

MICROBOUTURAGE
DE
L'HEVEA BRASILIENSIS

IRCA-CIRAD/SMH



BILAN 1988
PERSPECTIVES 1989

Rapport d'activité quadrimestriel
Janvier 1989

MICROBOUTURAGE
DE
L'HEVEA BRASILIENSIS

IRCA-CIRAD/SMH

- BILAN 1988

- PERSPECTIVES 1989

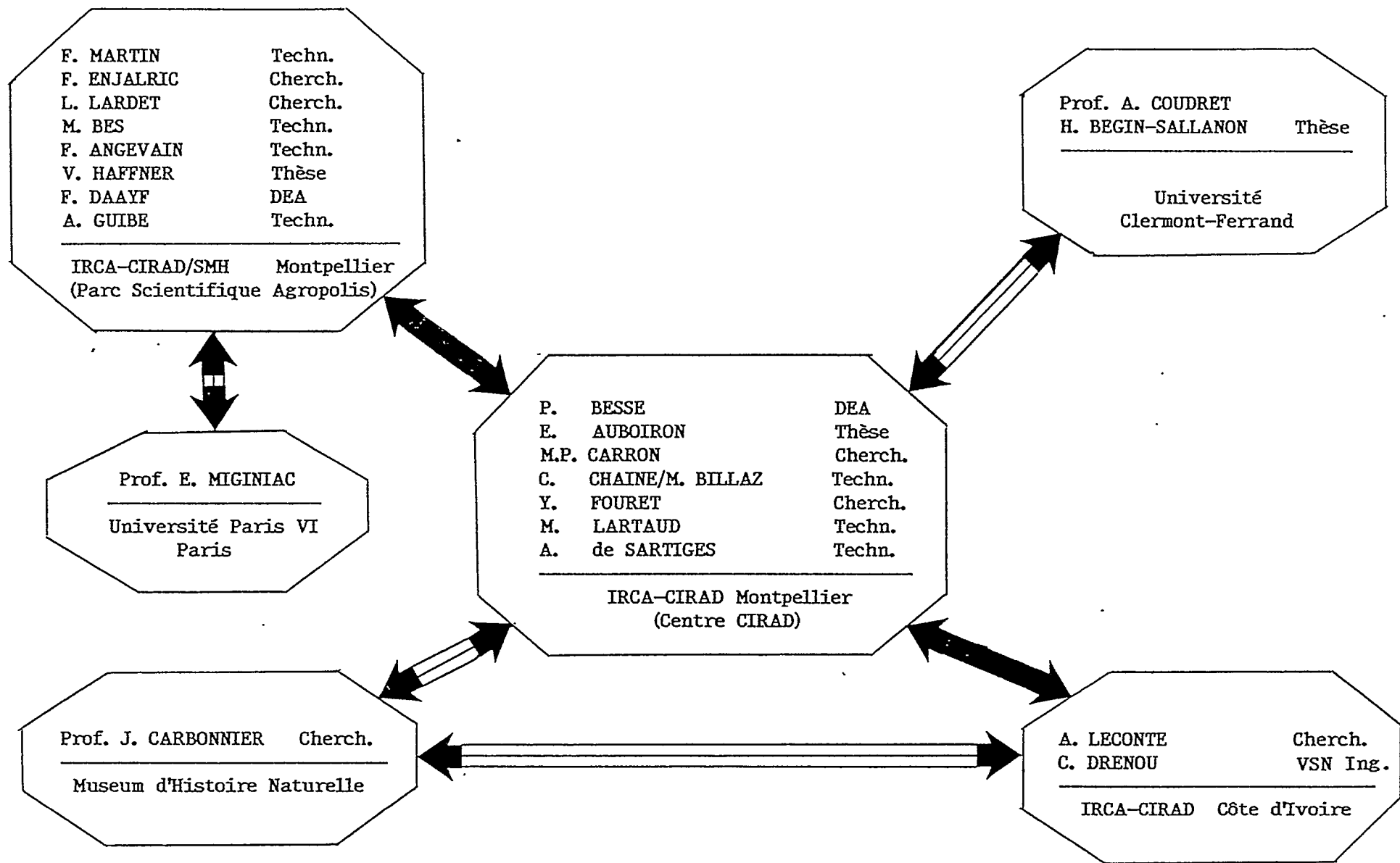


Figure 1 : L'EQUIPE DE RECHERCHES SUR LE MICROBOUTURAGE DE L'HEVEA ET SES LOCALISATIONS

Grâce à la création de la SMH (Société de Microbouturage de l'Hevea), l'équipe de l'IRCA-CIRAD, affectée au programme du microbouturage de l'Hevea, est passée de 6 personnes en 1987 à 19 personnes fin 1988 (cf figure 1). Elle se compose aujourd'hui de :

- 5 chercheurs
- 3 étudiants en thèse
- 2 étudiants en DEA
- 1 ingénieur VSN
- 4 techniciens supérieurs
- 2 techniciens de laboratoire
- 1 technicien de serre
- 1 secrétaire

sans compter quatre manoeuvres et observateurs apportant leur concours aux expériences d'acclimatation en Côte d'Ivoire.

L'activité scientifique de l'ensemble de l'équipe est coordonnée par de fréquentes réunions plénières, entre les deux laboratoires de Montpellier, permettant d'exposer et de discuter en commun l'ensemble des travaux réalisés.

Pour la partie du programme réalisée en Côte d'Ivoire, les échanges se font à travers 3 contacts annuels directs (2 en Côte d'Ivoire et 1 à Montpellier) en plus des échanges postaux.

