

OLIVIER MONTEUUIS
CIRAD-Forêt

MARIE-CLAUDE BON
CIRAD-Forêt

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

PROPAGATION DU TECK PAR CULTURE *IN VITRO*



Photo 1. Production industrielle pilote de vitroplants de tecks dans les salles de culture du PBL (Plant Biotechnology Laboratory) de Tawau (Sabah, Malaisie orientale).

Après le bouturage du teck en conditions horticoles*, cet article traite de la propagation *in vitro* de cette même espèce, toujours dans le cadre du projet de collaboration entre ICSB et le CIRAD-Forêt.

Le teck (*Tectona grandis* Linn. f.) est une essence de bois d'œuvre originaire d'Asie du Sud-Est très prisée pour les caractéristiques technologiques et la valeur esthétique de son bois, également réputé pour sa durabilité. Il est de ce fait très utilisé pour les constructions navales et la menuiserie de luxe (C.T.F.T., 1990). La demande mondiale est bien supérieure aux ressources disponibles (DUPUY, 1990) et les actions de reboisement nécessitent la production de nombreux plants de la meilleure qualité possible.

L'espèce se propage traditionnellement par graines. Les semis peuvent être conservés quelques mois sous forme de « stumps » à diverses fins : transport, attente de conditions de plantations satisfaisantes (KAOSA-ARD, 1986). Ce mode de propagation sexuée présente néanmoins certains handicaps. Le nombre de graines produit par arbre est généralement faible, et la faculté germinative, variable en fonction des origines, du mode de conservation et des traitements pratiqués (KAOSA-ARD, 1986 ; WHITE, 1991), demeure globalement réduite. Par ailleurs, le matériel issu de semis se révèle hétérogène, même au sein de descendance. Cette variabilité s'exprime au niveau des paramètres de croissance et de forme, et des caractéristiques technologiques et esthétiques (BEDEL, 1989 ; DUPUY, VERHAEGEN, 1993). La sélection sur la hauteur du fût tend, en outre, à rallonger la durée des cycles de reproduction. Ce sont certains des inconvénients auxquels se heurte l'amélioration génétique de l'espèce par voie générative, en sus de l'incertitude quant à l'héritabilité de caractères d'importance économique majeure.

La multiplication végétative permet de reproduire, théoriquement à l'infini, un individu en préservant son génotype et, en conséquence, l'ensemble de ses caractéristiques (HARTMANN *et al.*, 1990). Cette particularité revêt une importance pré-

pondérante pour assurer la transmission de caractères sous contrôle génétique de type non additif, surtout lorsque ceux-ci ont un fort impact économique. Les informations disponibles à ce jour, bien que fragmentaires, incitent à ne pas négliger cet aspect (CHELIAK, ROGERS, 1990). La reproduction végétative, et particulièrement le clonage conforme d'individus sélectionnés, devrait donc permettre d'améliorer considérablement la valeur marchande des plantations de tecks en gagnant en qualité et en homogénéité (MASCARENHAS, MURALIDHARAN, 1993).

Une technique de bouturage horticole a été mise au point dans ce but dans le cadre de la collaboration entre Innoprise Corporation Sdn Bhd et le CIRAD-Forêt au Sabah, dans le nord de Bornéo (MONTEUUIS *et al.*, 1995). La création, dans le même cadre de collaboration, d'un laboratoire de biotechnologies (MONTEUUIS, 1993) nous a permis d'étudier la réactivité du teck à la culture *in vitro*, déjà testée par ailleurs (KAOSA-ARD *et al.*, 1987 ; MASCARENHAS, MURALIDHARAN, 1993 ; SUNITIBALA DEVI *et al.*, 1994). Cet article se propose de développer cet aspect et d'envisager les intérêts pratiques, plus particulièrement dans une optique de développement.

PROPAGATION IN VITRO À PARTIR DE GRAINES

Les conditions de culture *in vitro* peuvent s'avérer très utiles pour augmenter rapidement les effectifs à partir de lots de graines présumées précieuses mais en nombre insuffisant ou à faible faculté germinative. Ce peut être le cas de provenances ou de descendance particulièrement intéressantes d'un point de vue génétique, issues par exemple de croisements contrôlés.

* Cf. MONTEUUIS *et al.*, 1995.

