LA CULTURE DES TISSUS APPLIQUEE AU GENRE PINUS

Mme F. MONDEIL *

Les méthodes classiques de sélection et d'hybridation ont permis d'obtenir des arbres meilleurs en croissance, en port, et en résistance aux maladies, mais le temps de génération de ces arbres est si long et leur nombre si faible qu'ils ne pourront plus subvenir aux besoins de plus en plus croissants en bois et en pâte à papier.

Développer une technique économique de propagation des meilleurs arbres, généralement difficiles à multiplier de façon végétative par les méthodes courantes de greffage et de bouturage, est devenu aujourd'hui un des plus pressants problèmes auquel est confronté le forestier.

Pour cette raison, nous avons récemment étudié les possibilités de la culture des tissus pour propager les arbres d'élites du genre Pinus. Déjà, plusieurs espèces de feuillus avaient été reproduits, un peu partout dans le monde, en laboratoire, à partir de cals indifférenciés et maintenus sous des conditions aseptiques pendant plusieurs mois ; mais jusqu'à ce jour, toutes les tentatives pour reproduire les conifères par cette méthode n'ont abouti qu'à des cas isolés. Notre objectif est avant tout d'essayer de déterminer les différences de comportement qui peuvent exister entre les segments de tiges et les bourgeons fasciculaires d'aiguilles en culture « in vitro » et les possibilités de régénérer de jeunes pousses, des racines ou des plantes entières par cette technique.

1 — *HISTORIQUE*

HABERLANDT est certainement le père de la culture des tissus appliquée aux plantes, grâce à son idée de considérer la cellule végétale comme unité de base pour reconstituer une plante. Dès 1898, il réussit à isoler des cellules de feuilles et à les maintenir en vie pendant plusieurs semaines à l'Université de Berlin. Malheureusement, la nutrition des plantes n'était pas bien comprise à l'époque, et HABERLANDT n'arrivait plus à assurer la division de ses cellules qui finirent par mourir.

---

* Docteur Ingénieur. Chef de la division Génétique Forestière. DRFP AMBATOBE.

Ce n'est que 60 années plus tard que l'on réussit à démontrer la capacité d'une cellule à se développer en une plante entière. Les premières cultures d'organes furent réportées en 1922 indépendamment par KOTTE et ROBBINS, qui réussirent à faire multiplier des pointes racinaires. Mais ce ne fut qu'en 1939 que la culture de tissus fut véritablement acquise indépendamment par GAUTHERET, NOBECOURT et WHITE sur les tissus de tabac et de carotte.

En 1934, GAUTHERET tenta de cultiver des organes d'Abies et de Pinus mais sans succès. JACQUIOT fut également un des pionniers de la culture des tissus d'arbre en travaillant sur les feuillus comme l'orme, le bouleau et le peuplier.

BALL en 1950, fut le premier à obtenir de jeunes pousses feuillées à partir de conifère. Ce ne fut pourtant qu'en 1957 que SKOOG et MILLER découvrirent que la différenciation des organes était contrôlée par un équilibre entre auxine et cytoquinine.

A partir de 1969, la liste des chercheurs appliquant la technique de culture « in vitro » chez les arbres s'est allongée et de nouvelles citations continuent à apparaître. Les feuillus restaient les plus étudiés mais les succès restent encore très limités. En 1970, WINTON parvint à régénérer des plantes entières à partir de cals de Populus tremuloides.

En 1976, BOULAY en cultivant des apex de Douglas, obtint des plantules feuillées et racinées mais à condition que les pieds mère ne dépassent pas l'âge de 2 ans.