Un fichier bibliographique a été créé. Il comprend aujourd'hui environ 500 références sélectionnées pour leur intérêt vis à vis de nos travaux - (la bibliographie réunie avant 1988 n'a pas pu encore être intégrée) - Il permet à tout un chacun d'accéder en permanence au fond bibliographique de l'ensemble de l'équipe avec mots-clés et résumé.

Conformément au projet scientifique sur lequel nous travaillons, le programme de travail de l'ensemble de l'équipe a été planifié sur trois ans.

Cette première année a donc été consacrée à l'équipement et à la mise en fonctionnement du nouveau laboratoire de la SMH sur 250 m², au recrutement et à la formation d'une douzaine de personnes et surtout à l'organisation des relations au sein de l'équipe pour obtenir une synergie.

Tout ceci s'est fait en parallèle de ce qui constitue l'essentiel : la recherche. De nouveaux axes ont été initiés : métabolisme énergétique, métabolisme hydrique, éclaircissement, enracinement, acclimatation, marqueurs biochimiques de la juvénilité, pH et potentiel redox ; tandis que sont poursuivies les études sur le rajeunissement des clones par greffage en cascade, l'assimilation minérale, les échanges gazeux, influence des phytohormones et du charbon actif, de la température.

Pour certains de ces axes de recherches, notamment ceux qui sont en continuité avec les années précédentes, nous avons déjà obtenus des résultats concrets qui sont justement à l'origine des progrès présentés ici dans la maîtrise de la technique. Pour les autres, nous avons "préparé le terrain" : synthèses bibliographiques sur :

- "l'éclaircissement dans la morphogenèse",
- "les éléments minéraux, macro et oligo-éléments",
- "les différents facteurs agissant sur l'enracinement",
- "le sevrage et l'acclimatation des vitroplants",

études de bases et expériences préliminaires.

En ce qui concerne le matériel végétal, de multiples introductions à partir de la Côte d'Ivoire ainsi que la mise en place d'un plan de gestion très minutieux ont été nécessaires pour approvisionner régulièrement, à partir des 250 m² de serres, une équipe qui a triplé en l'espace de quelques mois.

D'autant plus que, dans le même temps, l'avancement des recherches nous amène à modifier la nature de ce matériel végétal, délaissant progressivement le matériel seedling au profit des clones.

Les progrès réalisés cette année, portent principalement sur la phase de micropropagation d'une part, sur l'acclimatation d'autre part.

- En micropropagation, on est en passe d'obtenir la multiplication indéfinie avec le maintien de la réactivité des souches pendant plus de 5 cultures successives et la production d'une à deux tiges par culture (en moyenne, car il peut y en avoir jusqu'à 6-7 par souche) ; avec également l'amélioration de la réactivité et de la vigueur des souches secondaires avec lesquelles il est maintenant possible de produire des rameaux enracinables pendant plusieurs cultures.

La création de souches primaires et secondaires, la mise au point des séquences de cultures, une meilleure connaissance de l'incidence des différents éléments du milieu nous permettent aujourd'hui d'entrevoir différentes solutions pour "piloter" le développement des cultures selon que l'on veut multiplier les souches ou produire des tiges.

La production, ces derniers mois, de centaines de vitroplants enracinés issus de recyclage de cultures primaires ou secondaires en est la meilleure démonstration.

- En acclimatation, des taux de survie, voisins de 90 %, sont régulièrement obtenus. Le matériel expérimental a été utilisé pour mettre en place le premier champs de microboutures (issues de seedlings) qui permettra de faire des observations sur leur développement aérien et racinaire pendant deux ans.

PREMIERE PARTIE : AVANCEMENT DES RECHERCHES EN 1988

1. CONDITIONNEMENT DES PLANTS-MERES

- * Incidence du potentiel hydrique du sol sur l'état hydrique des plants-mères et le comportement des explants *in vitro*.
 - Nous avons mesuré qu'en augmentant la teneur en eau des sols on affaiblissait la pression osmotique des plants, directement corrélée à une élévation de leur teneur en eau de 10 à 20 %. Cependant cela ne se traduit par aucune différence significative sur le comportement des explants en culture primaire. Le paramètre "arrosage" a donc une influence mineure sur la réactivité des bourgeons axillaires en culture primaire.
- * La température par contre est importante. La reprise de croissance des stumps après plantation est favorisée par un chauffage du terreau entre 30 et 35°C et l'apport d'un engrais riche en phosphore (10-52-10). Par contre, l'apport de substances rhizogènes (type rootone F) est sans effet.
- * Des analyses minérales sur seedlings ont fait apparaître une teneur très élevée en Ca. Cet excès est probablement la cause des carences en certains microéléments (Cu, Mn). Une modification de la fertilisation est en cours pour corriger ces déséquilibres.
- * Essai comparatif de deux systèmes de multiplication (greffage/microbouturage) à partir de jumeaux seedlings, matériel végétal de même génotype et de même âge ontogénétique. Création du matériel végétal à Montpellier, prémultiplication par minigreffage d'un des jumeaux et initiation des cultures primaires pour 20 génotypes. Expédition en Côte d'Ivoire de l'autre jumeau et prémultiplication par minigreffage.
- * L'étude histologique des tiges d'Hevea cultivé en serre montre qu'au stade prélevé pour la culture *in vitro* (fin stade D), l'ensemble des tissus est parfaitement différencié avec notamment un anneau de bois secondaire bien lignifié. Il n'y a aucune différence à ce niveau en fonction du rang de l'unité de croissance.

