

27 3 2009

# Induction *in vitro* de bourgeons adventifs à partir du sisal.

## Premiers résultats

D. FRYDRYCH\*

### RÉSUMÉ

Dans le cadre d'un programme d'induction de variabilité génétique pour le sisal, qui est naturellement stérile, nous avons utilisé préalablement les techniques de la culture *in vitro*.

Ces dernières ont été appliquées dans le but précis et limité de rechercher un matériel végétal sans bourgeon et susceptible d'induire des pousses; ceci pour réduire le risque de chimères, après un traitement mutagène éventuel.

L'induction de pousses adventives *in vitro* a été essayée selon deux voies :

- 1) Indirectement à partir d'un cal développé sur fragments d'écaille de bulbilles ou de feuilles de plantes cultivées *in vitro* ou en serre ;
- 2) directement sur fragments de plateau basal (ou courte tige) de bulbilles ou sur segments d'axes de plantes cultivées *in vitro* ou en serre.

Seule la seconde voie a donné des résultats positifs et surtout à partir de plateaux de bulbilles.

Le fait marquant de ces cultures *in vitro* de plateaux de bulbilles n'est pas le rendement, qui est ici encore faible, mais l'obtention d'un grand nombre de sisals avec des marges foliaires épineuses. La persistance des épines n'est observable qu'après plusieurs mois de culture en terre. Par contre, la culture *in vitro* des bourgeons terminaux de ces mêmes bulbilles produit des plantes avec des bords foliaires lisses.

L'origine possible des épines est discutée : variant, chimère péricline, maintien du caractère juvénile ou conditions de l'environnement. L'apparition des épines dépendrait plutôt du sisal lui-même que du milieu ou des conditions de la culture *in vitro*. Des expériences complémentaires seront entreprises. Nous signalons aussi l'obtention, à partir d'un sisal avec des bords foliaires épineux, d'une plante présentant notamment des épines minuscules et serrées.

Il est primordial de connaître l'origine des épines pour le sisal avant de chercher à induire une variabilité génétique. Le matériel végétal devra être choisi d'abord pour son aptitude à induire des pousses dont le caractère inerme des marges foliaires est conservé et, ensuite, pour un risque faible de chimères, pour les plantes induites après un traitement mutagène éventuel.

*Mots clés* : Agave, sisal, bourgeons adventifs, *in vitro*, feuilles épineuses.

### INTRODUCTION

Les feuilles du sisal, *Agave sisalana* Perrine, fournissent la majorité de la production mondiale de fibres dures naturelles. Cette Agave, originaire du Yucatan (Mexique), est cultivée dans la zone intertropicale, surtout au Brésil, en Tanzanie et au Kenya.

Tout au long de la période végétative, la plante produit des feuilles (250 environ) jusqu'à ce qu'elle fleurisse, après 8 ans, puis elle meurt. Cependant, dans les conditions naturelles, elle est stérile; le sisal est pentaploïde. La multiplication se fait exclusivement par la voie végétative.

- soit par drageons produits à l'extrémité de rhizomes ;
- soit par bulbilles sur la hampe florale, après la floraison.

Jusqu'ici, l'amélioration des Agaves à fibres s'est faite par hybridation entre espèces. Le sisal intervient rarement comme l'un des parents (WIENK, 1970). L'un des meilleurs hybrides obtenus est le N° 11648.

Actuellement, trois Agaves sont agronomiquement performantes : le sisal, l'hybride N° 11648 et de Henequen. Il faudrait augmenter la production en feuilles pour le sisal, introduire la résistance au *Phytophthora* chez l'hybride et supprimer les épines sur la marge des feuilles pour le Henequen.

Etant donné les difficultés de la sélection des Agaves par hybridation (elles fleurissent après 5 à 10 ans et il faut plusieurs générations pour obtenir un hybride commercialisable), il convient de rechercher d'autres voies pour l'augmentation de la variabilité génétique. Celles-ci pourraient être :

- la prospection des ressources naturelles en Agaves ;
- la création artificielle de variabilité par application des traitements mutagènes et des techniques de la culture *in vitro*. Nous avons choisi cette dernière voie pour le sisal avec, cependant, l'inconvénient d'une efficacité limitée des traitements mutagènes appliqués à une plante pentaploïde.

Nous exposons ici les travaux relatifs à la première étape : la culture *in vitro* du sisal, principalement pour augmenter l'efficacité des traitements muta-

\* Laboratoires de Physiologie I.R.C.T. et de Culture *in vitro* du G.E.R.D.A.T., Centre de recherches du G.E.R.D.A.T., B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex.

gènes. Les techniques de culture *in vitro* ont été utilisées dans le but précis et limité de rechercher un matériel végétal sans bourgeon et susceptible d'induire des pousses; ainsi, après un traitement mutagène éventuel, le risque de chimères sera diminué (panachage de zones mutées et non mutées, sur une plante).

Des Agaves ont déjà été cultivées *in vitro* par d'autres auteurs, mais dans un but de multiplication.

Cette dernière a été réalisée à partir :

- d'extrémités de tige, pour *Dracaena* et *Yucca*, in MURASHIGE 1974 ;
- de fragments de tiges, pour *Dracaena*, DEBERGH 1975, HÉNAULT 1974 et 1979 ;

— et de graines, pour *Agave* sp., GROENEWALD *et al.* 1977.

Pour le *Sansevieria*, la multiplication est possible à partir de fragments de feuilles.

Pour le sisal, nous avons tenté l'induction de pousses à partir de fragments sans bourgeon, selon deux voies :

- indirectement à partir d'un cal, développé sur morceaux d'écaillés de bulbilles ou sur feuilles de plantes cultivées *in vitro* ou en serre ;
- directement sur fragments de plateau basal (ou courte tige, fig. 1a) de bulbilles ou sur portions d'axes de plantes cultivées *in vitro* ou en serre.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé provient de trois sources :

- bulbilles, récoltées au mois de mars sur des plantes en Côte-d'Ivoire ;
- plantes cultivées en serre, à Montpellier, elles-mêmes issues de bulbilles ;
- plantes « étirées » en culture *in vitro*, dont les entre-nœuds se sont allongés.