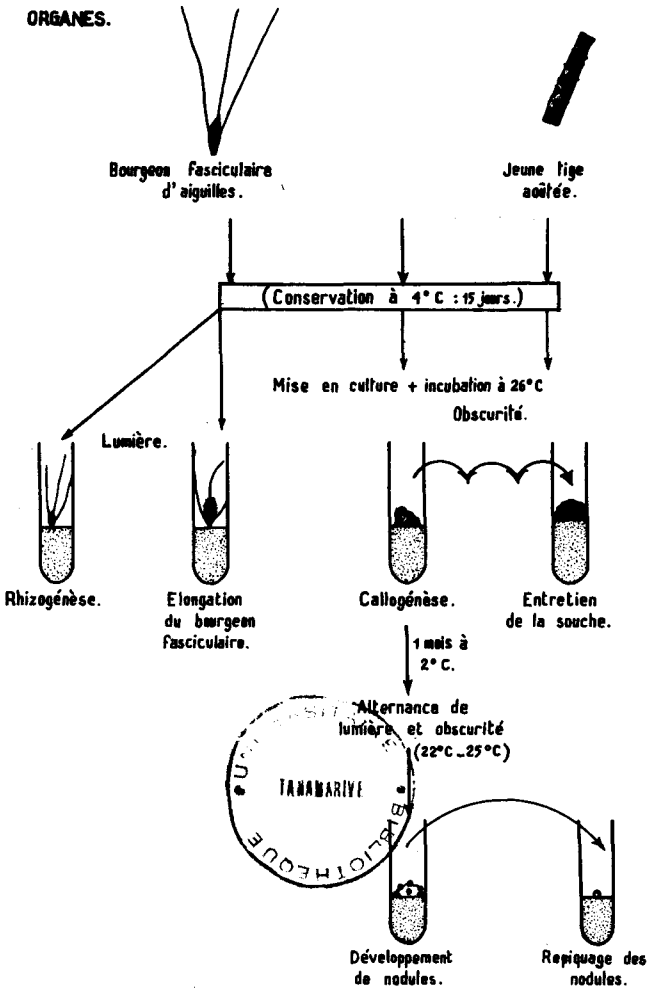
Aucune autre formation d'organes n'a été reportée dans la littérature sur le genre Pinus.

Quoi que cette méthode ne soit pas encore exécutable à l'échelle industrielle, les potentialités d'une propagation clônale à partir de cals indifférenciés la rend valable et elle est de plus en plus exploitée comme terrain d'investigation car elle permettrait de mobiliser rapidement les gains génétiques les plus importants

2 — *MATERIEL VEGETAL*

Les bourgeons fasciculaires d'aiguilles de deux espèces de pins cultivées à grande échelle à Madagascar constituent l'essentiel de notre matériel. Il s'agit du Pinus kesya et du Pinus caribæa. L'induction de ces bourgeons nécessite l'écimage préalable de jeunes individus. Mais après deux récoltes, les arbres doivent subir un élagage sévère pour favoriser de nouvelles inductions de bourgeons.

Fig. 1


ORGANES.
Bourgeon fasciculaire d'aiguilles.
Jeune tige aoûtée.
(Conservation à 4° C : 15 jours.)
Mise en culture + incubation à 26°C
Obscurité.
Lumière.
Rhizogénèse.
Elongation du bourgeon fasciculaire.
Callogénèse.
Entretien de la souche.
1 mois à 2° C.
Alternance de lumière et obscurité (22°C-25°C)
Développement de nodules.
Repiquage des nodules.

Une autre partie du matériel comprend de jeunes tiges aoûtées, récoltées sur ces mêmes individus.

3 — *METHODES DE TRAVAIL*

Les étapes successives de l'expérimentation sont reportées en Fig. 1.

31. — *Prélèvement et conservation du matériel végétal*

Les bourgeons fasciculaires sont récoltés avec leur brachyblaste lorsqu'ils atteignent une longueur de 0,5 à 1 cm. Leur base est immédiatement trempée dans un récipient d'eau et ils sont conservés ainsi pendant 15 à 20 jours au réfrigérateur (4° C). Au terme de ce laps de temps, leur base est obstruée par de la résine, ce qui facilite la stérilisation.

Quant aux jeunes tiges aoûtées leur prélèvement s'effectue au début du durcissement de la pousse de l'année. Elles sont également conservées au froid (4°C) dans du papier filtre humidifié pendant 15 jours pour favoriser l'exsudation de la résine.

32. — *La stérilisation*

Il s'agit d'une stérilisation en surface donc n'atteignant pas les vaisseaux. Elle consiste en une série de traitements par immersion complète et pour des durées variables dans de l'eau savonneuse (simple passage), de l'éthanol à 95° (10 secondes), de l'hypochlorite de sodium à 5 % (10 à 20 minutes) additionné d'un mouillant, le Tween 20 % d'un rinçage à l'éthanol absolu et de trois minutieux rinçages dans de l'eau distillée, stérilisée par un passage à l'autoclave.

Avant de subir ces différents traitements, les aiguilles de brachyblastes sont sectionnées sur une hauteur de 2 cm, et les jeunes tiges aoûtées débarrassées de toutes leurs aiguilles. Notons qu'à chaque trempage, le récipient contenant le matériel végétal est vigoureusement secoué pour permettre au produit d'atteindre les parties cachées.

