in vitro* ont permis d'augmenter la faculté germinative et de disposer d'un matériel suffisant en conditions axéniques pour tester les possibilités de micropropager *C. manan*, *C. subinermis* et *C. merrillii*, puis de vérifier la conformité phénotypique des vitroplants au champ après acclimatation. Ces vitrométhodes pourront être avantageusement mises en œuvre, par exemple, pour tirer le meilleur profit des génotypes de *C. manan* issus des croisements contrôlés effectués. Mais les protocoles de micropropagation par bourgeonnement établis à ce jour restent relativement lourds. L'enracinement en conditions *in vivo* peut permettre de gagner une étape de culture *in vitro*, mais le coût global de l'opération demeure prohibitif pour une production en masse de vitroplants de rotins destinés aux plantations.

La poursuite des recherches dans le domaine de l'amélioration génétique et sur la micropropagation, plus spécialement via l'embryogenèse somatique, devrait préciser la meilleure façon d'utiliser les biotechnologies pour augmenter la qualité des plants de rotins destinés aux plantations industrielles. Ces biotechnologies pourraient jouer un rôle majeur dans l'établissement de vergers à graines clonales pour ces espèces strictement allogames. L'investissement consenti en amont devrait être considérablement valorisé par la production abondante de graines et consécutivement de semis génétiquement améliorés, produits à moindre coût par des techniques de pépinière éprouvées. □