L'effet bénéfique de la culture *in vitro* peut se ressentir, dans un premier temps, par une augmentation du taux de germination ou, dans un second temps, à travers la possibilité de multiplier végétativement le matériel germé. Le manque d'informations pour sélectionner, à un stade aussi précoce, un génotype par rapport à un autre incite généralement à propager l'ensemble sans distinction individuelle. C'est la propagation « en vrac », ou « bulk propagation », qui peut être pratiquée plus ou moins longtemps, en fonction des besoins. Les risques de rétrécissement de la base génétique initiale au fil des cycles de propagation, dans l'éventualité où certains génotypes se multiplient bien plus rapidement que d'autres, ne doivent cependant pas être sous-estimés. L'alternative de la propagation clonale, dès lors que les semis germés *in vitro* sont suffisamment développés pour être divisés, peut être appliquée en fonction des objectifs : estimation de la variabilité inter- et intracлонаle par exemple. Sur le plan pratique, cette option demeure malgré tout bien plus lourde à gérer que la propagation « en vrac ».

MÉTHODOLOGIE

La procédure consiste tout d'abord à briser les fruits, ou plus précisément les drupes arrivées à maturité, en évitant d'endommager les graines qu'elles renferment, au nombre d'une à deux en moyenne. L'opération peut s'effectuer à l'aide d'un marteau, l'épaisseur du mésocarpe et l'utilisation d'un support suffisamment souple, serviette pliée par exemple, permettant d'amortir les chocs. L'extraction d'importantes quantités de graines peut justifier l'emploi d'un réceptacle alvéolaire, de profondeur légèrement inférieure au diamètre des fruits, destiné à protéger les graines des risques d'écrasement sous l'action des coups de marteau. Sitôt extraites, le plus déli-

catement possible, celles-ci sont placées en conditions humides, au contact par exemple de papier fibreux imbibé d'eau afin d'éviter leur dessiccation. Après immersion durant 10 min. dans une solution aqueuse à 0,1 % de HgCl_2 suivie de trois abondants rinçages dans de l'eau pure stérilisée par autoclavage, les graines sont ensemencées en conditions stériles dans des tubes de culture (21 x 150 mm) recouverts de capuchons en polypropylène et contenant 10 ml d'un milieu nutritif gélifié, adapté à la germination et aux premières phases de développement. L'ensemencement d'une graine par tube permet de circonscrire les contaminations aux seules graines infectées. Toutefois, si les risques ne sont pas trop élevés et si la faculté germinative est faible, il est pratiquement bien plus avantageux d'introduire deux graines par tube qui, le cas échéant, pourront être repiquées individuellement en cas de double germination. Les cultures ainsi obtenues sont d'abord placées à l'obscurité à $24 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant deux semaines, puis transférées sous un régime photopériodique « 16 h/8 h » « jours longs », avec une intensité lumineuse de $50\text{--}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et à une température de $28/22 \pm 2^\circ\text{C}$ jour/nuît qui constituent les conditions standard. Deux à trois mois plus tard, en fonction des lots de graines, la majorité des semis germés dans ces conditions *in vitro* a atteint une hauteur de 5 à 6 cm environ.

A ce stade, les semis *in vitro* peuvent être acclimatés en vue de leur plantation au champ.

Ils peuvent aussi être micropropagés par microbouturage dès que l'axe épicotilé est suffisamment développé, en prenant conscience dès lors que l'appareil racinaire de semis d'origine sera remplacé par des racines adventives. L'opération, qui s'effectue sous hotte à flux laminaire en conditions stériles, consiste à

couper transversalement les tiges en segments nodaux de 1 à 2 cm de long. Ces microboutures doivent comporter au moins un nœud avec la portion d'axe sous-jacente plus longue que la portion sus-jacente. La surface foliaire peut être réduite de moitié, voire de deux-tiers. Le repiquage s'effectue soit en bocaux de culture, à raison de 6 microboutures par bocal lorsque les effectifs par origine le permettent, soit en tube de culture. Les bocaux de 10 cm de hauteur et 6 cm de diamètre contiennent 50 ml de milieu de culture et sont recouverts d'un capuchon en polycarbonate. Le milieu de culture a été conçu pour favoriser l'élongation des pousses et leur multiplication par bourgeonnement axillaire. L'addition d'un seul régulateur de croissance à faible dose permet d'éviter les risques de phytotoxicité par accumulation tissulaire, à terme, et de garantir le maximum de conformité génétique. Les cultures sont maintenues en conditions d'environnement standard stipulées précédemment.

