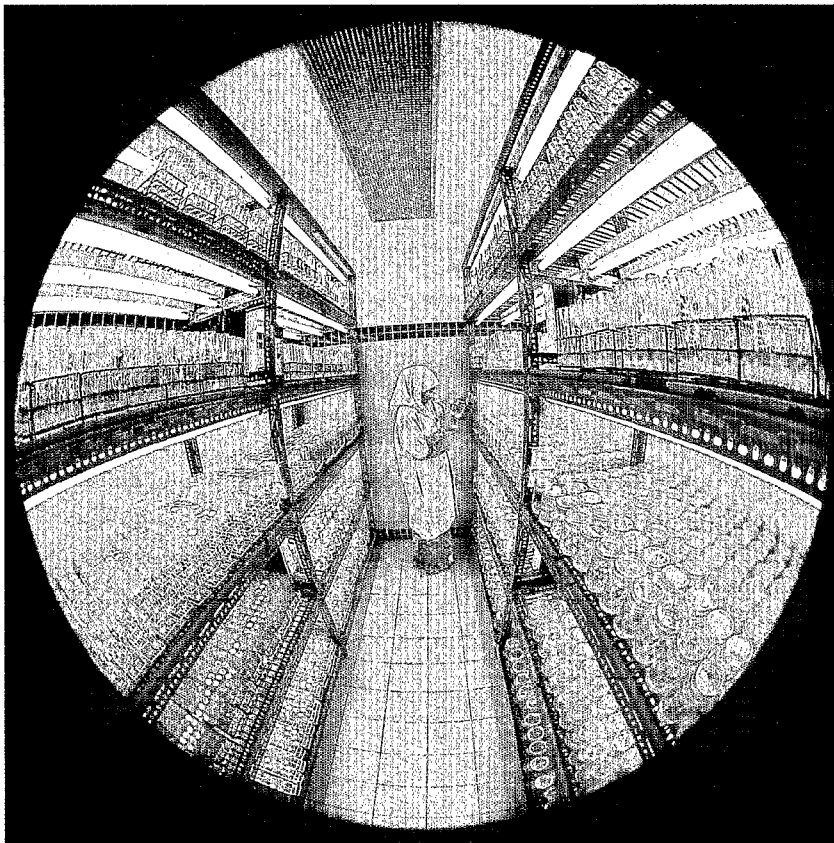


MARIE-CLAUDE BON  
CIRAD-Forêt

OLIVIER MONTEUUIS  
CIRAD-Forêt

# BIOTECHNOLOGIES FORESTIÈRES AU SABAH

Premier bilan



Aperçu d'une salle de culture du laboratoire commun CIRAD-Forêt/ I.C.S.B. de Biotechnologies Forestières de Tawau, d'où est déjà sortie une production-pilote de 20 000 vitroplants de géotypes sélectionnés âgés de teck.

*Glimpse of a culture room of the joint CIRAD-Forêt/ I.C.S.B. Forest Biotechnology Laboratory of Tawau, from where a pilot production of 20,000 vitroplants from mature selected teak genotypes has already originated.*

Depuis 1989, le CIRAD-Forêt collabore très étroitement avec Innoprise Corporation Sdn Bhd (I.C.S.B.), la plus importante compagnie forestière malaisienne du Sabah, dans le cadre du projet « Plant Improvement and Seed Production », en abrégé « P.I.S.P. » (NASI, MONTEUUIS, 1992 et 1993).

Le succès de cette collaboration a favorisé en 1991 la mise en place d'un second projet axé sur les biotechnologies forestières avec la création d'un laboratoire commun CIRAD-Forêt/I.C.S.B. situé à Tawau (côte est de Bornéo) et opérationnel depuis fin 1992 (cf. B.F.T. n° 236).

Il nous a paru intéressant de dresser un premier bilan de ce projet après deux années de fonctionnement.

## ESPÈCES ET THÉMATIQUES DE RECHERCHES PRIVILÉGIÉES

La fonction primordiale du laboratoire de biotechnologies CIRAD-Forêt/I.C.S.B. de Tawau est d'appuyer les actions de terrain, dans un esprit de recherche très finalisée vers le développement, en étroite collaboration avec les programmes d'activités de Luasong Forestry Centre, et plus particulièrement du P.I.S.P..

Le choix des espèces a été décidé d'un commun accord, en tenant compte des stratégies de plantations de I.C.S.B. et des priorités du CIRAD-Forêt en matière de Recherche-Développement. Le teck (*Tectona grandis*) et les acacias de zone humide, essentiellement *Acacia mangium*, ont été préférentiellement retenus en raison de leur importance en ce qui concerne les espèces arborescentes, en plus des rotins (*Calamus sp.*), priorité affichée de I.C.S.B. (cf. NASI, MONTEUUIS, 1992 et 1993).

Les thématiques de recherche ont été choisies d'après leur aptitude à répondre à court terme aux objectifs de terrain de notre partenaire, en fonction des espèces et des contraintes locales. Cette complémentarité entre les activités de terrain ou de pépinière et les biotechnologies se justifie notamment afin :

- de bien percevoir les problèmes et les objectifs permettant de choisir les stratégies les mieux adaptées, en fonction des moyens disponibles ;
- de bien définir les limites respectives des techniques conventionnelles, d'une part, et des biotechnologies d'autre part, pouvant déboucher sur des comparaisons économiques, par exemple entre les techniques de bouturage de pépinière et la micropropagation ;

- d'effectuer judicieusement et précisément les sélections de matériel végétal.

Ces thématiques de recherches doivent faire appel à des technologies fiables, efficaces, relativement bon marché et aisément transférables à notre partenaire. Dans cet esprit, la micropropagation, essentiellement par bourgeonnement axillaire, et les techniques d'électrophorèse isoenzymatique ont été préférentiellement développées. Il convient d'en exposer les principales raisons.

La multiplication par micropropagation *in vitro* peut présenter, en fonction des espèces, un certain nombre d'avantages par rapport aux techniques de propagation végétative plus classiques de pépinière (AUGE *et al.*, 1982), notamment :

- Un accroissement notable du pouvoir de multiplication lié à la réactivité organogénique stimulée et à la miniaturisation des explants cultivés *in vitro* (FRANCIET, 1987). Cette miniaturisation connaît son achèvement à travers la culture de méristèmes primaires apicaux utilisée, entre autres, à des fins de rajeunissement (MONTEUUIS, 1989) ou phytosanitaires, particulièrement pour l'élimination de virus et de certaines bactéries endogènes (MARGARA, 1980 ; AUGE *et al.*, 1982).
  - La constitution de « banques de gènes », ou plus modestement de collections de génotypes en conditions axéniques requises pour les transferts ou échanges internationaux, tout en préservant la réactivité des vitroplants dans un volume réduit.
  - Le conditionnement du matériel sélectionné et cultivé *in vitro* en fonction de divers objectifs : tests de sélection, génie génétique, analyse d'ADN...
  - Réduction des contraintes d'environnement, d'espace et de temps.
- La micropropagation par bourgeonnement axillaire demeure une



« vitro-méthode » relativement simple, utilisée depuis des dizaines d'années par des établissements privés de multiplication à des fins commerciales (AUGE *et al.*, 1982 ; BOULAY, 1985). Elle est de ce fait adaptée à des transferts de technologies, pourvu que les utilisateurs aient assimilé les règles d'aseptie exigées par la culture *in vitro* et se montrent suffisamment consciencieux et appliqués lors des manipulations. La régénération des structures végétatives introduites s'effectue naturellement à partir de zones méristématiques préexistantes pour mieux garantir la conformité génotypique ; elle a pour effet de minimiser les risques de variations somaclonales auxquelles les techniques mettant en œuvre des processus de dédifférenciation, *a fortiori* de callogenèse, sont plus exposées (MARGARA, 1980 ; AUGE *et al.*, 1982 ; BOULAY, 1985).