Les bulbilles sont débarrassées de leurs écaillés sèches et abimées, le plateau basal nettoyé. Elles sont raccourcies aux deux extrémités (fig. 1a et b) : la base du plateau est sectionnée à 0,7 cm environ au-dessous de la ligne d'insertion de l'écaillé la plus externe, puis les écaillés sont coupées à 1,5 cm au-dessus de cette ligne.

Les bulbilles sont rincées pendant quelques secondes dans l'alcool à 70°, puis placées dans une fiole à vide contenant une solution filtrée d'hypochlorite de calcium à 70 g/l, additionnée d'une goutte de teepol. Pendant 20 minutes, la fiole est agitée et le vide établi par intermittence, pour faire pénétrer la solution entre les écaillés. Cette méthode s'inspire de celle utilisée par PANNETIER et LAMAUD, 1976, pour la stérilisation de couronnes d'ananas. Puis les bulbilles sont rincées trois fois à l'eau stérile.

Dans une enceinte stérile, les écaillés les plus externes sont détachées par quatre excisions longitudinales, tangentielles (fig. 1c). Puis la bulbille est sectionnée horizontalement, au ras de la ligne d'insertion des écaillés, pour séparer le plateau basal des écaillés et du bourgeon terminal. Dans la partie supérieure du plateau (fig. 1d), un cylindre de 6-9 mm de diamètre et de 3-4 mm de hauteur est prélevé à l'aide d'un emporte-pièce. D'autre part, (fig. 1e), le bourgeon terminal est séparé des écaillés par une

coupure horizontale. Les fragments d'écaillés mesurent 0,7 mm de côté.

Les plantes cultivées en serre sont préparées et stérilisées de la même façon que les bulbilles. Le cylindre, pris dans le haut de la tige sous les bourgeons terminal et axillaires, mesure environ 2 cm de diamètre; il peut être fractionné radialement en huit secteurs.

Les plantes cultivées *in vitro* ne sont pas stérilisées. Les feuilles sont enlevées et des fragments de 1 cm de hauteur sont découpés dans celles-ci. L'axe des plantes étirées est très étroit : 2 mm de diamètre; il est tronçonné en 2-3 segments de 4 mm de hauteur.

### Milieu de culture et environnement

Tous les explantats sont ensemencés *in vitro* sur un milieu de culture contenant les macroéléments, microéléments et substances organiques (moins la glycine) utilisés par MURASHIGE et SKOOG (1962), 30 g/l de saccharose, des hormones de croissance de nature et concentration variées. Le pH du milieu est ramené à 5,8 par ajout de soude décimorale, avant d'incorporer 8 g/l de gélose. Les tubes pour la culture des explantats mesurent 24 mm de diamètre et 130 mm de hauteur, ceux pour le repiquage des pousses ont le même diamètre, mais 250 mm de hauteur. Les milieux sont stérilisés par un passage de 15 mn à l'autoclave, à 120°C.

Les explantats sont posés à la surface du milieu de culture, leur polarité est respectée. Les tubes sont ensemencés et fermés par des bouchons en plastique transparent, puis ils sont placés en chambre de culture et éclairés par des tubes grolux (7 000 lux), pendant 14 heures sur 24. La température oscille de 29°C ( $\pm 1^\circ$ ) pendant la phase lumineuse, à 25°C pendant la phase obscure.