En dehors de ces expériences spécifiques, l'effort sur le matériel en serre a surtout porté sur les points suivants :

- Gestion du matériel seedling pour permettre un approvisionnement aussi régulier que possible des expériences de culture *in vitro*.
- Augmentation conséquente du parc de pieds-mères pour trois clones PB 235, RRIM 600 et GT1 de façon à porter l'effectif de chacun à 300 pieds pour qu'en 1989 on puisse engager à la fois des expériences de culture *in vitro* et une production de vitroplants à partir de ces clones.

L'étude électrophorétique engagée sur les clones a révélé la présence de "faux" PB 235 non identifié. Après examen systématique de l'ensemble des pieds-mères en serre, 35 plants ont été identifiés conformes ; les 80 autres ont été immédiatement éliminés. C'est donc sur la base de ces 35 PB 235 confirmés que nous reconstituons le parc de 300 pieds-mères.

- Poursuite du rajeunissement par greffage en cascade sur huit clones plantés (PR 107, AUROS 2037, PR 261, PB 217, PB 260, RRIM 712, PB 330 et PB 280) et 4 clones présumés résistants au fomes.

2. MULTIPLICATION INDEFINIE IN VITRO

La culture primaire (effectuée avec des explants prélevés en serre) peut être conduite de deux façons différentes :

- 1 La voie aujourd'hui classique consiste à obtenir un rameau primaire par souche au terme d'une culture sur milieu sans hormone pendant 6 semaines. Cette culture est précédée d'un trempage de deux heures dans une solution contenant AIB et BAP.
- 2 Une voie en cours d'étude fait intervenir un repiquage hebdomadaire sur milieu hormonal, pendant 6 à 8 semaines, dans un but de réactivation du matériel végétal.

La multiplication ou micropropagation est ensuite engagée selon deux voies différentes :

- A L'augmentation du nombre de souches par création de souches secondaires (à partir des rameaux primaires), puis de souches tertiaires (à partir des rameaux secondaires)...
- B La production de tiges par recyclage des souches de différents ordres.

Des progrès considérables ont été obtenus cette année dans la voie 1A avec l'obtention de touffes de tiges sur souches primaires et secondaires au cours de 4 à 6 repiquages successifs. Dans certaines expériences, le matériel se trouve même actuellement en huitième culture, avec un potentiel de production stabilisé d'environ 1,5 tiges par souche et par cycle de culture (un mois).

La voie 2A donne à ce jour des résultats différents sur un plan qualitatif mais qui apparaissent au moins aussi bons que les précédents. On ne dispose cependant pas encore à ce jour du recul nécessaire pour conclure sur l'efficacité globale de la réactivation et pour comparer le bilan (micropropagation et nombre de vitroplants enracinés) à celui de la voie 1A.

Les progrès dans cette phase de culture ont été obtenus pour l'essentiel en manipulant les paramètres suivants :

Hormones : Il ressort que l'alternance de milieux hormonaux (BAP, AIB, GA3) et de milieux d'allongement avec charbon actif est quelquefois préférable à des cultures en continu sur milieux hormonaux. Les milieux d'allongement permettant la croissance des bourgeons réactivés sur milieux hormonaux. Une étude récente semble indiquer que plus le rang de recyclage est élevé, plus le temps de culture sur milieu hormonal, avant passage sur milieu d'allongement, doit être long pour maintenir un certain niveau de réactivité des souches.

Eclairage : Le potentiel de production (nombre de pousses par souche et par cycle de culture) est amélioré en enrichissant l'éclairage avec du rouge lointain (rapport Zeta = 1) à l'aide de lampes à incandescence sous voltées. Cet enrichissement ne doit être fait que pendant la première partie du cycle. Son effet est encore amélioré par l'adjonction de 5 mg/l d'AgNO₃ dans le milieu de culture.

Energie : L'abaissement de la teneur en saccharose à 30 g/l diminue nettement la dégradation des tissus de la souche au profit de leur réactivité au cours de plusieurs cycles de recyclage. L'apport de cytosine a un effet positif du même ordre, peut-être par une amélioration de la qualité des membranes.

Matériel végétal : Un nettoyage de la souche lors de chaque repiquage a un effet favorable, sans doute directement par l'élimination des vieux tissus nécrosés, indirectement en stimulant l'assimilation du milieu neuf sur lequel elles sont repiquées. Dans le même esprit, la division des vieilles souches (6e culture) permet de doubler le coefficient de multiplication en stimulant la réactivité des zones dissociées par rapport à la souche maintenue intacte.

L'origine du bourgeon axillaire dans l'unité de croissance du plant-mère est également importante. Ce sont les bourgeons de feuilles les plus éloignés de l'apex qui réagissent le mieux en culture primaire puis en recyclage de souches. A l'inverse, en culture secondaire (réalisées avec les bourgeons axillaires des pousses primaires), ce sont les bourgeons les plus proches de l'apex qui sont les plus réactifs.

3. DEVELOPPEMENT DES POUSES

Les recherches réalisées ont souvent fait ressortir un antagonisme entre allongement et verdissement. Schématiquement les rameaux allongés ont une architecture proche de celle des rameaux *in vivo* avec bourgeons d'écaillés et de feuilles. Ils ont cependant souvent peu de feuilles, voire une seule grande, ce qui leur confère un port déséquilibré ; qui plus est, ces rameaux sont souvent chlorotiques.