L'électrophorèse d'isoenzymes est un procédé qui permet d'identifier, après migration sur gel d'acrylamide ou d'amidon, des formes multiples d'enzymes ayant la même fonction catalytique mais une mobilité différente dans un champ électrique, du fait de variations de charge ou de configuration spatiale. L'intérêt de ces isoenzymes repose sur un déterminisme génétique simple dans la plupart des cas de variations, sur l'expression codominante des produits alléliques, l'absence d'interactions épistatiques et la persistance de l'expression indépendamment des conditions de milieu (PASTEUR *et al.*, 1987).

Ses applications dans le domaine de la génétique et de l'amélioration des essences forestières sont variées (FORREST, 1994). Elles peuvent concerner, à titre d'illustration :

- l'analyse de la diversité génétique inter- et intraspécifique,
- l'étude des régimes de reproduction,

- la taxonomie et l'identification, voire la certification de matériel végétal (lots de semences, variétés, clones...), ce qui permet d'expliquer le nombre croissant des études de polymorphisme enzymatique associées à un programme d'amélioration d'espèces tropicales.

Sur un plan pratique, comparativement aux techniques de marqueurs moléculaires de type génomique, l'analyse par isoenzymes est relativement aisée, rapide, bon marché et complète avantageusement, en contrepartie d'un investissement additionnel modique, les activités d'un laboratoire de micropropagation en tirant profit d'une partie des installations et des équipements requis pour celui-ci.

## ÉTAT D'AVANCEMENT DES RECHERCHES SUR LES ESPÈCES ARBORESCENTES

### *TECTONA GRANDIS* (TECK)

La micropropagation de semis de teck germés *in vitro* s'est avérée utile dans le cadre de la formation du personnel local aux techniques *in vitro*, qui a pu se familiariser avec le comportement de ce type de matériel dans ces conditions.

Plus fondamentalement, la micropropagation à partir de semis germés en conditions axéniques *in vitro* se justifie pour le teck, comme pour bon nombre d'autres espèces, dans le cas de lots de graines particulièrement précieuses disponibles en quantité restreinte (origine bien particulière, génotypes à haute valeur génétique présumée, issus par exemple de croisements contrôlés...). Le fort potentiel de multiplication des vitrométhodes est mis à profit pour augmenter rapidement les effectifs de ces génotypes précieux, d'autant plus aptes à se propager

végétativement qu'ils sont très juvéniles.

Les techniques mises au point de désinfection des graines extraites des fruits, environ une à deux graines par fruit en moyenne, permettent d'initier des cultures saines avec des rendements de 80 %. Les semis obtenus sont ensuite propagés par microbouturage de nœuds, soit en mélange (« Bulk propagation »), soit en lignées clonales, en différenciant les génotypes dès l'origine.

Le microbouturage peut également se pratiquer à partir de segments nodaux prélevés sur des pousses en croissance, le cas échéant produites par des tronçons de branches forcés (MONTEUUIS *et al.*, 1995), d'individus sélectionnés *in situ* d'âge variable, de jeunes semis de pépinière à des sujets « Plus » de plusieurs dizaines d'années. Environ 30 % des explants introduits en culture primaire, après l'application de techniques de désinfection appropriées, réagissent positivement en produisant des pousses axillaires indemnes de germes pathogènes, quel que soit l'âge de l'ortet d'origine. Ces nouvelles pousses formées *in vitro* sont rapidement utilisées pour constituer un nouveau cycle de micropropagation selon un processus de subcultures « en cascade » classique, la périodicité des transferts sur « milieu frais » variant de un à un mois et demi, selon la disponibilité du personnel. Si les introductions primaires se font préférentiellement en tubes de cultures pour limiter les dommages causés par les infections, le passage en bocaux de culture (photo 1, p. 34) s'effectue dès que possible afin d'augmenter les rendements au repiquage, et plus généralement de réduire les coûts de production en vue de l'application à une échelle industrielle. Dans cet esprit, nous nous sommes également attachés à mettre au point une technique de micropropagation basée sur un seul milieu de





MICROPROPAGATION PILOTE INDUSTRIELLE DE CLONES DE TECKS AGÉS : DU LABORATOIRE AU CHAMP  
 PILOT INDUSTRIAL MICROPROPAGATION OF MATURE TEAK CLONES : FROM LABORATORY TO FIELD