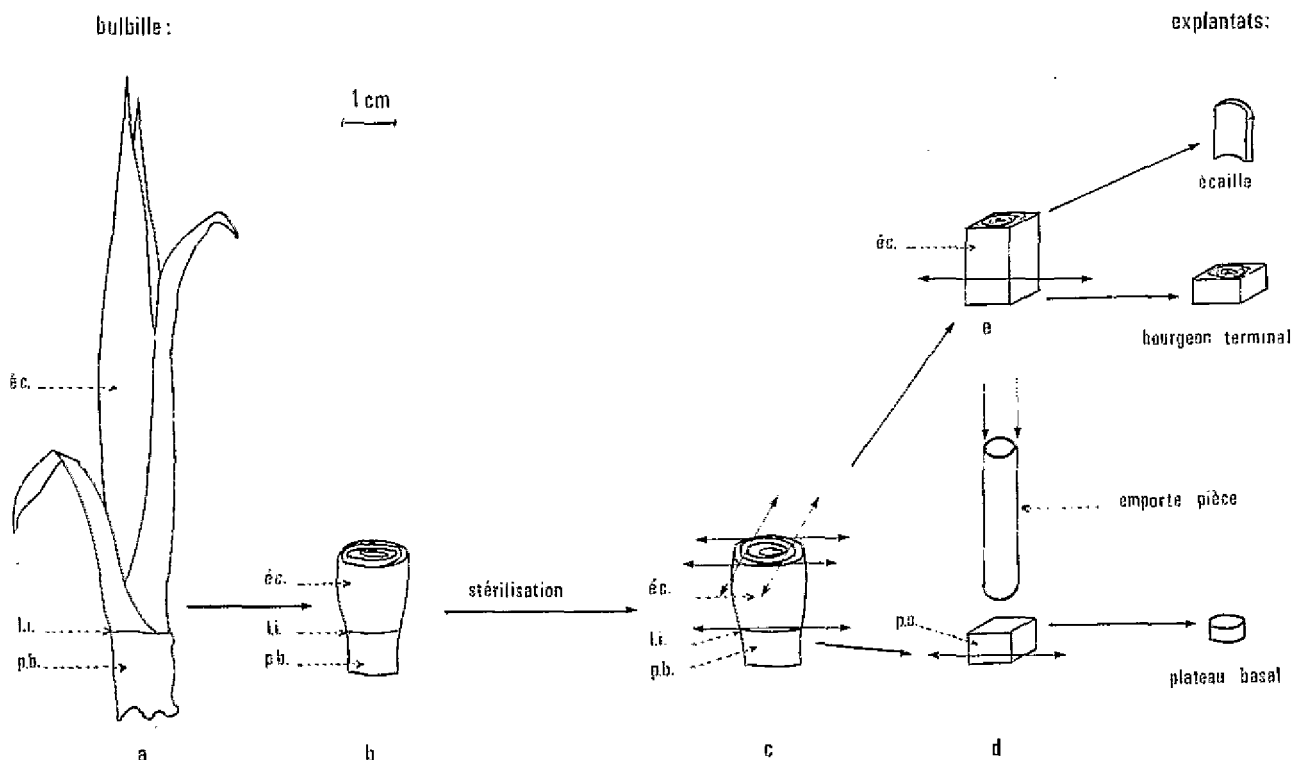


Figure 1. — Schéma de la dissection d'une bulbille pour l'obtention de trois explantats : plateau basal, bourgeon terminal et écaille. éc. : écaille ; l.i. : ligne d'insertion de la dernière écaille ; p.b. : plateau basal ;  $\longleftrightarrow$  : ligne de dissection.

## RÉSULTATS

### Stérilisation

La stérilisation du sisal est très difficile, du fait de sa morphologie ; il s'agit d'une plante à stipe trapu, dont les feuilles très serrées ont une disposition hélicoïdale ; les feuilles les plus anciennes sont enterrées ou proches du sol, les plus jeunes sont étroitement enroulées. 36 % seulement des explantats prélevés sur plantes en serre n'ont pas présenté de contamination visible après quelques jours de culture. Par contre, la stérilisation est plus efficace lorsqu'on utilise des bulbilles, qui sont cueillies sur la hampe florale à plusieurs mètres de hauteur.

### Culture *in vitro*

#### Tests préliminaires pour l'induction de bourgeons

Il s'agissait de sélectionner le meilleur explantat et des milieux favorables pour l'induction de bourgeons, soit indirectement à partir d'un cal, soit directement sur l'explantat. Les milieux callogènes (pour l'induction d'un cal) et caulogènes (pour l'induction de bourgeons) diffèrent uniquement par leur composition et leur concentration en phyto-hor-

mones. L'auxine AIA\*, ANA ou 2,4-D, est associée à une cytokinine, BAP ou kinétine. Les concentrations sont de 0,1 ; 1 ; 2 mg/l et jusqu'à 5 mg/l pour la kinétine (le milieu callogène de GROENEWALD *et al.* contient 1 mg/l de 2,4-D et 5 mg/l de kinétine).

À l'issue de ces tests, aucun bourgeon n'a été induit sur les écailles et sur les feuilles, soit directement sur l'explantat (sauf pour un seul explantat de feuille), soit indirectement après formation d'un cal. Les cals les plus volumineux se développent sur les milieux renfermant au moins 1 mg/l de 2,4-D associé à la BAP ou à la kinétine. Repiqués sur milieu organogène, ces cals ne produisent pas de bourgeon, seulement des racines.

Par contre, à partir de fragments d'axe de plantes étirées *in vitro*, de stipe de plantes en serre et de plateau basal de bulbilles, des bourgeons ont été induits sur milieux caulogènes (nous n'avons pas cultivé ces explantats sur milieux callogènes).

\* AIA : acide  $\beta$ -indolyl acétique ; ANA : acide  $\alpha$ -naphthalène acétique ; BAP : benzyladénine ou benzylaminopurine ; 2,4-D : acide 2,4 dichlorophénoxyacétique.

a) Bourgeons adventifs sur fragment d'axe de plantes étirées *in vitro*

Sur les trois milieux caulogènes essayés (avec 0,2 mg/l d'AIA et 2 mg/l de BAP, ou avec 0,1 mg/l d'ANA et 1 ou 2 mg/l de BAP), des bourgeons adventifs se sont développés sur les fragments d'axe de plantes étirées *in vitro*. En moyenne, 1 explantat sur 8 différencie 6 à 10 bourgeons, après 3 à 10 semaines de culture. Les bourgeons se forment dans la partie proximale de l'explantat, tandis que parfois, à la base de ce dernier, un cal se développe, puis des racines (fig. 2).

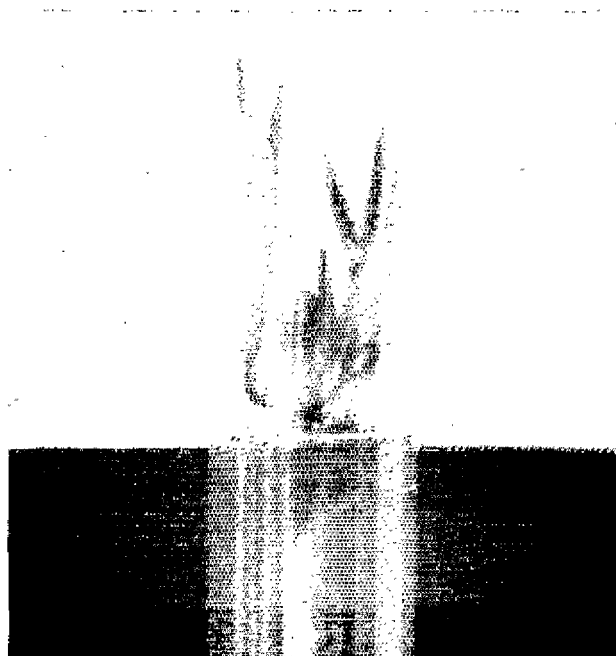


Fig. 2. — Pousses induites sur fragment d'axe, cultivé depuis 3 semaines sur le milieu de base (MURASHIGE et SNOODS, 1962), additionné de 0,1 mg/l d'AIA et 2 mg/l de BAP.

## b) Bourgeons adventifs sur le plateau basal des bulbilles et le sommet du stipe sans bourgeon de plante en serre

Quatre milieux caulogènes et un milieu témoin sans hormones ont été essayés, 20 explantats sont ensemencés sur chaque milieu (tabl. 1).