33. — *La mise en culture*

Les bourgeons fasciculaires d'aiguilles sont :

— soit immédiatement repiqués sur le milieu de culture,

— soit d'abord débarrassées de la résine et de la portion d'écorce qui restait accrochée à la base des brachyblastes.

Les jeunes tiges sont débitées en sections de 0,5 cm, débarrassées de l'écorce et du liber avant d'être placées à plat sur le milieu de culture.

Ils sont alors mis à incuber sous différentes conditions.

	Matériel végétal	Eclairement (lampes fluorescentes	T° C
Condition 1	bourgeon/tige	16 h	26 ± 1
Condition 2	bourgeon	16 h	26 ± 1
Condition 3	bourgeon/tige	obscurité	18 ± 1
Condition 4	bourgeon	obscurité	18 ± 1

L'humidité du milieu ambiant est assurée par des récipients d'eau placés dans l'incubateur, et renouvellés toutes les semaines.

34. — *Les milieux de culture*

Nous ne portons ici que les milieux de culture qui ont d'une part assuré la meilleure formation de cal, ainsi que l'induction de nodules, bourgeons et racines, et d'autre part permis l'entretien du matériel tissulaire.

a) — *Milieu induisant la formation de cals* (milieu modifié de WINTON)

— *Milieu de base*

- — Micro-éléments de MURASHIGE et SKOOG (1962)
- — Micro-éléments de WINTON pour conifère (1972)
- — Vitamine de WINTON pour conifère (1972)
- — Fer éthyldiaminotétracétique (Fe-EDTA).

— *Additifs*

- — Asparagine : 10 p. 1000
- — Inositol : 1 p. 1000
- — Polyvinylpirolidone : 3 p. 1000
- — Saccharose : 30 p. 1000
- — Agar : 8 p. 1000

— *Substances de croissance*

- — Benzyl adénine (BA) : 0,1 mg/litre
- — Acide naphtalène acétique (NAA) : 3.10^{-3}
- — Le pH varie entre 5,6 et 5,9.

b) — *Milieu d'entretien des cals* (milieu IIIw)

— Milieu de base
— Saccharose : 30 p 1000
— Agar : 6 p. 1000
— Polyvinylpirolidone : 3 p. 1000
— NAA : 10^{-4}
— BA : 10^{-4}

Le pH varie entre 5,5 et 5,8.

4 — *RESULTATS EXPERIMENTAUX*

41. — *Formation de cals*

Une étude phénologique menée parallèlement à nos essais « in vitro » nous indique que les bourgeons récoltés au moment de la montée de sève sont plus aptes à la culture « in vitro ». La croissance rythmique constatée sur des pins situe cette période aux mois d'Août à Octobre et de mi-Novembre à Mars pour le Pinus kesiya, et aux mois d'Octobre à Décembre et de Mai à Juin pour le Pinus caribæa. Au-delà de ces périodes les bourgeons atteignent leur élongation complète et sont trop gorgées de sève pour pouvoir supporter la conservation et la mise en culture.

Quant aux jeunes tiges aoûtées, le meilleur moment de la récolte se situe en Novembre pour le P. kesiya et en Décembre-Janvier pour le P. caribæa. Plus tard, les pluies tropicales favorisent le développement des bactéries, ce qui accroît les risques de contamination.

Quel que soit le matériel végétal, la production de cals est plus rapide à l'obscurité et à 26° C. La couleur du cal est généralement blanche mais sa texture peut être ferme ou friable. Lorsqu'il sont friables, leur croissance est rapide et ils peuvent être isolés de l'explantat et repiqués au bout de 2 mois (cf. Tableau 1).

Les cals obtenus avec 16 heures d'éclairement et à 26° C sont généralement verts : de texture généralement ferme au départ, le cal peut devenir friable au fur et à mesure de la multiplication des cellules.

A 18° C, les cals varient du blanc au marron. Toujours de texture ferme, leur croissance est plus lente.

Les bourgeons de brachyblastes manifestant en général une plus grande aptitude à former un cal, nous avons quelque peu délaissé les tiges aoûtées.