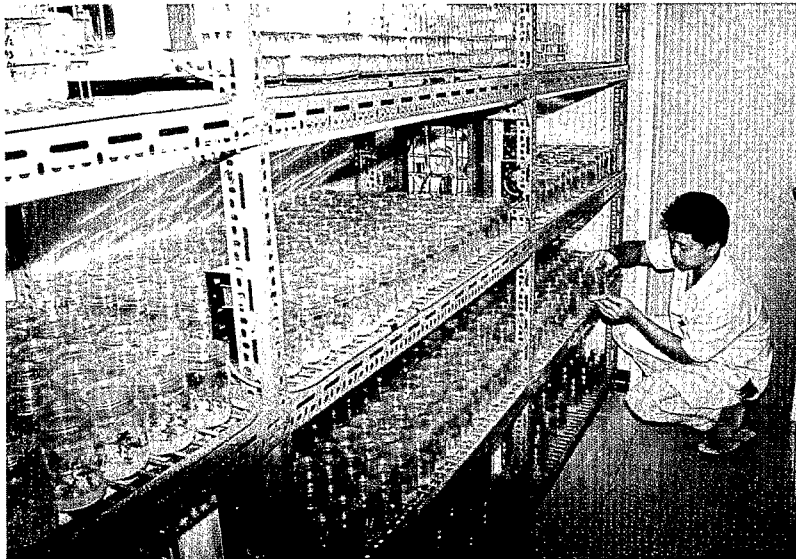


Photo 1

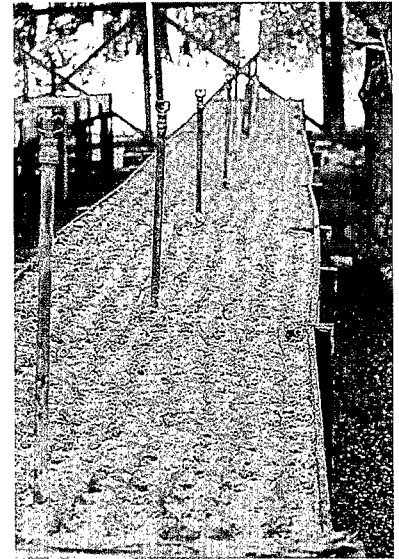


Photo 2

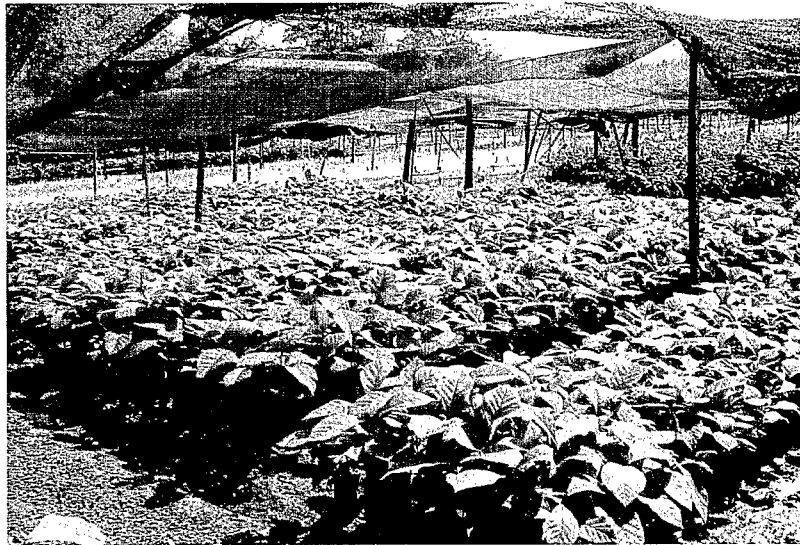


Photo 3

Photo 1. Micropropagation de masse de clones de tecks âgés. Les introductions primaires et les premières phases de cultures s'effectuent en tubes (étagères du haut), puis les souches sont micropropagées en bocaux en conditions pilotes de production industrielle.

*Mass micropropagation of mature teak clones. Glass test tubes are used to establish the explants in culture (upper shelves), then the actively growing microshoots are micropropagated using glass jars according to mass production pilot conditions.*

Photo 2. Phase d'enracinement-acclimatation des tiges produites *in vitro* sous "mist-system" et sous ombrière; en conditions de pépinière.

*Rooting-acclimatization phase of tissue culture produced teak microshoots, under shade and with automatic mist-system in nursery conditions.*

Photo 3. Elevage-éducation en pépinière hors-sols des plants issus d'*in vitro* en vue des plantations.

*Raising-hardening of in vitro issued container-grown plants to be ready for planting.*



culture adapté aux phases d'allongement et de multiplication, sur lequel 80 % des tigelles s'enracinent néanmoins spontanément. Mais indépendamment du fait que les pousses soient enracinées ou non en milieu gélosé *in vitro*, l'enracinement s'effectue systématiquement en conditions horticoles, sous brumisation automatique intermittente – « mist system » – et ombrage (photo 2), dans les conditions décrites de macrobouturage (MONTEUUIS *et al.*, 1995), en l'absence d'application de substances rhizogènes (« hormones de bouturage »).

A ce jour, plus de 20 000 boutures de génotypes de teck âgés de 5 à 15 ans ont été ainsi produites et acclimatées pour être plantées (photo 3).

Les relevés moyens établis sur l'ensemble de cet effectif confirment un taux de multiplication *in vitro* « TM » classiquement de type exponentiel (BOULAY, 1985) pouvant être défini par  $TM = 3^n$ ; n correspond au nombre de sub-cultures de périodicité allant de un à un mois et demi, et à un rendement à l'acclimatation supérieur à 95 %. Les microboutures acclimatées se développent rapidement en pépinière sous forme de plants vigoureux et de belle qualité pour les plantations. Il convient d'insister sur le fait que les pertes entre la sortie de la culture *in vitro* et de la plantation n'excèdent pas 5 %.

Il serait intéressant de comparer, d'un point de vue économique, les techniques de propagation clonale par micropropagation *in vitro* et par bouturage horticole (MONTEUUIS *et al.*, 1995) de génotypes âgés de tecks, toutes deux mises au point à une échelle pré-industrielle dans le cadre de notre collaboration avec I.C.S.B.

Parallèlement au microbouturage, les études se poursuivent sur l'affinement des techniques de cultures de méristèmes primaires apicaux, dont les avantages manifestes (MARGARA, 1980; AUGE *et al.*,

1982) ont été très succinctement exposés antérieurement. La taille de ces extrémités végétatives caulinaires excisées est comprise entre 300 et 350  $\mu\text{m}$ . D'ores et déjà, des lignées « mériclonales » ou issues d'un seul méristème introduit sur milieu synthétique, en conditions aseptiques *in vitro*, ont été obtenues.

### ACACIA MANGIUM

En vertu des arguments exposés pour le teck, les possibilités de faire germer, puis de micropropager *in vitro* des semis d'*Acacia mangium* ont aussi été testées. 80 % des graines introduites après désinfection donnent naissance à de jeunes plants qui sont ensuite microbouturés. Le matériel disponible en grandes quantités est utilisé pour la mise au point des milieux de cultures devant permettre de conserver et de multiplier des souches durant plusieurs années.

Les techniques de micropropagation à partir de sélections *in situ* ont essentiellement été appliquées à des génotypes matures, âgés de 4 à 15 ans. Le matériel introduit en culture primaire, après avoir été soumis à des protocoles de désinfection adaptés, consiste en des segments nodaux provenant de pousses en cours d'élongation (photos 4 et 5).

Les observations effectuées à l'issue de plusieurs introductions indiquent :

- De grandes différences de réactivité *in vitro* entre génotypes de même âge (4 ans), de même provenance et introduits en culture rigoureusement dans les mêmes conditions ; à titre d'illustration, 18 mois après introduction, certains clones étaient représentés par 500 microboutures, alors que d'autres avaient disparu pour cause de dégénérescence.
- Un lien entre ces différences de réactivité *in vitro*, en termes de ca-



Photo 4. Culture primaire d'*Acacia mangium* âgé : prémices de caulogénèse *in vitro* à partir du segment nodal initialement introduit.

Primary culture of mature *Acacia mangium* : first stage of *in vitro* new shoot formation from the nodal explant initially inoculated.

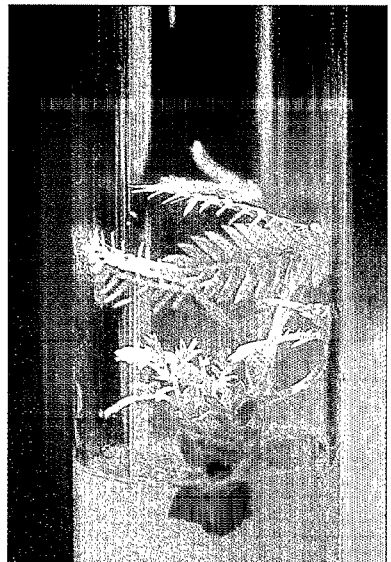


Photo 5. Production de plusieurs tigelles à partir d'un seul explant primaire issu d'*Acacia mangium* âgé. On notera la morphologie foliaire de type juvénile.