En revanche, les petits rameaux possèdent souvent plusieurs feuilles petites, bien vertes. Cependant, les entre-noeuds courts et leur faible taille handicapent la micropropagation et l'enracinement.

La plupart des paramètres de culture étudiés influent sur l'un ou l'autre de ces caractères morphologiques :

3.1. H2O

Le potentiel hydrique du milieu de culture primaire est beaucoup plus négatif que celui des explants venant de subir plusieurs heures de trempage (désinfection + induction) dans des solutions à potentiel hydrique proche de 0.

L'apport de saccharose, jusqu'à 80 g/l, dans la solution d'induction par trempage (2 h) à un effet nettement positif sur la qualité et l'allongement des pousses primaires. Le saccharose étant efficacement remplacé par le PEG (osmoticum), on vérifie que ce sont bien les échanges milieu de culture-explant, liés au métabolisme de l'eau, qui sont en cause.

L'augmentation de la teneur en saccharose, dans les milieux de culture primaire ou secondaire (60 à 100 g/l) stimule l'allongement et l'accroissement en diamètre des tiges.

Le remplacement du saccharose par un osmoticum tel que le mannitol ou le PEG entraîne une dégradation des cultures attribuable à un effet phytotoxique de ces produits.

Des cultures primaires et secondaires ont été obtenues en milieu liquide stable ou renouvelé tous les trois jours sur support micromottes de cellulose. Les résultats sont comparables à ceux obtenus sur milieux gélosés.

3.2. Echanges gazeux

On avait montré précédemment que l'utilisation de bouchages non hermétiques améliore la qualité des rameaux et, au niveau histologique, la différenciation des différents tissus.

Une étude histologique approfondie a été faite mettant en évidence, chez des cultures de bonne qualité, une dégradation progressive des tissus de la souche (accumulation de polyphénols, bouchage des vaisseaux conducteurs, éclatement des tissus périphériques) tandis que chez les rameaux, on note une différenciation précoce de tous les organes, notamment les méristèmes axillaires, conduisant dès le 30e jour de culture à une structure conforme à celle du rameau *in vivo*. Cependant, les parois cellulaires sont très faiblement lignifiées, les parenchymes foliaires et les stomates sont mal différenciés. Le vieillissement de la culture ne modifie pas ces caractères mais entraîne une accumulation d'amidon dans la souche et le rameau.

Par contre, chez les tiges anormalement développées (tissus chlorotiques, limbes foliaires non développés), on note un fonctionnement normal des méristèmes mais une perturbation du métabolisme entraînant une mauvaise différenciation des tissus conducteurs des tiges, une lignification à peine perceptible, un dérèglement du métabolisme glucidique avec engorgement d'amidon au niveau de la souche alors qu'il reste absent dans la tige.

On a vérifié que l'instauration d'échanges gazeux passifs (bouchage non hermétique) augmente l'absorption de l'ensemble des éléments minéraux notamment K^+ et Ca^{2+} . Si le milieu de culture le permet, cette absorption se traduit par une augmentation de la teneur en Ca^{2+} dans les feuilles du vitroplant. Des observations histologiques ont montré que cette absorption en Ca^{2+} s'accompagne d'une meilleure lignification des parois et s'oppose à l'accumulation exagérée de l'amidon dans les tissus.

Le renforcement des échanges gazeux par l'injection d'air renouvelé en continu avec une RH régulée à 85 % n'entraîne pas de modifications appréciables à l'oeil nu de la morphologie des rameaux ou de la réactivité des souches. Néanmoins, au niveau histologique, on note une différenciation accrue des tissus, surtout ceux des feuilles avec différenciation des parenchymes palissadiques et lacuneux, des stomates, modification de l'aspect des chloroplastes et accumulation d'amidon.

3.3. Alimentation minérale

Faisant suite aux diagnostics foliaires réalisés précédemment sur rameaux *in vitro*, les expériences ont eu pour objectif de préciser l'influence des variations dans les teneurs endogènes en Ca^{2+} , Na^+ et Cl^- des pousses sur leur qualité d'une part, sur leur capacité de multiplication d'autre part.

La teneur en Ca^{2+} dans les feuilles a été doublée par une augmentation en Ca^{2+} du milieu de culture (de 2 à 8 meq.l⁻¹) simultanément à une diminution du rapport NH_4^+/NO_3^- (de 0,9 à 0,1) et enfin à une augmentation des échanges gazeux par un bouchage plus perméable.

Cet enrichissement en Ca^{2+} s'est traduit par une amélioration de la qualité des pousses (feuillage équilibré et vert) tant chez des cultures de seedlings que chez des cultures de PB. 235 dont le poids du feuillage a été multiplié par 5.

La diminution de la teneur en Na^+ (de 5 à 1 meq.l⁻¹) et en Cl^- (de 3 à 0,2 meq.l⁻¹) n'a pas d'effet positif sur la qualité du feuillage et affecte l'allongement des pousses, malgré l'accumulation "anormale" observée précédemment au fil des cycles de culture dans les vitroplants. Ceci témoigne de ce que les normes *in vivo* ne doivent pas systématiquement servir de modèle pour la micropropagation.

En revanche, cette stimulation de l'assimilation du Ca n'est pas favorable à la réactivité des explants secondaires en phase de multiplication. De plus, l'utilisation de très basses concentrations en Na^+ (0,4 - 1 meq.l⁻¹) associée aux fortes concentrations en Ca^{2+} (11 meq.l⁻¹) est nettement défavorable en phase de multiplication.