En l'absence d'hormones, aucun bourgeon n'est induit. Par contre, la BAP seule suffit : avec 1 mg/l, 26% des explantats produisent 5,4 pousses en moyenne. Les bulbilles utilisées pour cette manipulation ont été cueillies 8 mois auparavant.

## Induction de bourgeons sur le plateau des bulbilles et production de pousses feuillées

Pour les manipulations suivantes, nous avons employé un milieu renfermant 1 mg/l de BAP associé à une faible concentration en AIA : 0,1 mg/l. Nous y avons ensemencé des plateaux excisés à partir de bulbilles récoltées depuis trois mois, sur deux sisals, dans deux localités de Côte-d'Ivoire : au Foro-Foro (plante n° 1) et à Madinani (plante n° 2). Pour chaque plante, nous avons mis en culture 90 plateaux prélevés sur autant de bulbilles.

Après 3 à 11 semaines de culture, les primordia sont visibles à la surface des plateaux. Les bourgeons sont induits directement sur l'explantat (fig. 3 a), parfois ils couvrent toute la surface du disque (fig. 3 b). Certaines pousses, encore attachées à l'explantat, produisent des racines, qui vont plonger dans le milieu (fig. 3 c).

Environ 6 semaines après l'induction, quand les pousses ont atteint au moins 5 mm de hauteur, elles sont séparées et repiquées sur un milieu sans hormones, favorable à l'enracinement et à la poursuite de la croissance. Elles y restent environ 4 semaines avant d'être transplantées en terre. Après le premier prélèvement des bourgeons (première série, tabl. 2), les explantats sont replacés sur leur milieu initial et, quelques semaines plus tard, ils induisent d'autres bourgeons (deuxième série, tabl. 2).

Tableau 1. — Induction de bourgeons sur le plateau basal des bulbilles et le sommet des stipes sans bourgeon de plantes en serre

Origine de l'explantat	Auxine mg/l	Cytokinine mg/l	Pourcentage d'explantats avec bourgeons	Nombre moyen de bourgeons par explantat	Délai d'apparition (semaines)
Bulbilles	0	0	0	—	—
	0	BAP 1	26	5,4	6 — 10
	AIA 0,1	BAP 1	21	2,0	7 — 8
	1	1	12	5,0	7
	ANA 0,1	BAP 1	0	—	—
Plante cultivée un an en serre	ANA 0,1	BAP 1	8	1,0	8



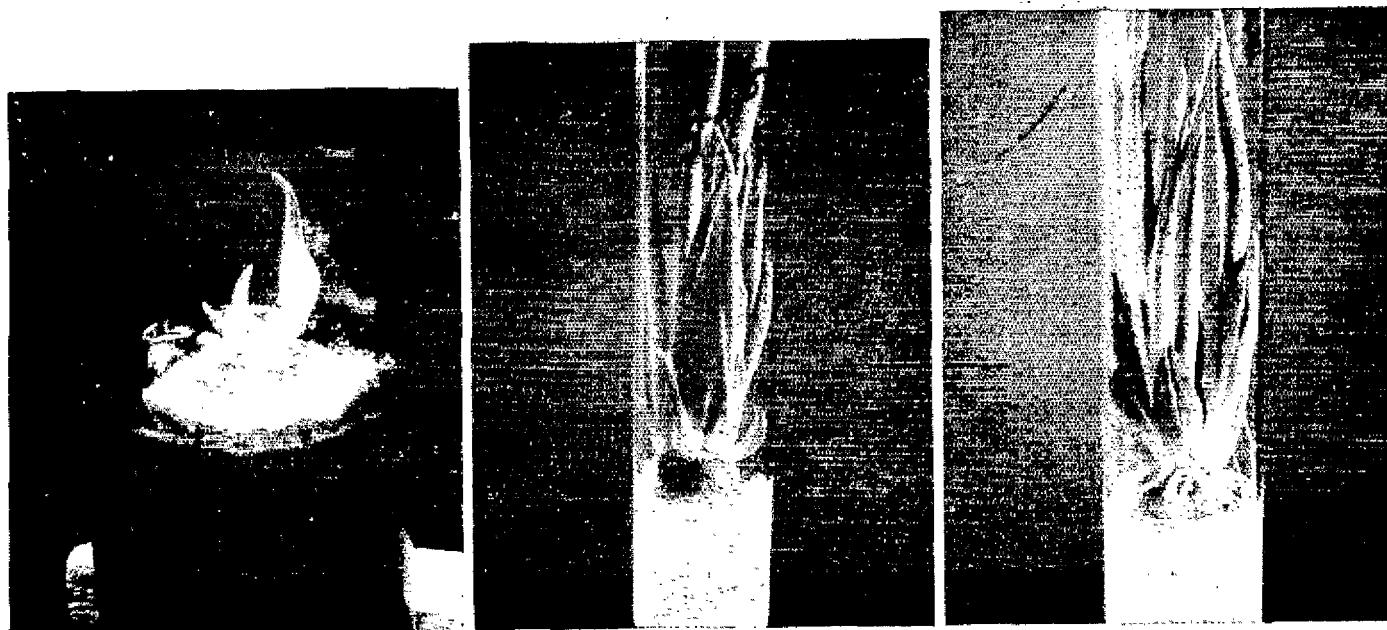


Fig. 3. — Bourgeons adventifs sur explantat de plateau basal: a) jeunes bourgeons ( $\times 2,6$ ); b) bourgeons couvrant toute la section du cylindre; c) bourgeons enracinés, sur l'explantat primitif.

Bien que les bulbilles des deux plantes n° 1 et 2 aient en moyenne un poids frais équivalent, et par conséquent des plateaux de superficies comparables, le rendement en bourgeons est meilleur à partir du plateau des bulbilles de la première plante que de la seconde.

#### Obtention de plantes conformes et de plantes présentant des anomalies foliaires

Les feuilles du sisal adulte ont des bords lisses sans épines, seules les extrémités sont armées d'une longue pointe acérée. Au stade juvénile de la plante, les bords des premières feuilles peuvent présenter des épines, généralement assez courtes.