Tissue culture produced shoots arising from a single primary explant originated from a mature *Acacia mangium* tree. Notice the juvenile-like foliar morphology.

pacités organogéniques, et la présence de bactéries vraisemblablement d'origine endogène, qui apparaissent après un nombre de subcultures plus ou moins élevé chez les clones les moins réactifs.

- Une aptitude à la micropropagation très inférieure globalement à celle du teck, du moins dans les conditions expérimentales testées à ce jour.

Les milieux de culture adoptés permettent dès à présent de subcultiver, tout en les multipliant, des clones issus de génotypes matures d'*Acacia mangium*. Les modifications de morphologie foliaire au fil des subcultures laissent augurer un rajeunissement progressif de certains clones, en dépit d'une variabilité intraclonale encore notable pour ce caractère morphologique. La même constatation s'applique à la rhizogénèse adventive, avec l'apparition d'enracinements spontanés sur des milieux non conçus pour favoriser ce type d'organogénèse.

Au fil des subcultures, ce rajeunissement devrait se confirmer, avec un accroissement de la capacité organogène des clones sélectionnés, pour permettre d'aboutir rapidement à l'acclimatation en pépinière de plusieurs centaines de tigelles clonées qui seront testées au champ.

Pour tenter de résoudre ces problèmes de bactéries « endogènes » entravant la micropropagation de certains clones, nous avons cherché à développer la culture d'apex (200 à 300 µm) de tige, le méristème *stricto sensu* d'*Acacia mangium* étant trop petit (40 à 50 µm, en moyenne) pour garantir des chances de succès suffisantes après excision en conditions *in vitro*. Devant le manque de réactivité des explants à l'allongement après la phase d'initiation sur milieux synthétiques gélosés, nous nous sommes orientés vers le microgreffage

d'apex dont les atouts ont déjà été présentés (JONARD, 1986).

La technique de microgreffage mise au point permet de cloner par greffage des sujets âgés sélectionnés *in situ* après prélèvement de greffons dans le houppier, contrairement aux techniques de greffage horticoles dont le succès reste très dépendant de l'âge du matériel greffé. Un total d'environ 300 microgreffes effectuées indique que si la soudure entre le semis *in vitro* porte-greffe et l'apex intervient dans 60 % des cas, assurant la survie du génotype microgreffé, seuls 40 % de ces greffes réussies s'allongent dans les deux mois suivant le greffage (photo 6). Cette hétérogénéité en matière d'allongement des greffons a déjà été constatée pour bon nombre d'espèces.

Les greffons allongés ont permis d'initier de nouvelles cultures des génotypes matures sélectionnés.



Photo 6. Premiers stades d'allongement d'une microgreffe d'apex (la taille du greffon n'exécède pas 600-800 µm) d'*Acacia mangium* âgé, en conditions *in vitro*.

*First stages of scion elongation derived from shoot apex micrografting of a mature *Acacia mangium* ortet, in vitro conditions.*

Jusqu'à présent, ces cultures issues de microgreffes se sont avérées indemnes de bactéries endogènes, conformément aux espérances.

Si certaines de ces microgreffes sont utilisées comme pieds-mères miniatures *in vitro* pour initier de nouveaux cycles de micropropagation, d'autres ont été acclimatées en pépinière. Elles seront utilisées comme pieds-mères plus conventionnels en conditions horticoles pour les clones sélectionnés âgés, avec une réactivité au bouturage vraisemblablement accrue par la technique de microgreffage dont ils sont issus.

## ÉTAT D'AVANCEMENT DES RECHERCHES SUR LES ROTINS

### MICROPROPAGATION

Les techniques de micropropagation en conditions de culture *in vitro* demeurent à ce jour le seul moyen de propager végétativement, et surtout de cloner, les espèces de rotins strictement monocauls, telles que *Calamus manan*, d'intérêt économique majeur (NASI, MONTEUUIS, 1992). Les vitrotechniques peuvent être mises à profit également pour accélérer la multiplication clonale des espèces multicaules telles que *Calamus subinermis* ou *Calamus merrillii*. Comme pour les espèces arborescentes, la multiplication de semis, ou plus couramment d'embryons excisés, se justifie également pour accroître les effectifs de lots de graines intéressantes d'un point de vue spécifique ou infraspécifique (provenances ou descendances particulières), mais initialement peu représentées.

Si l'utilisation des vitrométhodes pour la production en masse de vitroplants de rotins destinés à des



plantations industrielles paraît aujourd'hui difficilement concevable, essentiellement pour des raisons économiques (NASI, MONTEUUIS, 1992), la micropropagation n'en reste pas moins un atout intéressant pour les programmes d'amélioration. En effet, la possibilité de propager végétativement des génotypes peut être mise à profit pour approfondir les particularités biologiques et génétiques des diverses espèces en fonction de l'environnement : interaction site X génotype, appréciation de l'héritabilité (sens large)... ainsi que pour l'établissement de vergers à graines, éventuellement clonaux, en mettant à profit l'allogamie stricte de ces espèces.

*C. manan*, *C. subinermis* et *C. merrillii*, espèces à plus haute valeur marchande, ont été essentiellement étudiées du fait de leur caractère prioritaire pour notre partenaire.

Une séquence de milieux concernant la germination, l'induction-initiation de bourgeons, le développement en pousses des bourgeons initiés et, finalement, l'enracinement, a été mise au point. La méthodologie acquise, sans nul doute perfectible, permet d'obtenir 90 à 100 % de germinations à partir des embryons zygotiques extraits manuellement de la graine, en conditions d'aseptie. Les bourgeons initiés se développent en pousses dans des bocaux pour prendre l'aspect de touffes comptant parfois jusqu'à 62 tigelles virtuelles à partir d'un seul embryon initial (photo 7). Après séparation de la touffe-mère, ces pousses s'enracinent *in vitro* dans des proportions variant entre 75 et 80 % avant d'être acclimatées en pépinière dans les conditions décrites antérieurement.

A ce jour, cette technique a déjà permis de produire et d'acclimater en pépinière plusieurs centaines de tigelles de *C. manan*.