La périodicité des sub-cultures est de deux mois, à l'issue desquels les explants, après avoir été sectionnés comme indiqué préalablement, sont repiqués sur milieu frais ou sont expédiés pour la phase d'enracinement/acclimatation. Celle-ci consiste à immerger, durant quelques minutes, les microboutures extraites des récipients de culture (indépendamment des racines adventives qu'elles ont pu former spontanément *in vitro*) dans une solution aqueuse titrant 5 g/l de Thirame, avant repiquage dans les bacs de bouturage remplis de sable, sous « mist-system » et 50 % d'ombrage. Aucune substance rhizogène n'est appliquée. La fréquence des pulvérisations du « mist-system » est régulée automatiquement par une sonde de type « feuille électronique » (HARTMANN *et al.*, 1990). Les conditions d'environnement sont les mêmes que celles

décrites pour le bouturage horticole (MONTEUUIS *et al.*, 1995). Trois semaines plus tard, les tigelles enracinées sont transplantées en containers cylindriques de polyéthylène noir de 10 × 15 cm, remplis de substrat d'élevage à base de terre superficielle locale argilo-limoneuse. L'ombrage de 50 % est maintenu, mais la fréquence du *mist system* est réduite de moitié. Après trois semaines dans ces conditions, les plants sont transférés en pépinière où, à l'issue de trois mois de culture intensive, ils atteindront un développement suffisant – 30 à 40 cm de haut environ – pour être plantés (photos 2 à 6).

RÉSULTATS

□ Obtention de semis *in vitro*

Environ 50 000 graines de teck de diverses origines ont déjà été introduites *in vitro* en appliquant la procédure décrite précédemment. Une étude comparative regroupant 24 000 graines correspondant à 10 origines géographiques différentes et 57 descendances du verger à graines de La Sangoué en Côte-d'Ivoire, à faible faculté germinative présumée, a permis d'observer deux mois après introduction un certain nombre de résultats :

- Le taux de réussite, défini par le nombre de semis d'apparence normale et suffisamment vigoureux pour être acclimatés par rapport au nombre de graines initialement introduites N_i , varie entre 2 et 57 % selon les origines géographiques, avec une valeur moyenne de 30 %. Ce taux fluctue entre 0 et 64 % pour les descendances, bornant une valeur moyenne de 19 %.
- Le taux de contaminations – nombre de graines et de semis contaminés par rapport à N_i – varie de 5 à 76 % en fonction des origines géographiques, avec 26 % comme valeur moyenne. En ce qui

concerne les descendances, ce taux fluctue entre 2 et 73 %, avec 21 % pour valeur moyenne.

- Le taux moyen de plantules anormales, déterminé là encore par rapport à N_i – est de 17 % pour les origines géographiques, avec 4 % et 32 % comme valeurs extrêmes. Ce taux est de 12 % pour les descendances, et varie de 0 (lots n'ayant pas germé) à 53 %.
- Le taux de graines non contaminées n'ayant pas germé à l'issue des deux mois de mise en culture, calculé par rapport à N_i , fluctue de 3 à 47 % en fonction des différentes origines géographiques, avec 28 % comme valeur moyenne. Selon les descendances, ce même taux varie de 0 à 98 % ; la valeur moyenne correspondante est de 47 %.

□ Micropropagation des semis *in vitro*

Le coefficient de multiplication est de 3 au terme de chaque subculture de deux mois, ce qui correspond à un accroissement exponentiel des effectifs au cours du temps de la forme 3^n , n étant le nombre de subcultures. Il s'agit d'un coefficient de multiplication moyen et réaliste, établi sur quatre années à partir de plusieurs milliers de microboutures de différentes origines géographiques et génétiques, et en tenant compte des pertes éventuelles. Le taux d'enracinement spontané sur le milieu d'allongement/multiplication de base se situe autour de 80 % lors des premiers cycles de culture ; il se stabilise ultérieurement autour de 60-70 %.

Indépendamment du fait qu'elles aient développé des racines *in vitro* ou non, les microboutures s'accliment avec un taux de succès supérieur à 90 %. Il s'agit là encore d'un taux moyen, correspondant à plusieurs milliers de microboutures d'origines diverses acclimatées à différentes dates.