Pour observer le caractère « marges des feuilles définitivement épineuses » sur les plantes obtenues *in vitro*, il a été nécessaire de les transplanter en terre et d'attendre l'émission de plusieurs feuilles ; en effet, un grand nombre de ces plantes sont épineuses jusqu'aux 3<sup>e</sup>, 4<sup>e</sup> feuilles, alors que les feuilles suivantes peuvent être inermes.

Nous avons effectué nos observations sur les échantillons suivants, cultivés en serre depuis 5 mois :

1. les plantes induites *in vitro* à partir du plateau des bulbilles (bourgeons de la première série, tableau 2) ;

Tableau 2. — Induction de bourgeons sur le plateau basal des bulbilles de 2 plantes (90 bulbilles par plante)

Plante	Poids frais moyen des bulbilles (g)	1 <sup>re</sup> série		2 <sup>e</sup> série		Nombre total de bourgeons induits à partir de 100 plateaux
		% plateaux avec bourgeons	Nombre moyen de bourgeons par plateau	% plateaux avec bourgeons	Nombre moyen de bourgeons par plateau	
N° 1 .....	8,3	40,2	5,9	24,1	3,0	305
N° 2 .....	8,2	31,0	5,1	19,0	2,9	211
Moyenne						
N° 1 + 2 .....	8,2	35,6	5,5	21,5	2,9	256

Tableau 3. — Pourcentage d'anomalies foliaires observées selon l'origine des plantes

Origine des plantes	Nombre de plantes observées	Marge des feuilles		
		normales %	épineuses %	soudées %
Plateau basal (bourgeons de la 1 <sup>re</sup> série) .....	191	22	77	1
Bourgeon terminal ..	152	97	3	0
Bulbille .....	18	100	0	0

2. les bourgeons terminaux de ces mêmes bulbilles, débourrés *in vitro* ;
3. les bulbilles.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

Après ce délai, les plantes sorties des tubes ont produit 5 feuilles en moyenne et les bulbilles un nombre légèrement supérieur.

Le résultat le plus marquant est l'obtention d'une quantité importante de plantes épineuses (77%) à partir de fragments de plateaux de bulbilles ; ceci, bien qu'il s'agisse d'une induction directe, sans la formation transitoire d'un cal. De plus, nous retrouvons une petite quantité (3%) de pousses

épineuses en cultivant *in vitro* des bourgeons terminaux, alors que des apex organisés devraient normalement être génétiquement stables (Hussey, 1978 a). Par contre, les quelques bulbilles cultivées en terre sont toutes inermes.

Signalons que, par culture *in vitro* d'une des plantes épineuses induites à partir du seul explantat de feuille qui ait donné des bourgeons, nous avons obtenu un nouveau type de plante : type micro-épineux. Les feuilles de cette dernière sont plus étroites et allongées que celles de la plante mère, elles sont légèrement teintées à leur base par des anthocyanes et portent sur leur marge des épines devenues minuscules (fig. 4).

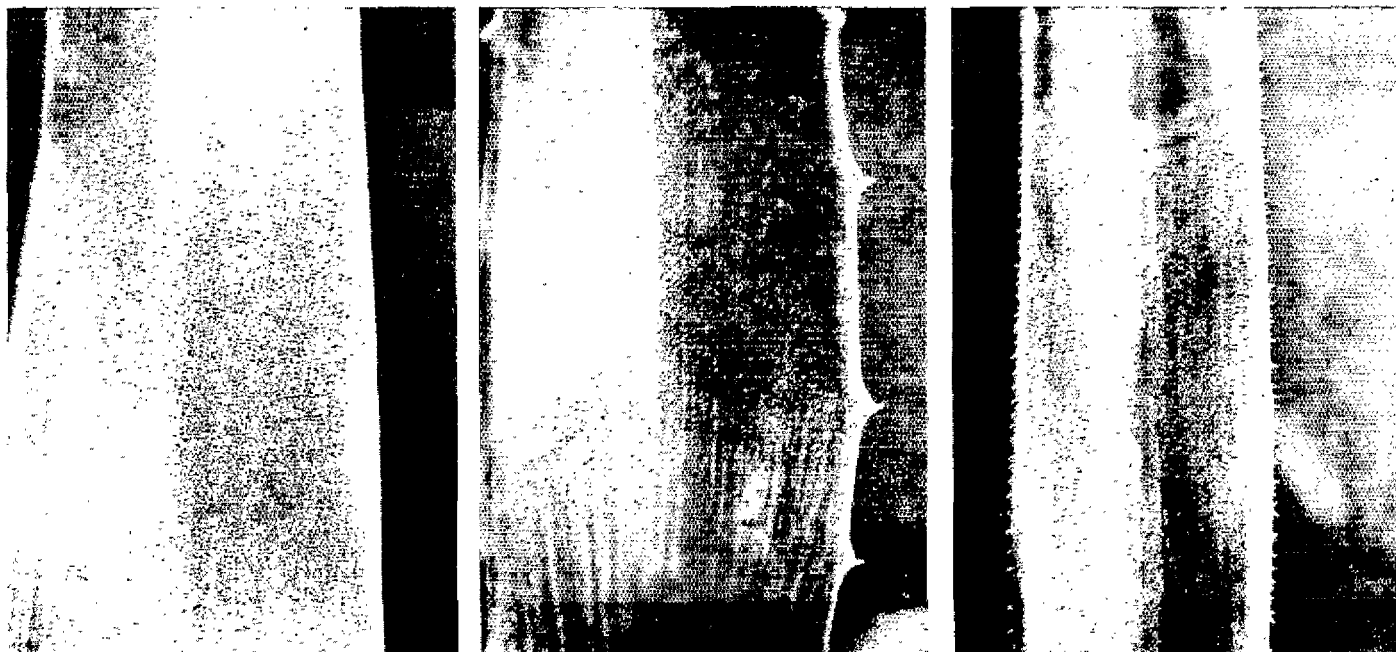


Fig. 4. — Portions de feuilles d'une plante conforme et de deux plantes épineuses: a) plante normale; b) plante épineuse (induite à partir du plateau basal d'une bulbille); c) plante microépineuse (obtenue *in vitro* à partir de la plante b).