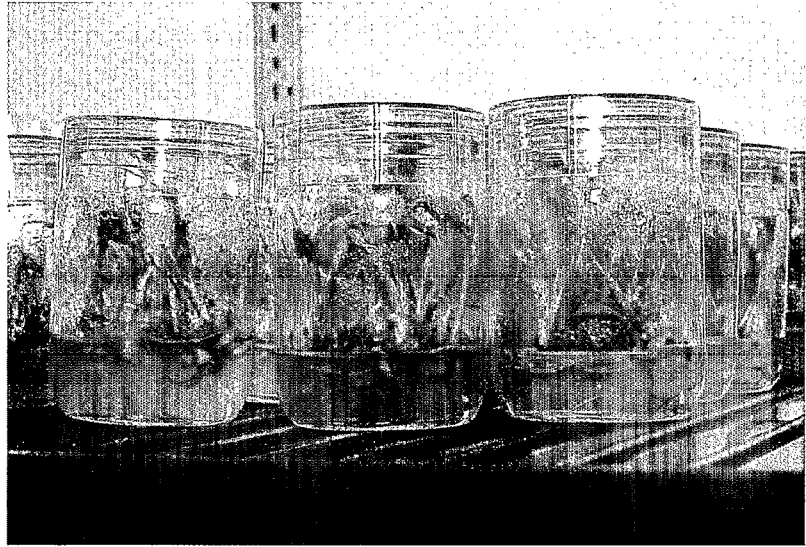


Photo 7. Micropropagation de rotin *C. subinermis* en bocaux, durant la phase d'expression caulogène.  
*Micropropagation of rattan C. subinermis in glass jars corresponding to shoot elongation stage.*

Plus récemment, afin de s'affranchir des contraintes liées à la mise en culture des embryons qui doivent être excisés pour être introduits *in vitro* dès que possible après la récolte des fruits, des semis de pépinière âgés de quelques mois ont été utilisés comme source d'explants primaires. Ces semis sont disponibles tout au long de l'année à la pépinière de Luasong (NASI, MONTEUUIS, 1992). En outre, ce type de matériel s'apparente dans une certaine mesure aux pousses collatérales ou axillaires produites par les espèces multicaules et utilisées à des fins de clonage d'individus matures, laissant présager certaines similitudes dans la recherche de protocoles adaptés.

La capacité des espèces multicaules, *C. merrillii* surtout, à initier des bourgeons dans les conditions expérimentales actuelles, est, en toute logique, bien supérieure à

celle de *C. manan*. Les phases ultérieures de culture s'apparentent à la méthodologie exposée précédemment pour les embryons excisés.

Les risques inhérents à la mise en culture de l'unique méristème apical des espèces monocauls, sans autre alternative que de sacrifier le plant pour prélever ce méristème profondément situé au centre de feuilles engainantes, nous ont incités à explorer les possibilités de néoformations (BIGOT, 1980 ; MARGARA, 1982). Il semble au vu de la littérature et des premières expérimentations que le stade cal soit un préalable inévitable. Des premières réponses encourageantes ont été obtenues à partir de sections de folioles et de pointes racinaires du matériel déjà introduit. Les observations prochaines devraient nous renseigner sur les potentialités organogènes de ces premiers calcs.

**ANALYSE DE DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE PAR ÉLECTROPHORÈSES D'ISOENZYMES**

L'une des priorités du programme d'amélioration génétique sur les rotins, dans le cadre de ce projet, concerne les actions de conservation *ex situ* pour les principales espèces commerciales (GARCIA *et al.*, 1994 ; ALLOYSIUS, BON, 1995), à savoir :

- *Calamus manan*,
- *Calamus subinermis*,
- *Calamus caesius*,
- et *Calamus trachycoleus*.

Les récoltes de fruits initiées dès 1989 (NASI, MONTEUUIS, 1992) et poursuivies en 1993 (GARCIA *et al.*, 1994) dans les aires d'origine et les plantations ont permis d'établir à Luasong des parcelles conservatoires récapitulées dans le tableau suivant (d'après ALLOYSIUS, BON, 1995).

La variabilité intraspécifique des principales espèces de rotins est évaluée par des essais comparatifs de provenances, et plus particulièrement de descendance, couvrant une superficie d'au moins 11 hectares dans des conditions écologiques très hétérogènes simulant un écosystème presque naturel (NASI, MONTEUUIS, 1992). Ces essais sont analysés par des marqueurs morphogénétiques tels que l'accroisse-

ment annuel de la canne et le nombre moyen de tiges par plant pour les espèces multicaulées. Néanmoins, sur l'ensemble des critères sélectionnés, les premières séries d'analyses des essais descendance n'ont pas mis en évidence d'effet significatif, exception faite de *Calamus caesius* (ALLOYSIUS *et al.*, 1995).

Il nous a paru opportun de tenter d'enrichir ces premières observations sur la diversité génétique de ces espèces par celles obtenues au moyen de marqueurs « neutres » de type isoenzymes. Une subvention CEE-DGX1 (contrat B9/1/4-3048/1059) a permis la mise en œuvre de cette technologie dans le laboratoire de Tawau.

Une méthodologie d'extraction et d'électrophorèse isoenzymatique a été appliquée pour la première fois avec succès à des feuilles plus ou moins âgées de diverses espèces de rotins.

Un protocole simple de conservation des échantillons foliaires a été proposé dans l'optique des longues prospections de rotins sur le terrain pour lesquelles on ne bénéficie pas toujours d'enceinte réfrigérée et encore moins de lyophilisateur !

Chez ces espèces dioïques, l'intérêt de pouvoir mener à bien les analyses à partir de feuilles, au lieu des jeunes germinations exclusivement utilisées

jusqu'alors, est manifeste à plusieurs points de vues, entre autres :

- accès à l'information sur n'importe quel individu, sans contraintes de temps ni d'espace, quels que soient son sexe et son âge,
- méthode non destructive garantissant l'intégrité et la pérennité de l'individu.

Les supports d'électrophorèse sont de type acrylamide et amidon et les différentes enzymes utilisées en routine sont jusqu'à présent au nombre de dix. Il s'agit des adénylate kinases (AK), alcool déshydrogénases (ADH), estérases (EST), glucose-6-phosphate déshydrogénases (G6PDH), hexokinases (HK), isocitrate déshydrogénases (IDH), nicotinamide adénine dinucléotide déshydrogénases (NADHDH), phosphoglucoisomérases (PGI), phosphoglucomutases (PGM), shikimate déshydrogénases (SKDH).

En l'absence de descendance de croisements contrôlés entre parents génétiquement connus, des hypothèses quant au déterminisme génétique ont été formulées sur base de l'analyse des descendance maternelles obtenues en fécondation libre (photo 8) et des données de la littérature.

13 et 15 loci putatifs de 8 systèmes enzymatiques analysés ont été identifiés pour *Calamus manan* et *Calamus subinermis* respectivement (BON *et al.*, 1995). Les paramètres d'analyse de diversité génétique et de sa distribution ont été estimés à l'aide du logiciel Biosys-1.