TABLEAU 1

Numération des cals après 2 mois de culture « in vitro »

Date culture	Espèce	Tubes ensemencées	Tubes avec cals	Aspect cals	Couleur cals	Conditions
26.09.75	PK	128	88	friables = 77	marron	obscurité
				fermes = 11	blanc	obscurité
12.01.76	PK	92	53	fermes = 21	vert	lumière (16 h)
				friables = 32	brun	obscurité
23.03.76	PK	60	29	fermes = 2	brun	obscurité
				fermes = 12	blanc	obscurité
				friables = 15	marron	obscurité
26.07.76	PK	75	2	friables	brun	lumière (16 h)
23.11.76	PC	218	131	fermes	blanc	obscurité
26.02.76	PC	38	1	friable	brun	lumière (16 h)
12.05.76	PC	77	51	fermes = 3	vert	lumière (16 h)
				fermes = 18	blanc	lumière (16 h)
				friables = 30	brun	lumière (16 h)
23.06.76	PC	112	38	fermes = 31	blanc	obscurité
				friables = 7	marron	obscurité

PK = Pinus kesiya PC = Pinus caribæa

Les essais sur d'autres milieux, infectés ou sans formation de cals ne sont pas reportés dans ce tableau.

Le repiquage des cals intervient tous les mois ou tous les 2 mois suivant leur rapidité de croissance. Placés en alternance de lumière (16 h) et d'obscurité, les cals verdissent mais leur texture initiale est généralement conservée au cours des repiquages successifs. Autrement dit, un cal d'aspect friable ne modifiera jamais sa texture, quelles que soient les conditions dans laquelle on le place.

Les cals à prolifération rapide, laissés trop longtemps (6 mois) sur un même milieu, brunissent mais ne meurent pas s'ils sont placés sur le milieu IIIw. Mais une fois le brunissement acquis, les vieux cals ayant subi 5 à 6 repiquages et placés à 26° C n'acquièrent jamais plus la coloration blanche ni la coloration verte, même s'ils sont soumis à une alternance de lumière et d'obscurité

Toutefois, les cals bruns placés à l'obscurité et en croissance ralentie (conservation à 4° C), conservent leur potentialité de reverdissement et de se multiplier lorsqu'ils sont repiqués sur un milieu neuf, à 26° C et à la lumière.

Nous possédons actuellement une collection de jeunes cals (conservation à 2° C et à 4° C) de différentes textures, de différentes couleurs (blanc, brun et marron) et d'âges physiologiques différents, dans laquelle nous puissons au fur et à mesure de nos besoins (repiquage, analyse, culture en milieu liquide).

42. — *Différenciation de bourgeons.*

Les cals verts, de texture ferme, après une conservation de 1 à 3 mois en milieu réfrigéré (2° C) et à l'obscurité, sont capables d'initier des bourgeons à leur surface lorsqu'on les place en alternance de lumière (14 h à 16 h) et d'obscurité. La température d'incubation varie alors au cours de la journée : 22° C dans la matinée, elle passe à 25° C ou 28° C dans l'après-midi, pour revenir à 22° C dans la nuit.

Nous avons essentiellement observé ces bourgeons sur P. caribæa Il s'agit d'une dizaine de nodules blancs ne permettant pas encore de définir une orientation future en racine ou en plantule. Ces nodules, laissés reliés au cal-mère ne parviennent pas à évoluer, et conservent cet aspect jusqu'à dépérissement. Assez vite, en effet - 1 mois au maximum après leur apparition - ils sont de nouveau noyés par les cellules friables du cal qui continue sa prolifération. Pour ralentir cette prolifération, le tube de culture contenant le cal et ses nodules a été placé au réfrigérateur : les nodules n'ont pas supporté ce traitement de choc. Repiqués sur d'autres milieux nutritifs, ces nodules présentent une très grande sensibilité aux contaminations. Deux mois après ce repiquage, quelques nodules avaient verdi puis initié un semblant de feuille primaire (taille : 1 m/m). Il ne nous est pas encore possible à l'heure actuelle de définir la destinée d'un nodule, puisque nous ne distinguons que le grossissement d'un bourgeon avec initiation de primordia foliaires sans allongement de tiges ni enracinement.

La formation de ces bourgeons semble être en liaison avec l'âge physiologique du cal. Lorsque celui-ci est frais, nouvellement constitué, il montre une plus grande aptitude à former des bourgeons s'il est immédiatement placé au froid. S'il a subi auparavant 4 à 5 repiquages, il conserve son état indifférencié quelles que soient les conditions dans lesquelles on le place.

De même, si le bourgeon fasciculaire d'aiguille est prélevé en fin de montée de sève, les cals qui en sont issus sont capables d'une dédifférenciation.