Pour répondre au problème des chloroses plus ou moins accentuées des rameaux *in vitro*, surtout ceux des cultures secondaires, 7 différentes sources d'apport en fer ont été testées dans le milieu de culture secondaire (Fe-EDTA, Fe SO₄, citrate ferrique, Veronia[†], Hampiron[†], Ferlate[†] et sequestrène - [†]produits du commerce). Le sequestrène (200 µM, Fe-EDDHA) améliore très nettement la qualité des rameaux (feuillage équilibré et très vert) par rapport à Fe-EDTA. Cet effet a lieu cependant au dépend de l'allongement des tiges qui sont plus courtes.

3.4. Substances organiques

Aucun effet positif net n'a été observé (réactivité des souches ou qualité des pousses) par l'adjonction au milieu de culture des diverses substances suivantes : Tryptophane, D.x. Tocophérol, hydrolysate de caséine, riboflavine, thiamine, glutamine.

3.5. Eclairage

L'apport complémentaire d'un éclairage incandescent a permis d'obtenir un rapport Zeta = 1 (Rouge clair/Rouge lointain) proche des conditions naturelles par rapport au rapport Zeta = 5 obtenu sous éclairage fluorescent classique. Par l'intermédiaire du phytochrome intervenant dans différents métabolismes dont celui de l'AIA endogène, on a obtenu une nette stimulation de l'allongement des pousses sur souches primaires et sur souches secondaires. Ce traitement ne doit cependant être appliqué que pendant la première moitié du cycle de culture (15 jours) sous peine d'affecter la qualité des rameaux (chloroses).

3.6. Indexation des cultures

L'indexation systématique du matériel mis en culture (milieu levure + peptone à 5 g.l⁻¹ et glucose-agar à 10 g.l⁻¹) et l'élimination du matériel révélé contaminé permet d'obtenir des cultures saines indéfiniment. Cependant, la majeure partie de l'équipe n'utilise pas encore cette technique, n'ayant aucun problème notable de contaminations au delà des deux premières cultures.

4. ENRACINEMENT

La technique utilisée jusqu'à aujourd'hui a été mise au point pour l'enracinement des rameaux issus de culture primaire.

La mise au point progressive de la micropropagation nous amène maintenant à produire des rameaux différents par leur morphologie (en général plus petits) et surtout par leur état physiologique puisque les conditions de culture dont ils sont issus sont différentes.

Si les recherches en micropropagation s'attachent essentiellement à la production de pousses et à la réactivité des souches, il convient à ce niveau de réétudier les conditions de culture précédant la mise en enracinement des rameaux (conditionnement), celles nécessaires à l'induction et au développement des racines et enfin les conditions minimales d'endurcissement *in vitro* nécessaires à une bonne reprise de croissance des vitroplants après le sevrage.

4.1. Conditionnement

4.1.1. Température

Le transfert des tiges pendant 2 à 4 semaines à 18°C a été envisagé comme traitement de "maturation" pour stimuler la différenciation des tissus de tiges et améliorer ultérieurement l'enracinement et le sevrage. L'expérience n'a pas permis de vérifier cette hypothèse (pas d'effet marqué ni positif, ni négatif) et l'étude histologique n'a montré aucune modification particulière des tissus si ce n'est :

- Une légère accumulation d'amidon dans le bois et les cellules de la moelle proche du bois (ce caractère se retrouve chez les tiges *in vivo*) en opposition avec une accumulation intense dans tous les tissus chez les tiges maintenues à 28°C en présence d'un fort éclaircissement ($220 \mu\text{Mole.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

- Le niveau de lignification évolue très peu et reste toujours très faible quelle que soit la température.

Le "vieillissement" des rameaux, par un prolongement d'une à deux semaines du temps de culture utilisé couramment avant l'enracinement, ne trouve donc pas d'explication au niveau histologique.

La culture au froid (18°C) pendant quelques semaines est cependant utilisable pour la conservation en vie ralentie des cultures.

4.1.2. Réactivation du matériel végétal

Ce thème a également été abordé par l'utilisation du matériel traité en réactivation (voie 2A souches primaires et 2B souches secondaires). Les premiers résultats font état d'une amélioration de l'homogénéité et surtout de la précocité d'enracinement avec ce type de matériel.

4.2. Induction et développement racinaire

4.2.1. Matériel végétal

Une blessure pratiquée sur la base des tiges avec application directe d'auxino-mimétique s'avère aussi efficace qu'un trempage de trois jours dans une solution hormonale.

4.2.2. Support

Le support gélosé est à proscrire pour l'induction rhizogène. Par contre, pour le développement racinaire, il est actuellement impossible de départager le support Grodan et le milieu gélosé. Les mottes Hortifibre (sciure de bois) et Cultilène (fibre de verre) donnent, quant à elles, des résultats négatifs.

4.2.3. Milieu minéral

La dilution du milieu minéral (macro-éléments, selon Lepoivre, divisés par 8) permet un fort taux d'enracinement (95 %) et stimule l'initiation de plusieurs racines par tige (2 à 3).

4.2.4. Hormones

Une concentration totale de 3-4 mg/l et un rapport molaire AIB/ANA = 1 ou 2 est préférable en induction par trempage de 3 jours.

La plupart de ces résultats sont récents ; ils devront donc être confirmés par des répétitions et par l'appréciation du développement des vitroplants en acclimatation. Ils constituent des orientations à approfondir à l'avenir.