Le nombre moyen d'allèles par locus pour toutes les populations confondues est de 2,5 pour les deux espèces. Le pourcentage moyen de loci polymorphes est de 85 % pour *Calamus manan* et de 77 % pour *Calamus subinermis*. Il est intéressant de souligner que le caractère « endémique » (Sabah, Bornéo et

| Espèces                | Origines                               | Familles séparées | Mélange |
|------------------------|--|-------------------|---------|
| <i>C. manan</i>        | 14 (Malaisie péninsulaire, Kalimantan) | 166               | 6       |
| <i>C. subinermis</i>   | 16 (Sabah)                             | 182               | 13      |
| <i>C. caesius</i>      | 13 (Sabah et Sarawak)                  | 146               | 13      |
| <i>C. trachycoleus</i> | 1 (Kalimantan)                         | 31                | -       |



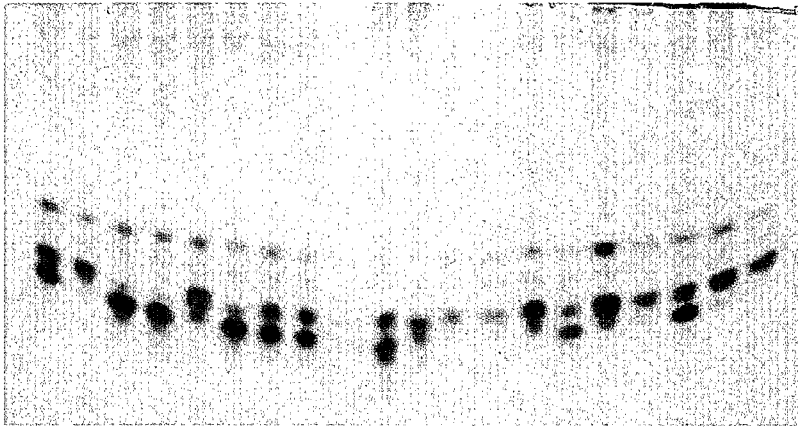


Photo 8. Exemple de zymogrammes d'estérasés observés chez *Calamus manan* avec les 10 premiers dépôts à partir de la gauche représentant une famille d'origine Brumas (Sabah) et les 10 autres dépôts d'une famille d'origine Kalimantan (Indonésie).

Example of esterase zymograms observed for *Calamus manan*, with the first ten samples from the left corresponding to a progeny from Brumas (Sabah) origin, whereas the other ten samples correspond to a progeny from Kalimantan (Indonesia).

les Iles Palawan, Philippines) de *Calamus subinermis* lui conférerait une variabilité génétique avec  $H_e = 0,47$  du même ordre que celle de *Calamus manan*, à distribution beaucoup plus étendue (Malaisie péninsulaire et Sumatra, Indonésie). Toutefois, la diversité génétique de *Calamus manan* est très probablement sous-estimée du fait de la structure de la collection actuelle, avec une majorité de plantations prospectées et une aire de distribution de l'espèce imparfaitement couverte, limitée à la Malaisie péninsulaire (BON *et al.*, 1995).

Les résultats obtenus montrent une structuration de la variabilité génétique chez *Calamus manan*, contrairement à *Calamus subinermis* qui ne présente pas de différenciation génétique des populations de la côte ouest du Sabah (photo 9).

L'absence de structuration des populations de *Calamus subinermis* devrait être infirmée ou confirmée par les informations obtenues sur les populations de l'est du Sabah.

Il est intéressant de noter que ces deux espèces, bien que différentes du point de vue de leur distribution géographique et de leur niche éco-

logique, d'après DRANSFIELD et MANOKARAN (1993), présentent certaines similitudes quant à leur variabilité génétique intraspécifique. Toutefois, il devrait être possible de donner une figure plus précise de la variabilité génétique et de sa structuration au moins pour ces deux espèces de rotins après avoir complété les collections existantes, dans le cadre d'un projet CEE (STD3) fédérant, entre autres, différents organismes de recherches malaisiens.

Les travaux en cours devraient permettre d'apporter des précisions sur les relations phylogéniques entre les principales espèces commerciales de *Calamus* de la péninsule malaisienne et de Bornéo.

Enfin, ces recherches devraient nous renseigner sur l'impact de la déforestation et de la fragmentation de la forêt tropicale sur la diversité génétique des rotins, dont les conséquences négatives ont déjà été mises en évidence pour d'autres espèces tropicales (BAWA, 1994).

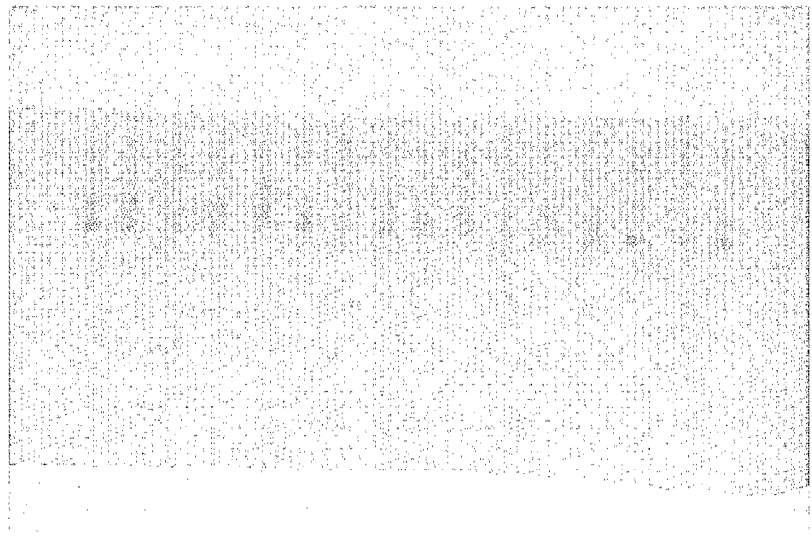


Photo 9. Exemple de zymogrammes d'alcool déshydrogénases (ADH) observés chez les populations de la côte ouest du Sabah de *Calamus subinermis*.  
Example of alcohol dehydrogenase (ADH) zymograms observed for *Calamus subinermis* populations originating from the west coast of Sabah.



Au terme de deux ans d'activités, le laboratoire de Biotechnologies forestières commun CIRAD-Forêt/I.C.S.B. de Tawau a généré un certain nombre de résultats originaux d'un point de vue scientifique, bien qu'ils soient orientés vers le développement. L'accès à des publications de niveau international d'une part, la production et l'acclimatation de plusieurs milliers de vitroplants d'autre part, l'attestent conformément à l'esprit Recherche-Développement qui sous-tend ce projet.

Cette expérience du Sabah tend à illustrer que les biotechnologies peuvent répondre rapidement aux attentes d'un partenaire en matière de

gestion et de création de ressource végétale dans le domaine forestier. L'un des principaux facteurs de réussite réside dans la possibilité de pouvoir disposer d'un laboratoire opérationnel, garantissant de bonnes conditions de travail à proximité des activités de terrain, en liaison étroite et permanente avec les programmes de développement. L'accès aisé à diverses espèces forestières en environnement naturel permet de mieux connaître leurs particularités, à l'échelle de la population ou de l'individu, pour un meilleur choix des stratégies d'exploitation en fonction des objectifs du partenaire. Les récoltes et les introductions de matériel végétal, ou en aval l'acclimatation et le suivi des vitroplants pro-

duits à diverses fins, s'en trouvent aussi grandement facilités. Le fossé entre les biotechnologies et le terrain, à juste titre souvent dénoncé, tend à se combler pour évoluer vers une osmose souhaitable. La contrepartie peut être des problèmes accrus de gestion et de maintenance dudit laboratoire, en fonction des conditions d'environnement. Ces aspects, qu'on ne saurait sous-estimer, restent malgré tout acceptables dès lors qu'il s'agit de la réussite du projet. □

► Marie-Claude BON  
Olivier MONTEUUIS  
Projet CIRAD-Forêt/I.C.S.B.  
P.O. Box 60793  
91017 TAWAU (Sabah)