MICROPROPAGATION DE GÉNOTYPES SÉLECTIONNÉS *IN VIVO*

Les génotypes sélectionnés *in vivo*, pour être micropropagés *in vitro*, peuvent être d'âge très variable et se présenter tout aussi bien sous la forme de sujets *in situ* que de piedsmères en pépinière, dès lors qu'il est possible de disposer de bourgeons.

Les portions d'axes végétatifs, d'une part, et les méristèmes primaires caulinaires, d'autre part, ont été les deux types d'explants primaires retenus pour micropropager le teck avec le maximum de garanties au niveau de la conformité génotypique (HAINES, 1994).

À PARTIR DE PORTIONS D'AXES VÉGÉTATIFS

□ Méthodologie

Les portions mononodales et terminales d'axes végétatifs sont prélevées préférentiellement sur des pousses herbacées ou semi-ligneuses, de diamètre inférieur à 1,5 cm, qui peuvent être obtenues à partir de rondins placés en conditions de forçage (MONTEUUIS *et al.*, 1995) ; les axes ligneux posent plus de problèmes de désinfection. Les tiges récoltées peuvent être transportées effeuillées, à l'abri du soleil et en conditions suffisamment humides. Au laboratoire, les pousses sont débarrassées de leurs feuilles par sectionnement du pétiole au sécateur à une distance suffisante de l'axe, en veillant à ne pas endommager les bourgeons – « yeux » – axillaires, puis débitées en segments d'une dizaine de cm de long. Après immersion durant 30 min. dans une solution de 0,25 % de $HgCl_2$, suivie de trois abondants rinçages dans de l'eau pure stérilisée par autoclavage, ces tronçons sont sectionnés à l'aide de scalpels, en conditions stériles, sous hotte à flux laminaire, en

DU LABORATOIRE AUX PLANTATIONS : ÉTAPES SUCCESSIVES DE LA PRODUCTION INDUSTRIELLE PILOTE DE VITROPLANTS DE TECK



Photo 2



Photo 3



Photo 4



Photo 5

Photo 2. Production intensive de microboutures en boîtes de culture.

Photo 3. Phase d'enracinement-acclimatation sous « mist-system » en conditions *ex vitro* de pépinière.

Photo 4. Phase de durcissement après repotage en conteneurs remplis de substrat d'élevage ; la fréquence du « mist-system » est réduite de moitié par rapport à la phase précédente d'enracinement-acclimatation.

Photo 5. Phase d'élevage-éducation en pépinière.

Photo 6. Vitroplant quatre mois après plantation.



Photo 6

portions mononodales ou terminales de 1 à 2 cm de long. Celles-ci sont introduites individuellement en tubes de culture, placés quelques jours dans les conditions d'obscurité totale décrites pour les germinations. Les segments nodaux de diamètre compris entre 0,5 et 1,5 cm peuvent être divisés longitudinalement en deux explants primaires portant chacun un bourgeon et introduits dans deux tubes différents, afin d'éviter de perdre systématiquement deux sources virtuelles de pousses en cas de contamination de l'explant. En appliquant ce procédé, 6 à 12 explants primaires environ sont susceptibles d'être introduits *in vitro* à partir d'une tige prélevée en conditions *in vivo*. Les tubes contiennent 10 ml de milieu de culture gélifié conçu pour stimuler le « débourrement » des bourgeons et la production de pousses (photo 7). Celles-ci, lorsqu'elles ne présentent pas de signes de contamination et dès qu'elles mesurent 1 cm de long (photo 8), sont excisées. Elles sont transférées en tubes de culture pendant une à deux sub-cultures, afin de s'assurer de leur état sanitaire avant le repiquage en bocal, dans les conditions de micropropagation décrites précédemment. L'acclimatation puis l'élevage en pépinière s'effectuent également comme pour les microboutures issues de germination *in vitro*.

Résultats

Les relevés effectués à partir de plusieurs génotypes et différentes dates d'introduction ont permis d'observer que, selon les manipulateurs, 5 à 30 % des explants primaires mis en culture produisent des pousses utilisables pour initier les cultures. La phase de réactivation, ou rajeunissement physiologique (MONTEUUIS, 1989), nécessite, en fonction des génotypes et de leur âge, une durée de 4 à 8 mois. Au terme de cette période, le matériel végétal « réactivé » se microbouture par bourgeon-

INTRODUCTION *IN VITRO* DE MATÉRIEL RÉCOLTÉ *IN VIVO*

□ Sous forme de portions mononodales de 1 à 2 cm de long



Photo 7. Premiers stades de développement des pousses axillaires.