5. PRODUCTION

Environ 2 500 vitroplants enracinés ont été produits cette année. La plupart ont été expédiés sur la Côte d'Ivoire pour expériences d'acclimatation. Une seule des 13 expéditions a été endommagée au cours du transport (perte du colis chez le transitaire).

Il est important de noter qu'au début de l'année l'ensemble du matériel provenait de cultures primaires, alors que ce type de matériel a quasiment disparu des dernières expéditions, remplacé par des rameaux issus de souches primaires en recyclage ou de souches secondaires.

Pour les clones, une trentaine de vitroplants enracinés de RRIM 600 ont été produits dont 20 ont été acclimatés avec succès dans les serres à Montpellier.

Pour le PB 235, une centaine de vitroplants ont été produits. Mais, en fonction de l'incertitude qui pesait sur leur origine (vrai ou faux), tous ont été éliminés.

6. ACCLIMATATION

Les expéditions de vitroplants se font par colis chronopost (4 à 5 jours). Ils sont conditionnés individuellement (tubes polyéthylène) lorsqu'ils sont enracinés sur mottes Grodan ou bien ils sont en vrac, à racines nues, dans des boîtes hermétiques, pour les plants enracinés sur gélose.

6.1. Sevrage

6.1.1. Contaminations

Dans la mesure où le matériel (mini-serre de confinement) est bien désinfecté, il n'est pas indispensable de traiter le terreau de façon préventive. Par précaution, ou en cas de développement fongique, on incorpore du Fongaride dans le substrat et on pulvérise les vitroplants une fois par semaine avec du Benlate.

6.2.2. Stade de développement des racines

Initialement le sevrage était effectué après 4 à 8 semaines de développement racinaire *in vitro*.

La réalisation du sevrage trois semaines seulement après l'induction racinaire, c'est-à-dire avant que les racines soient visibles hors de la motte Grodan, a permis d'améliorer de 20 à 30 % le rendement global des phases enracinement sevrage. En outre, cette pratique supprime les coudes racinaires formés au fond des tubes, et c'était là l'objectif initial.

6.2.3. Substrat de repiquage

Différents mélanges ont été testés incluant ou non des produits locaux (fibre de coco, sols de pépinières, débris de café). Ces produits augmentent en général les risques de contamination et leur structure grossière s'accorde mal avec la petite taille des vitroplants. C'est donc un mélange tourbe-terreau-perlite (6-2-2 vol/vol) ou tourbe-perlite (8-2 vol/vol) qui est retenu.

D'autres paramètres tels que : durée de la phase de confinement, substrat de repiquage, température, fertilisation ont été abordés de façon relativement empirique sur la base des résultats obtenus, des études plus systématiques ont été engagées dès la fin de l'année et seront poursuivies en 1989.

Un champs d'1,5 ha a été planté avec 768 vitroplants. Il permettra, dans les deux premières années, d'affiner les techniques d'observation du développement aérien et racinaire de ce nouveau type de matériel végétal.

Les résultats enregistrés seront mis en relation avec :

- La date de plantation (juin et septembre),
- L'âge des vitroplants, depuis leur sortie de tube, au moment de la plantation,
- Les traitements subis en enracinement ou au cours de l'acclimatation.

Déjà, on a pu tirer une conclusion nettement négative sur les mottes Milcap (fibres de moquettes cousues). Bien qu'ayant donné de bons résultats en enracinement et en acclimatation, ces mottes, totalement imputrescibles, s'opposent à la croissance en diamètre du collet. Il en résulte un étranglement qui diminue la croissance du système racinaire (plants déracinés par le vent) et provoque, à plus ou moins court terme, la mort du plant.

Cette expérience permet de préparer les protocoles des futurs essais comparatifs entre la multiplication classique par greffage et cette nouvelle méthode de micropropagation.

b) Paramètres étudiés

- Différents niveaux de prélèvement sur seedlings de 1 an.
- Composition en protéines totales - zymogrammes de divers systèmes enzymatiques (estérases, peroxydases, amylases, phosphatases, acides...) sur feuilles et sur latex.

V. Haffner / E. Miginiac - M.-P. Carron - Y. Fouret - L. Lardet

* *Recherche de marqueurs biochimiques et cytologiques de la réactivité des explants lors des différentes phases du microbouturage*

a) Paramètres étudiés

- Teneurs endogènes en régulateurs de croissance (ABA, AIA, ZR, IPA, Gibb), en Glucides (saccharose, glucose, fructose, amidon) en éléments minéraux (N, P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Mn, Zn, B), composés phénoliques, anthocyanes, protéines solubles et insolubles, acides nucléiques (ARN).
- Histo-cytologie : taille et morphologie du dôme méristématique, taille et nombre des cellules méristématiques, caractéristiques structurelles et biochimiques des cellules (épaisseur des parois, taille du noyau, rapport nucléo-cytoplasmique, présence d'amidon, polyphénols protéine, lignine...).

b) Matériel végétal

Le choix de ces types de matériel végétal a été fixé à partir de nos connaissances sur leur réactivité *in vitro*.

- Sur clone, comparaison de branches en plantation et de rejet greffé de matériel rajeuni.
- Comparaison de la première unité de croissance d'un rejet de stump avec la troisième ou la quatrième UC.
- Evolution des caractéristiques des apex de jeunes seedlings chez la première unité de croissance, la seconde et le rejet cotylédonnaire.
- Evolution des caractéristiques du matériel végétal entre la mise en culture et la n^{1^{ème}} subculture.