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALLOYSIUS D., BON M. C., 1995. Genetic improvement of rattans. INBAR Newsletter, sous presse.
- ALLOYSIUS D., CHAUVIERE M., GARCIA C., BONAL D., 1995. Plant improvement and seed production unit : Activity report P.I.S.P. 1994, 17 p.
- AUGE R., BEAUCHESNE G., BOC-CONGIBOD J., DECOURTYE L., DIGAT B., MINIER R., MORAND J.-C., OUDIN Y., VIDALIE H., 1982. La culture *in vitro* et ses applications horticoles. Paris, Baillière, 152 p.
- BAWA K.S., 1994. Effects of Deforestation and Forest Fragmentation on Genetic Diversity in Tropical Tree Populations. In : Comptes rendus du Symposium ASEAN - Genetic Conservation and Production of Tropical Forest Tree Seed, 1993, 14 16.06. 1993, Chang Mai, Thaïlande, 10-15.
- BIGOT C., 1980. Multiplication végétative *in vitro* par néoformation de bourgeons et d'embryons somatiques. In : La multiplication végétative des végétaux supérieurs. Paris, Gauthier-Villars, 133-159.
- BON M.-C., BASRI B. ALI. H., JOLY H., 1995. Genetic variability of two rattan species from isozyme markers. In : Comptes rendus du Symposium IUFRO. Measuring and Monitoring Biodiversity in Tropical and Temperate Forests, 1994, 28.08 au 2.09.1994, Chang Mai, Thaïlande, 219-225.
- BOULAY M., 1985. Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestières. Annales AFOCEL, 1984 : 7-43.
- DRANSFIELD J., MANOKARAN N., 1993. Plant resources of South-East Asia. No 6, Rattans, Pudoc Scientific Publishers, Wageningen, 137 p.
- FORREST G.I., 1994. Biochemical markers in Tree Improvement Programmes. C.A.B. International, Forestry Abstracts, 55 (2), 153 p.
- FRANCLET A., 1987. Plant micropropagation in horticultural industries : exposé introductif. In : Comptes rendus du symposium Florizel 87, 10-14.8.1987, Arlon, Belgique, 23-40.
- GARCIA C., ALLOYSIUS D., YUSUF Y., CHAUVIERE M., BON M. C., 1994. Genetic conservation of rattans. In : Comptes rendus du symposium ASEAN. Management and Conservation of Biodiversity, 1993, 29.11 au 1.12.1993, Kuala Lumpur, Malaisie, 81-87.
- JONARD R., 1986. Micrografting and its applications to tree improvement. In : Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 1. Trees. Berlin, Heidelberg, New-York, Tokyo, Springer-Verlag, 31-48.
- MARGARA J., 1980. La culture de méristèmes et d'apex de tige. In : La multiplication végétative des végétaux supérieurs. Paris, Gauthier-Villars, 115-131.
- MARGARA J., 1982. Bases de la multiplication végétative. Versailles, INRA, 262 p.
- MONTEUUIS O., 1989. Méristèmes, vieillissement et clonage d'arbres forestiers. Annales AFOCEL, 1988 : 7-40.
- MONTEUUIS O., VALLAURI D., POU-PARD C., HAZARD L., YUSOF Y., WAHAP LATIP A., GARCIA C., CHAUVIERE M., 1995. Propagation clonale de tecks matures par bouturage horticole. Bois et Forêts des Tropiques, 243 : 25-39.
- NASI R., MONTEUUIS O., 1992. Un nouveau programme de recherches au Sabah : le Roïin. Bois et Forêts des Tropiques, 232 : 15-25.
- NASI R., MONTEUUIS O., 1993. Un nouveau programme de recherches au Sabah : les Arbres. Bois et Forêts des Tropiques, 235 : 25-34.
- PASTEUR N., PASTEUR G., BON-HOMME F., CATALAN J., BRITTON-DAVIDIAN J., 1987. Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. Technique et Documentation, Paris, Lavoisier, 217 p.



## R É S U M É

BIOTECHNOLOGIES FORESTIERES AU SABAH  
Premier bilan

A l'issue de deux années d'activités, le laboratoire commun CIRAD-Forêt / Innoprise Corporation Sdn Bhd (I.C.S.B.) de biotechnologies appliquées aux espèces forestières a généré un certain nombre d'acquis dans un esprit de Recherche très finalisée vers le Développement. La micropropagation et l'analyse par électrophorèses d'isoenzymes ont été les technologies préférentiellement développées sur une gamme d'espèces décidée d'un commun accord, en tenant compte des objectifs de plantations de notre partenaire malaisien.

Des protocoles de micropropagation ont permis de produire et d'acclimater plusieurs centaines de vitroplants de rotins (*Calamus manan*) et plusieurs milliers de tecks (*Tectona grandis*). Une technique de microbouturage de masse a été mise au point pour cette dernière espèce permettant la production industrielle de vitroplants clonés à partir de génotypes âgés. Conjointement, de nouvelles méthodes en vue de cloner des sujets matures ont été développées pour d'autres espèces, telles que le microgreffage d'apex pour *Acacia mangium*. L'analyse par les isoenzymes de différentes populations de *Calamus manan* et de *Calamus subinermis* a permis d'obtenir des premières informations sur la variabilité génétique, et sa structuration, de ces deux espèces de rotins à haute valeur commerciale. Bien que *Calamus subinermis* et *Calamus manan* présentent toutes deux une variabilité génétique importante de même ordre ( $H_e = 0,47$ ), la différenciation génétique des populations testées n'a pu être mise en évidence que pour *Calamus manan*.

**Mots-clés :** *Acacia mangium*. Biotechnologies. *Calamus sp.* Variabilité génétique. Isoenzymes. Malaisie. Micropropagation. *Tectona grandis*.

## A B S T R A C T

FOREST BIOTECHNOLOGY IN SABAH  
Initial report

During its first two-year period of activities, the joint CIRAD-Forêt / Innoprise Corporation Sdn Bhd (I.C.S.B.) forest biotechnology laboratory has been producing noticeable results in a development oriented research programme.

Micropropagation and isoenzyme analysis were the two main technologies specifically developed on a choice of species selected by mutual agreement, taking into account the plantation objectives of our Malaysian partner.

Micropropagation protocols were developed, giving rise to the production and acclimatization of several hundred tissue-culture-issued rattan (*Calamus manan*) plants, in addition to several thousand teak plantlets. A mass micropropagation technique was established for this latter species for mass-producing cloned tissue culture plantlets from mature genotypes. Concurrently, new methods with a view to cloning mature selected individuals of other species were developed, such as shoot apex micrografting of *Acacia mangium*.

Isoenzyme analysis of different populations of *Calamus manan* and *Calamus subinermis* helped to obtain some initial information about the genetic variation within and among populations of these two species of high market value rattan. Although *Calamus subinermis* and *Calamus manan* both showed a high genetic variability of similar level ( $H_e = 0.47$ ), the various populations investigated displayed significant genetic differences only for *Calamus manan*.