43. — *Micro-bouturage*

Placés sur le milieu modifié de WINTON, les brachyblastes sont plus longues à former des cals, quelles que soient les conditions de milieu. En revanche, 8 brachyblastes ont formé à leur base des bourgeons de couleur brun pâle qui se sont allongés dans le milieu gélosé sur une longueur d'environ 3 m/m. Tous les autres ont formé en surface un cal vert ou blanc, de texture ferme ou friable, malgré un conditionnement identique : alternance de lumière (16 h) et d'obscurité à 26° C.

Lorsque l'allongement des « racines » est arrêté, une transplantation sur le milieu rhizogène pour le tabac n'a abouti à aucun succès. Le bourgeon semblait manifester une « dormance » puisque 2 mois après cette transplantation l'apex s'est allongé.

Un cas isolé peut être cité : un brachyblaste, au lieu d'initier une racine ou un cal, a allongé sa pousse fasciculaire de 1 cm et continue de vivre sous tube, malgré l'absence de racine.

Il est donc possible, à partir de bourgeons fasciculaires d'aiguilles, de passer directement à la plante entière, d'une part en les faisant initier des racines, et ensuite en assurant l'élongation des bourgeons. Il s'agira là, non plus de culture de tissus tel qu'est définie cette technique puisqu' il n'y a plus formation de cellules indifférenciées, mais d'une technologie se rapprochant du bouturage.

CONCLUSION

Ces premiers essais sur les pins cultivés à Madagascar nous ont permis de cerner les problèmes d'induction et de conservation de cals, de régénération de bourgeons et de différenciation d'organes en culture « in vitro ». L'âge de nos pieds-mères (6 ans) ne semble pas avoir une influence sur le succès ou l'échec de l'induction d'un grand nombre de bourgeons de brachyblastes. Il n'intervient pas non plus sur la callogé-

nèse qui est rapidement assurée à l'obscurité. Notons que la conservation des cals doit intervenir immédiatement après sa formation et durer en moyenne 2 mois pour qu'ils puissent assurer une différenciation de bourgeons. Le nombre limité de nodules ou de pousses obtenues après une seule campagne d'essais ne permet pas encore de se prononcer sur le succès d'une diffusion rapide des arbres « plus ». Nous avons encore à résoudre le problème de l'enracinement ainsi que celui de la forte mortalité parmi nos boutures, par dépérissement de l'apex ou par nécrose. Il reste aussi à définir le moment du sevrage des boutures. Mais cette technique reste certainement une voie d'avenir pour la propagation des arbres forestiers ayant exprimé les meilleurs potentialités génétiques, aboutissant à des copies conformes aux pieds-mères.

BIBLIOGRAPHIE

BALL (E.), 1950 : Differenciation in callus cultures of **Sequoia sempervirens**. Growth 14 : 295-325.

BOULAY (M.), 1976 : Recherches sur la propagation du Douglas par culture « in vitro ». AFOCEL 1976 : 84-145.

GAUTHERET (R.), 1934 : Culture of cambial tissue. C. R. Acad. Sci. 198 ; 2195-6.

GAUTHERET (R.), 1939 : The possibility of unlimited growth of carrot tissue cultures. C. R. Acad. Sci. 208 : 118-20.

HUHTINEN (O.), 1976 : In vitro culture of haploid tissue of trees. Proc. XV .. IUFRO. World congress Oslo Norway (Division II).

HUHTINEN (O.) et WINTON (L.), 1976 : Tissue culture of trees. Modern methods in forest genetics (communication personnelle).

JACQUIOT (C.), 1966 : Plant tissues and excised organs cultures and their significance in forest research. J. Inst. Wood Sci. 16 : 22-34.

KOTTE (W.), 1922 : Root meristems in tissue culture. Ber. Deut. bot. Ges. 40 : 269-72.

MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.), 1962 : A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. plant. 15 : 473-97.

NOBECOURT (P.), 1939 : Continuous growth of plant tissue cultures. C. R. Soc. Biol. 130 : 1270.

ROBBINS (W.), 1922 : Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. Bot. Gaz. 73 : 376-90.

TEO (C.K.H.) and HUHTINEN (O.), 1975 : The prospects of propagating an breeding trees « in vitro ». Planter Kuala Lumpur 51 : 223-230.

WHITE (P.), 1939 : Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificia nutrient. Am. J. Bot. 26 : 59-64.

WINTON (L.), 1972 : Somatic callus cultures from deciduous trees. The Institute of Paper Chemistry and Physiology. Notes N° 17.

WINTON (L.), 1972 : Callus and ceel culture of Douglas fir. Forest Sci. 18 : 151-4.