## DISCUSSION

L'induction de pousses adventives *in vitro* a été tentée sur divers fragments de sisal : *Agave sisalana* Perrine, en suivant deux voies :

1. néoformation par l'intermédiaire d'un cal ;
2. induction directe par l'explantat.

Seule la seconde voie a donné des résultats positifs.

Sur les fragments d'écaillés de bulbilles ou de feuilles de plantes *in vitro*, des cals se sont développés. Ils ont différencié des racines, mais jamais de pousses. En cultivant des disques foliaires d'*Agave* sp., HUNAUULT (1974 et 1979) a également obtenu des cals ; il n'y a pas eu de caulogénèse à partir de ces derniers ou de l'explantat primitif.

Par contre, directement sur les fragments d'axes de sisal développés *in vitro*, sur le sommet des stipes de plantes en serre et surtout sur le plateau basal des bulbilles, des bourgeons adventifs ont été induits. Un tel résultat n'a jamais été obtenu à partir d'écaillés de bulbilles, ni à partir de feuilles (sauf sur un explantat). Des auteurs ont fait les mêmes constatations en travaillant sur les Agavacées suivantes : *Dracaena deremensis* (DEBERGH, 1975) et *Dracaena fragrans* (HUNAUULT, 1979).

A partir de 100 fragments de plateau sans bourgeon de bulbilles, nous avons obtenu 305 pousses. Ce nombre n'est pas un optimum, il sera certainement amélioré par une recherche systématique des conditions et des milieux de culture *in vitro*. Les primordia apparaissent 3 à 11 semaines après la mise en culture des plateaux. Un mois et demi plus tard, les pousses sont repiquées sur le milieu de base sans hormones et, un mois après, elles sont transplantées en terre.

Le résultat le plus marquant est l'obtention directement sur le plateau basal d'un grand nombre (77 %) de plantes dont la bordure foliaire est épineuse. Or, toutes les bulbilles provenaient de deux plantes inermes. D'ailleurs, les quelques bulbilles directement cultivées en terre ont donné 100 % de plantes inermes et les bourgeons terminaux débouffés *in vitro* ont produit 97 % de plantes sans épines.

Le caractère épineux définitif des pousses obtenues *in vitro* n'apparaît qu'après leur transplantation en terre. *In vitro*, la marge foliaire peut être lisse ou porter des épines. Pour une pousse de sisal, il n'y a pas de corrélation entre la présence ou l'absence d'épines sur les feuilles *in vitro* et en terre. De plus, en terre, il faut attendre que le plant ait émis plusieurs feuilles pour que le caractère épineux soit jugé définitif ; en effet, les premières feuilles peuvent être épineuses et les suivantes inermes.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer l'apparition de pousses épineuses à partir de fragments du plateau des bulbilles :

1. induction d'un variant ;
2. chimère péricline ;
3. maintien du caractère juvénile épineux ;
4. conditions de l'environnement.

## Obtention d'un variant

Ce pourrait être un variant de type cytoplasmique, selon la définition donnée par DEMARLY (1974). WAKASA, en 1979, a constaté un taux élevé de variants d'ananas en cultivant des explantats de syn-carpe et divers bourgeons ; mais ces plantes ont été néoformées par l'intermédiaire d'un cal.

Par contre, sans la formation transitoire d'un cal, PANNETIER (résultats non publiés) a obtenu un certain nombre d'ananas épineux en cultivant *in vitro* des bourgeons axillaires. Ce phénomène n'a pas été éclairci.

Pour le sisal, une majorité de plantes épineuses ont été directement induites sur fragments de plateaux de bulbilles. Ici, l'apparition de pousses épineuses ne semble pas liée au milieu ou aux conditions de la culture *in vitro* : un même explantat peut induire simultanément des plantes épineuses et des plantes inermes. Ainsi, les pousses épineuses ne seraient pas des variants cytoplasmiques, mais dépendraient plutôt des caractéristiques du matériel végétal lui-même.

## Le sisal inerme serait constitué par une chimère péricline

BEAUCHESNE (1980) relate la formation d'une proportion élevée de rosiers à tige épineuse, à partir de la culture *in vitro* de méristèmes de rosiers inermes. L'auteur suppose que le rosier inerme est une chimère péricline : la couche cellulaire génératrice externe est entièrement formée de cellules qui ne produisent pas d'épines, tandis que les cellules génératrices internes conservent cette potentialité. Cette dernière pourrait s'exprimer dans des conditions favorables, par exemple de la culture *in vitro*, lorsque les cellules internes ont été mises au jour. Et pour le plant épineux, les deux couches génératrices épidermique et sous-épidermique sont uniquement composées de cellules donnant des épines.

De même, le sisal cultivé (dont les marges foliaires sont inermes) pourrait être une chimère péricline (LOCK, 1962). Ainsi, le caractère inerme ou épineux des pousses induites directement sur un explantat dépendrait de la composition cellulaire de ce dernier :

1. si l'explantat comporte dans son intégrité la couche externe ne donnant pas d'épines, les plantes seront inermes (c'est le cas des bourgeons terminaux de nos expériences) ;
2. si, au contraire, l'explantat ne contient pas du tout la couche épidermique, toutes les plantes seront épineuses ;
3. si la couche externe n'est que partiellement présente, quelques plantes seront inermes ou partiellement inermes (par exemple, feuilles avec des bords partiellement épineux et partiellement inermes) et les autres plantes épineuses.



Nous trouvons ces deux derniers cas dans les cultures *in vitro* à partir du plateau basal des bulbilles.

D'autres auteurs ont fait des observations sur le sisal, qui sont en accord avec cette hypothèse :

1. les épines en bordure des feuilles sont des formations épidermiques lignifiées (LOCK, 1962);
2. au champ, il peut arriver (fait rare) que des sisals inermes produisent des bulbilles et drageons épineux, ces derniers donnant à leur tour toujours des plantes épineuses (CRÉTENET *et al.*, 1970), l'inverse n'a jamais été observé;
3. le caractère « marges des feuilles inermes » est perdu systématiquement, lorsque la multiplication par graines est possible (DOUGTRY, 1938).