**Key words :** *Acacia mangium*. Biotechnology. *Calamus sp.* Genetic variation. Isoenzymes. Malaysia. Micropropagation. *Tectona grandis*.

## R E S U M E N

BIOTECNICAS FORESTALES EN EL SABAH  
Balance preliminar

Al término de dos años de actividades, el laboratorio común CIRAD-Forêt / Innoprise Corporation Sdn Bhd (I.C.S.B.) especializado en biotecnología aplicada a las especies forestales ha generado cierto número de experiencias en un espíritu de investigación perfectamente orientada hacia el desarrollo en las prolongaciones finales.

La micropropagación y el análisis por electroforesis de isoenzimas han constituido las tecnologías desarrolladas preferentemente acerca de una gama de especies decidida de común acuerdo, teniendo siempre en cuenta objetivos de plantaciones de nuestro asociado malayo.

Los protocolos de micropropagación han permitido producir y aclimatar varios cientos de vitroplantas de rota (*Calamus manan*) así como varios miles de teclas (*Tectona grandis*). Se ha desarrollado una técnica de microrreproducción por estacas para esta última especie, que permite la producción industrial de vitroplantas clonadas a partir de genotipos de cierta edad. Conjuntamente, se han desarrollado nuevos métodos con objeto de clonar sujetos maduros para otras especies, como, por ejemplo, la microrreproducción de ápex para *Acacia mangium*.

El análisis por los isoenzimas de diversas poblaciones de *Calamus manan* y de *Calamus subinermis* ha permitido obtener informaciones preliminares acerca de la variabilidad genética, así como de su estructuración, de estas dos especies de rotas de gran valor comercial.

A pesar de que *Calamus subinermis* y *Calamus manan* permiten ambas una variabilidad genética importante de mismo orden ( $H_e = 0,47$ ), la diferenciación genética de las poblaciones examinadas únicamente se ha podido llegar a evidenciar al tratarse de *Calamus manan*.

**Palabras clave :** *Acacia mangium*. Biotecnología. *Calamus sp.* Diversidad genética. Isoenzimas. Malasia. Micropropagación. *Tectona grandis*.

## SYNOPSIS

## FOREST BIOTECHNOLOGY IN SABAH

### Initial report

### Joint Research and Development Project between CIRAD-Forêt and Innoprise Corporation Sdn Bhd "Plant Biotech Unit"

MARIE-CLAUDE BON and OLIVIER MONTEUUIS

The "Plant Biotech Unit" is the second research and development project initiated as part of the collaboration between CIRAD-Forêt and Innoprise Corporation Sdn Bhd (I.C.S.B.), a major Malaysian forest company of Sabah, East Malaysia, northern Borneo. Although the setting up started in mid 1991, the biotechnology laboratory located in Tawau, on the east coast of Sabah, has only been operational since late 1992. The main objective of this laboratory is to develop biotechnology capabilities for direct transfer to field or for commercial transactions. One of its main roles is to support Luasong Forestry Centre research and development programmes, in close connection and in a synergic way with the Plant Improvement and Seed Production Unit (P.I.S.P.).

#### PRIORITY SPECIES AND RELEVANT BIOTECHNOLOGIES

The choice of species and relevant biotechnologies to work on in the laboratory was made taking into account the objectives of I.C.S.B., and the limitations of the existing facilities and more conventional techniques in Luasong to fulfill these objectives, according to the species.

*Tectona grandis* (teak) and *Acacia mangium* were consistently identified as the most interesting arborescent species to concentrate on, in addition to *Calamus manan*, *C. subinermis* and *C. merrillii* as far as rattans, priority species for ICBSB, were concerned.

As regards biotechnologies, micropropagation through axillary budding from microcuttings was preferably developed as the most appropriate *in vitro* vegetative propagation method to fulfill our objectives, while preference was given to isoenzyme electrophoresis for analysing the genetic diversity of rattan species.

#### MAIN RESULTS WITH ARBORESCENT SPECIES

On teak, about 80 % of the seeds inoculated after extraction from fruit followed by proper disinfection, and 20 to 30 % on

average of the disinfected nodal explants collected from mature clones gave rise to contamination-free cultures. Regardless of the origin, the *in vitro* developed microshoots could be further micropropagated according to an exponential multiplication rate of x3 every 1 to 1.5 months with insignificant mortality and degeneration, using a sole culture medium. The microshoots produced *in vitro* were easily acclimatized to outdoors, first with nursery conditions, under shade and automatic mist-system, with more than 95 % success rate. To date, more than 20 000 cloned plantlets from mature teak genotypes have been thus produced through this industrial and low cost technology, developing rapidly into vigorous and true-to-type vegetative offspring. At the same time, work on shoot apical meristem culture was pursuing giving rise to meristem-issued clonal lines.

In the same way as for teak, 80 % of *Acacia mangium* seeds inoculated in *in vitro* conditions after special treatment produced healthy cultures that could be further micropropagated. Although weaker overall than for teak, the organogenic potential for micropropagation of mature *A. mangium* ortets from nodal explants was observed to vary a lot according to the genotype, and could be very severely affected by endogenous bacterium contaminations. Applying suitable protocols, several thousand microshoots were produced for the most responsive of the mature clones introduced, which displayed some signs of rejuvenation such as juvenile-like leaves or capacity for spontaneous rooting. In order to try to overcome endogenous contamination problems, a shoot apex *in vitro* micrografting technique was developed giving rise to 60 % success on average. 40 % of these successfully established micrografts from mature genotypes resumed growth within 2 months after micrografting. So far, the new cultures initiated from these micrograft-issued shoots have not revealed any sign of endogenous bacterium contamination.

Some of these cloned micrografts were acclimatized to outdoors, in nursery conditions, to be utilized as responsive stock plants for further clonal propagation through cuttings.

#### MAIN RESULTS WITH RATTAN SPECIES

Tissue culture technology has to be considered so far as the only means of vegetatively propagating or cloning single stem rattan species. It can be very helpful too for intensifying clonal or mass vegetative propagation of multiple stem rattan species. Different protocols and culture medium sequences suitable for embryo germination, shoot development as well as shoot multiplication, and adventitious rooting were developed for *Calamus manan*, *C. subinermis* and *C. merrillii*, the highest market value rattan species. Several hundred *C. manan* tissue culture plantlets were then successfully acclimatized in nursery conditions after *in vitro* rooting with success rates of 75-80 %. Meanwhile, experiments on adventitious shoot formation and somatic embryogenesis from leaves and root tips were progressing.

In addition to and in close connection with PISP activities on seed collections and conservation plot establishment of various origins of different rattan species, isoenzyme electrophoresis technology was successfully developed on young rattan germinations and leaf portions irrespective of their age. This allowed to obtain initial information as regards the genetic variation within and among populations of *Calamus manan* and *Calamus subinermis*. Although *Calamus subinermis* and *Calamus manan* both showed a high genetic variability of similar level ( $H_e = 0.47$ ), the various populations of *Calamus manan* investigated only displayed significant genetic differentiation. More complete information is expected from additional seed collections planned to be carried out in the near future in the framework of an ongoing STD 3 EEC project.