F. Daayf / J. d'Auzac - F. Enjalric

* *Incidence du pH et du potentiel redox du milieu de culture sur la micropropagation : relations avec l'alimentation minérale et l'oxydation des tissus*

a) Matériel végétal

- Evolution du pH et du potentiel redox au cours de la culture et au fil des subcultures,
- Utilisation de milieux tamponnés,
- Modifications du potentiel redox par incorporation d'agents à pouvoir réducteur ou oxydant.

b) Paramètres étudiés

- pH et potentiel redox du milieu,
- Alimentation en sucres et éléments minéraux,
- Teneurs en phénols et phénols oxydés.

H. Begin / A. Coudret - M.-P. Carron

* *Etude du métabolisme de l'eau chez les vitroplants*

a) Paramètres étudiés

- Mesures par microcalorimétrie de la teneur en "eau-libre" par rapport à "l'eau-liée" au niveau des bourgeons axillaires, en tant que marqueur d'activité potentielle de ces organes,
- Etude de la structure des stomates et de leur fonctionnement potentiel.

b) Matériel végétal

- Cultures primaires et secondaires.

E. Auboiron / J. d'Auzac - M.-P. Carron

* *Incidence de la teneur en O₂, CO₂, C₂H₄ et H₂O de l'atmosphère et des caractéristiques hydriques du milieu sur le développement des cultures*

- Conditionnement de l'explant primaire par modification de son potentiel hydrique avant mise en culture,
- Modification du potentiel hydrique du milieu de développement des rameaux et du milieu de multiplication,
- Mise au point d'un système de culture sans repiquage en milieu liquide renouvelé,
- Incidence du renouvellement de l'atmosphère gazeuse, culture en conditions confinées, en échanges gazeux passifs, en échanges gazeux forcés.

En collaboration avec F. Enjalric

* *Stimulation d'un métabolisme hétérotrophe (phase de multiplication) ou, au contraire, d'un métabolisme autotrophe (endurcissement) par interventions conjuguées sur la teneur en sucre du milieu, le niveau d'éclairement, la teneur de l'atmosphère en CO₂ et en O₂*

- Variation de la concentration en sucre des milieux sous atmosphère enrichie en CO₂,
- Conjugaison de différents niveaux de CO₂ et différents niveaux d'éclairement,
- Cultures sous atmosphères privées de CO₂,
- Cultures sous atmosphère renforcée en O₂ pour favoriser la respiration et l'hétérotrophie.

L. Lardet / F. Angevain* *Rejuvenilisation du matériel clonal par microgreffage in vitro :*

- Incidence du stade de croissance du greffon par rapport au stade de croissance du porte-greffe,
- Prétraitement du greffon et du porte greffe,
- Greffage en tête par rapport à greffage en fente latérale,
- Définition des conditions d'intégration en micropropagation du matériel rajeuni dans ces conditions :
 - . Utilisation directe du microscion "rajeuni" par microbouturage ou culture d'apex,
 - . Sevrage des vitroplants greffés pour établissement de pieds-mères rajeunis.

* *Optimisation de la réactivité des explants primaires en fonction du stade de croissance des rameaux à prélever** *Conditionnement des explants primaires par prétraitement hormonaux sur les plants-mères** *Etude des séquences de culture en distinguant l'objectif multiplication de celui allongement des pousses, avec les principales orientations suivantes :*

- Augmentation des doses d'hormones fournies en début de cycle, mais diminution du temps de contact,
- Apport d'hormones en fin de chaque cycle de culture, après allongement des pousses mais avant recépage,
- Apport non systématique de charbon actif dans le milieu d'allongement,
- Utilisation de substances à fort pouvoir cytokinique telles que le thidiazuron.

* *Poursuite de l'étude sur l'alimentation minérale avec notamment :*

- Rôle du phosphore en cultures secondaires et recyclage de souches primaires,
- Rôle de trois micro-éléments indispensables : Zn, Mn, B,
- Suivi de l'évolution de la situation minérale des souches au fil des recyclages,
- Optimisation de l'équilibre minéral des rameaux vis à vis de leurs potentialités rhizogènes et de leur comportement ultérieur en acclimatation.

F. Enjalric / M. Bes* *Dans le cadre du métabolisme énergétique :*

- Etude des besoins spécifiques en sucre de la phase de multiplication d'une part, de la phase d'allongement d'autre part - Avec recherche d'une stimulation de l'autotrophie avant l'enracinement et surtout le sevrage,
- Confirmation de l'efficacité de la cytosine en tant qu'accélérateur du métabolisme cellulaire.

Y. Fouret / A. de Sartiges

La stratégie adoptée pour la conduite des cultures nous amène à envisager d'effectuer le sevrage quelques jours seulement après l'induction racinaire. Il est alors nécessaire de superposer la phase d'endurcissement des rameaux avant sevrage à celle du conditionnement avant enracinement.

* *Interventions sur la culture précédant le prélèvement des rameaux pour enracinement*

- Durée de la culture,
- Potentiel hydrique du milieu,
- Concentration en gélose,
- Abaissement de l'humidité relative en fin de culture,

* *Poursuite des traitements de réactivation du matériel végétal par repiquage hebdomadaire sur milieu hormonal pendant 6 à 8 semaines en début de culture*

* *Interventions sur le matériel végétal lui-même*

- Dimensions du rameau,
- Stade de croissance au moment de l'induction racinaire,
- Positionnement de la base du rameau par rapport aux bourgeons axillaires.