Cependant, un résultat de nos cultures *in vitro* à partir de sisal semble contredire l'interprétation selon laquelle le caractère inerme des feuilles serait dû à une chimère péricline. Il s'agit des 22 % d'individus inermes parmi les plantes induites sur fragments de plateaux, alors que ces explantats ont en principe été prélevés dans la zone interne de la bulbille (fig. 1). Mais, dans la pratique, il n'en a pas toujours été ainsi : après plusieurs jours de culture *in vitro*, nous avons constaté un gonflement, à la périphérie de quelques fragments de plateaux, correspondant à la base d'une écaille externe; cette dernière a pu être à l'origine des quelques plantes inermes observées.

Il nous reste à vérifier que les tissus internes du sisal (fragments de plateau basal) induisent des plantes toujours épineuses, contrairement aux bourgeons qui, pourvus de la couche cellulaire externe, sont à l'origine de plantes inermes.

### Maintien du caractère juvénile

Certaines plantes : poirier, pommier, *Citrus*, *Gleditsia*, présentent des points végétatifs à différents niveaux de l'axe principal qui perpétuent des phases particulières du développement de la plante : juvénile ou adulte. Par exemple :

Pour expliquer l'apparition du caractère épineux pour le sisal, l'hypothèse de la chimère péricline paraît la plus plausible. Il nous reste à la vérifier par des expériences complémentaires.

Si la disposition en chimère péricline est ultérieurement confirmée, il faudra en tirer les conclusions nécessaires quant au choix du matériel végétal qui sera utilisé pour les tentatives d'induction de variabilité génétique. L'explantat sera sélectionné d'abord pour une aptitude à induire des pousses inermes et ensuite pour un risque faible de chimères, après une irradiation éventuelle.

Dans le cas d'une chimère péricline, le choix d'un explantat constitué par deux écailles de bulbilles, attachées à leur base par un morceau de plateau, sera le plus judicieux pour plusieurs raisons :

1. la zone morphogénétique située à la base, entre les deux écailles, comprend l'épiderme, ainsi l'ap-

- si des bourgeons sont prélevés à la base de portions juvéniles de plantules, les boutures donneront des plantes vigoureuses, épineuses et lentes à fleurir;
- par contre, les bourgeons situés dans la partie supérieure du même arbre produisent des plantes moins vigoureuses, à écorce lisse et à floraison rapide (HARTMANN et KESTER, 1975). Quelquefois, ces caractéristiques juvéniles peuvent persister pendant plusieurs générations végétatives (chez le *Citrus*, CAMERON *et al.*, 1957, *in*: HARTMANN et KESTER).

Les bulbilles de sisal possèdent des caractéristiques du stade juvénile; lorsqu'on les place en terre, les premières feuilles sont généralement épineuses et les suivantes inermes. Le caractère épineux juvénile se maintient-il pour les plantes développées *in vitro* à partir de bulbilles? Ce pourrait être le cas pour les plantes induites sur plateau et qui restent épineuses, mais pas pour les bourgeons terminaux de ces bulbilles qui donnent 97 % de plantes inermes.

### Conditions de l'environnement

Dans des sols particulièrement fertiles, des sisals normalement inermes produisent de petites épines: c'est le cas dans les hauts plateaux, à Madagascar. En outre, un sisal inerme peut présenter une séquence de feuilles légèrement épineuses, comprise entre des feuilles totalement inermes. Dans les deux cas, les petites épines ne peuvent pas être confondues avec les épines beaucoup plus grosses et fortes d'un sisal épineux. Et la formation de ces petites épines sur des sisals normalement inermes est liée à des conditions environnementales particulières (d'après CRÉTENET, communication orale).

Par contre, les épines que nous observons sur les plantes qui ont été induites à partir du plateau des bulbilles, puis transplantées en terre, sont très fortes et identiques à celles des sisals dits épineux.

### CONCLUSION

1. la parition de plantes épineuses devrait être évitée;
2. ce fragment ne présente pas de bourgeon organisé, mais une zone morphogénétique située parallèlement à la base des écailles, ce qui devrait entraîner un risque faible de chimères (après irradiation) et une production abondante de pousses (HUSSEY, 1975 et 1978 b, à partir de tels explantats prélevés sur bulbes d'Amaryllidacées et de Liliacées, a obtenu un taux de multiplication élevé).

De plus, un résultat intéressant est à signaler : à partir d'une plante de sisal dont les marges foliaires sont épineuses, un nouveau type de plante s'est développé *in vitro* : sur les bords des feuilles, les épines sont devenues minuscules (fig. 4). Ce phénomène mérite d'être éclairci. Il serait utile de pouvoir le reproduire à partir d'autres Agaves : *A. fourcroides*, par exemple, dont la forme inerme n'est pas connue.



REMERCIEMENTS : l'auteur souhaite remercier  
M. SÉMENT, pour la fourniture de bulbilles de  
sisal.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BEAUCHESNE G., 1980. — Intérêt de la culture *in vitro* pour la multiplication végétative. *C.R. Acad. d'Agr.*, 66, 3, 638-649.
2. CRÉTENET S., B. de RAUCOURT, E. GRAMAIN et R. BAILLY, 1969 et 1970. — Seize années d'expérimentation sisalière à la station du Mandraré (Madagascar), 1953-1968. *Cot. Fib. trop.*, 1969, 24, 4, 443-463 ; 1970, 25, 2, 151-174.
3. DEMARLY Y., 1974. — Les effets cytoplasmiques et l'amélioration des plantes. *Bull. Assoc. Sélect. Fr.*, 14, 61-88.
4. DEBERGH P., 1975. — Intensified vegetative multiplication of *Dracaena deremensis*. *Acta Hort.*, 54, 83-92.
5. DOUGHTY L.R., 1938. — Experimental breeding of fibre Agaves in East Africa. Part. II: The progress of breeding at Amani. *The East Afr. J.*, 3, 268-278.
6. GROENEWALD E.G., D.C.J. WESSELS and A. KOELEMEN, 1977. — Callus formation and subsequent plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). *Z. Pflanzen physiol. Bd.*, 81, S, 369-373.
7. HARTMANN H.T. and D.E. KESTER, 1975. — Plant propagation. Principles and practice. *Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey*. 662 p.
8. HUNAUULT G., 1974. — Obtention de souches de tissus à partir de diverses espèces de Monocotylédones. *C.R. Acad. Sc., Paris*, 278, 2509-2512.
9. HUNAUULT G., 1979. — Recherches sur le comportement des fragments d'organes et des tissus de Monocotylédones cultivés *in vitro*. II: Etude du cas de quelques Agavacées. *Rev. Cytol. Biol. Végét. Bot.*, 2, 21-66.
10. HUSSEY G., 1975. — Totipotency in tissue explants and callus of some members of the *Liliaceae*, *Iridaceae* and *Amaryllidaceae*. *J. Exp. Bot.*, 26, 91, 253-262.
11. HUSSEY G., 1978 a. — The application of tissue culture to the vegetative propagation of plants. *Sci. Prog., Oxf.*, 63, 185-208.
12. HUSSEY G., 1978 b. — *In vitro* propagation of the Onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation. *Sc. Hort.*, 9, 227-236.
13. LOCK G.W., 1962. — Sisal. Twenty five years' Sisal research. *Tanganyika Sisal Growers' Association. Longmans, Green and Co, London*, 355 p.
14. MURASHIGE T., 1974. — Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, 135-166.
15. MURASHIGE T. and F. SKOOG, 1962. — A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15, 473-497.
16. PANNETIER C. et C. LANAUD, 1976. — Divers aspects de l'utilisation possible des cultures *in vitro* pour la multiplication végétative de *Ananas comosus* L. Merr., variété Cayenne lisse. *Fruits*, 31, 12, 739-749.
17. WAKASA K., 1979. — Induction of variants through tissue culture in *Ananas comosus* (L.) Merr. *Plant breeding abst.*, 49, 66, 37, 39-40.
18. WIENK J.F., 1970. — The long fibre Agaves and their improvement through breeding in East Africa. In: *Crop improvement in East Africa*. C.L.A. Leakey ed., 209-230.

## SUMMARY

As part of a genetic variability induction programme concerning sisal, which is naturally sterile, the authors had previously used *in vitro* culture methods.

These were applied with the precise and limited objective of searching for a plant material without buds and capable of inducing shoots; this was to reduce the risk of obtaining chimeras after possible mutagenic treatment.

The *in vitro* induction of adventitious shoots was attempted by means of two routes: — 1, indirectly from a callus grown on bulbil scale fragments or on leaves of plants cultivated *in vitro* or in a greenhouse, — 2, directly on bulbil basal plate fragments (or short stem) or on segments of axes of plants cultivated *in vitro* or in a greenhouse.

Only the second route gave positive results, especially from bulbil plates.

The outstanding feature of these *in vitro* bulbil plate cultures is not the yield, which is still low, but the production of a large number of sisal plants with thorny leaf edges. The persistence of the thorns is observable only after a few months culture in soil. On the other hand, the *in vitro* culture of terminal buds produces plants with smooth leaf edges.

The possible origin of thorns is discussed: variant, periclinal chimera, retention of juvenile character of environmental conditions. The appearance of thorns may depend on the sisal plant itself rather than on the medium or the *in vitro* cultural conditions. Further experiments will be carried out. Attention is

also drawn to the fact that a sisal plant having in particular very small thorns close to one another are obtained from a sisal plant with thorny leaf edges.

It is of prime importance to discover the origin of the thorns of the sisal plant before attempting to

introduce genetic variability. The plant material must be chosen for its ability to induce shoots of which the inerm character of the leaf edges is retained and for the small risk of obtaining chimeras from plants induced after any mutagenic treatment.

## RESUMEN

En el marco de un programa de inducción de variabilidad genética para el sisal, que es naturalmente estéril, hemos utilizado previamente las técnicas de cultivo in vitro.

Estas últimas han sido aplicadas con el fin preciso y limitado de buscar un material vegetal sin brote y susceptible de inducir retoños, con la finalidad de limitar el riesgo de quimeras, después de un tratamiento mutágeno eventual.

La inducción de retoños adventicios in vitro se intentó según dos vías:

1. Indirectamente a partir de un callo desarrollado en fragmentos de escama de bulbillos o en hojas de plantas cultivadas in vitro o en invernaderos;
2. directamente en fragmentos de amacollamiento basal (o tallo corto) de bulbillos o en segmentos de ejes de plantas cultivadas in vitro o en invernadero.

Únicamente la segunda vía dió resultados positivos y sobre todo a partir de amacollamientos de bulbillos.

El hecho importante de estos cultivos in vitro de amacollamientos de bulbillos, no es el rendimiento, que aquí es aún bajo, sino la obtención de un gran

número de sisales con márgenes foliares espinosas. La persistencia de las espinas sólo puede ser observada al cabo de varios meses de cultivo en tierra. Por el contrario, el cultivo in vitro de los retoños terminales de estos mismos bulbillos produce plantas con bordes foliares lisos.

Se discute el origen posible de las espinas: variante, quimera periclina, mantenimiento del carácter juvenil o condiciones de medio ambiente. La aparición de las espinas, dependería más bien del propio sisal que del medio o de las condiciones del cultivo in vitro. Se emprendieron experiencias complementarias. Señalamos también la obtención, a partir de un sisal con bordes foliares espinosos, de una planta que presenta en particular espinas minúsculas y apretadas.

Es primordial conocer el origen de las espinas para el sisal, antes de buscar a inducir una variabilidad genética. El material vegetal deberá ser escogido ante todo por su aptitud a inducir retoños cuyo carácter inerm de las márgenes foliares se haya conservado y acto seguido para un riesgo bajo de quimeras, para las plantas inducidas después de un tratamiento mutágeno eventual.