* *Induction racinaire*

- Confirmation de l'efficacité de l'induction directe ; amélioration de la technique,
- Etude du rapport AIB/ANA,
- Intérêt d'une phase obscure pendant l'initiation racinaire.

* *Développement racinaire*

- Support de culture : Comparaison du support gélosé avec le milieu liquide sur micro-motte Grodan,
- Dilution de la solution minérale - rapport N/P,
- Apport d'éléments organiques tels que la vitamine D₂,
- Etude histologique de l'enracinement.

M.-P. Carron / M. Lartaud

* *Les deux objectifs principaux sont :*

- Production de vitroplants pour les expériences d'acclimatation et les essais en champs menés en Côte d'Ivoire,
- Intégration progressive dans le système de culture et test à l'échelle de la production des progrès pratiques obtenus,

* avec des expériences propres telles que :

- Adaptation des récipients de culture aux contraintes de la production et de l'expédition de matériel,
- Raccourcissement du temps de développement racinaire en laboratoire jusqu'à suppression complète et sevrage direct après induction rhizogène.

* Dans le cadre de la production, il est prévu pour l'année :

- Fourniture de 3000 à 5000 vitroplants pour expériences acclimatation,
- Fourniture de 3000 à 5000 vitroplants issus d'expériences enracinement pour suivi en acclimatation,
- Fournitures de 1500 vitroplants issus de 20 géotypes pour premier essai comparatif greffage/microbouturage sur 4 ha (BM-OM2),
- Production de 50 à 100 vitroplants de deux clones présumés résistants au Fomes pour test phytopathologie,
- Initiation production de vitroplants à partir de deux clones en classe 1 (PB 235) et 2B (RRIM 600) pour plantation de champs comparatifs en 1990.

C. Drenou

a) Sevrage

Il désigne une période d'environ 2 à 3 semaines (actuellement) après la sortie de tube des vitroplants. Cette période est destinée à endurcir les plants vis à vis surtout des stress hydriques et des risques d'attaques fongiques auxquels ils sont très sensibles en raison de la fragilité de leurs tissus.

Cette période débute par un confinement en serre-châssis (1 à 2 semaines) puis les plants sont progressivement soumis à l'atmosphère normale de la serre-tunnel. La croissance aérienne et racinaire des vitroplants reprend dans le substrat de sevrage. Ils forment pendant cette étape une nouvelle UC d'environ 2 à 3 cm.

b) Le forçage

Il correspond à une sorte de super-pépinière destinée à stimuler la vigueur de plants par un environnement physico-chimique approprié pour compenser l'absence quasi-totale de réserves, en opposition notamment aux seedlings.

La durée de cette phase a été fixée (un peu arbitrairement) aux temps nécessaire pour la formation de deux nouveaux étages (UC).

Il faudra notamment éviter l'écueil de confondre vigueur et hauteur des plants, ce qui amènerait la formation de plants étiolés, difficiles à établir en champs ultérieurement.

Au contraire, les critères de vigueur seront à rechercher dans le diamètre du collet et le développement du système racinaire (diamètre des racines, masse totale). Cette culture se déroule entièrement dans la serre-tunnel en conditions semi-contrôlées.

Etude sur les conditions de sevrage puis de croissance-forçage (3 à 4 mois après la sortie de tube)

* *Alimentation minérale*

- Evolution de l'équilibre minéral des plants après la sortie du tube (diagnostic foliaire),
- Fertilisation des vitroplants :
 - . Délai entre la sortie de tube et le premier apport,
 - . Nature de l'apport : - engrais soluble par arrosage,
 - engrais incorporé au substrat,
 - engrais à libération lente,

* *Composition du substrat*

- Nature des composants (tourbe, terreau, perlite, sable, terre de plantation),
- Analyses granulométrique et chimique des mélanges.

* *Protection phytosanitaire*

- Incorporation de fongicides dans le substrat,
- Périodicité et nature des pulvérisations de fongicides.

* *Recherche des conteneurs les mieux adaptés vis à vis de l'architecture et en fonction de la durée de chaque phase de culture*

* *Evolution des caractéristiques morphologiques et histologiques du matériel végétal :*

- Mesure de la résistance à la perte en eau des feuilles,
- Observations sur la structure et le fonctionnement des stomates.

* *Intervention sur la composition de l'atmosphère :*

- Contrôle de l'humidité relative, détermination de la durée minimale de confinement ; puis des conditions d'un passage graduel à l'atmosphère ambiante
- Stimulation de l'antotrophie par augmentation de l'intensité lumineuse et enrichissement en CO₂

* *Contrôle des apports en eau, équilibre entre le développement de l'appareil aérien et celui du système racinaire.*

A. Leconte

a) Phase de pépinière

Elle fait suite au forçage et est destinée, d'une part, à endurcir les plants avant le transfert en champs, d'autre part, à continuer une phase d'attente jusqu'à la période de plantation.

- * Intensité de la fertilisation les trois premières années
- * Intérêt d'un fractionnement des apports au cours de l'année (2 à 12 apports/an)
- * Essais multilocaux - réalisation des phases de forçage, pépinière et mise en champs sur le site d'Hevego (Sud Ouest de la Côte d'Ivoire)
- * Observations sur développement aérien et racinaire du premier champs de vitroplants mis en place en 1988
- * Mise en place de l'essai comparatif (BMOM2) greffage/microbouturage avec 20 géotypes seedlings - Deux dates de plantation : juin et septembre.