Photo 8. Stade de développement plus avancé permettant de séparer la nouvelle pousse de l'explant primaire et d'amorcer le régime des sub-cultures.

□ Sous forme de méristèmes végétatifs caulinaires



Photo 9. Méristème après deux semaines de culture sur milieu d'initiation.



Photo 10. Explant issu de culture de méristème après quatre semaines de culture sur milieu d'initiation.

nement axillaire avec des taux de multiplication identiques à ceux des jeunes semis, soit 3, voire plus, à l'issue de chaque subculture de deux mois. 50 à 60 % des microboutures s'enracinent alors spontanément, comme le matériel juvénile, ce qui témoigne également du rajeunissement physiologique des génotypes sélectionnés âgés.

Ces observations correspondent à une période de trois ans de culture *in vitro* de plusieurs génotypes âgés de 6 à 15 ans, florifères, et donc physiologiquement matures en conditions naturelles (HACKETT, 1985 ; WAREING, 1987). L'étude a été affinée en comparant un génotype de 15 ans à sa descendance de semis *in vitro*. Plusieurs milliers de microboutures ont été ainsi produites à ce jour et acclimatées, en l'absence de traitement rhizogène particulier, dans les mêmes conditions que les microboutures de semis *in vitro*, avec des taux de succès supérieurs à 90 %.

À PARTIR DE MÉRISTÈMES PRIMAIRES CAULINAIRES

□ Méthodologie

Après désinfection superficielle des bourgeons terminaux par une rapide pulvérisation d'éthanol à 70 %, les jeunes feuilles et les ébauches foliaires sont excisées à l'aide d'éclats de lames de rasoirs montées sur mandrins d'horloger. Ce travail s'effectue sous loupe binoculaire jusqu'à ce que le dôme méristématique, et éventuellement les primordia en fonction du plastochrone, en position opposée décussée, soient bien dégagés. L'ensemble, dont la taille hors tout est de 0,3 mm, est alors excisé et mis en culture dans des boîtes de Pétri en polystyrène de 3,5 cm de diamètre contenant 4ml de milieu gélifié adapté, à raison de 5 méristèmes par boîte de Pétri.

Toutes ces opérations se déroulent sous hotte à flux laminaire, en condi-

tions stériles, avec le maximum de précautions et de rapidité.

Les repiquages sur milieux « frais » s'effectuent toutes les deux semaines. Après deux à trois mois, les pousses de 5 à 10 mm issues des méristèmes sont transférées en tubes, dans les mêmes conditions que les cultures initiées à partir de portions monodales ou terminales.

□ Résultats

Entre 7 000 et 8 000 méristèmes primaires apicaux de génotypes âgés – 6 à 50 ans – de teck ont été mis en culture afin de définir les protocoles de régénération du teck par culture de méristèmes. La méthodologie établie permet actuellement de régénérer des lignées issues d'un seul méristème, ou « mériclonales », à partir de 60 % de l'effectif de méristèmes introduits à l'origine en culture primaire (photos 9 et 10). Six mois plus tard, ce matériel se micropropage *in vitro* avec les mêmes capacités organogènes que les microboutures issues de semis *in vitro*. L'acclimatation s'effectue également

avec des taux de succès avoisinant 95 %. Des « mériclones », certains représentés par plusieurs milliers d'individus, ont été ainsi produits durant les trois dernières années par le projet pour être installés, notamment, en parcelles expérimentales (photo 11).

INTÉRÊT POUR LE DÉVELOPPEMENT

Les observations réalisées durant les quatre dernières années, à partir des protocoles mis au point au laboratoire de biotechnologies de Tawau, indiquent que le teck réagit remarquablement bien aux conditions de culture *in vitro*, contrairement à nombre d'autres espèces arborescentes forestières (HAINES, 1994).

Les graines placées *in vitro* dans les conditions stipulées ont germé dans des proportions nettement supérieures, soit 21 % en moyenne, aux résultats obtenus pour les mêmes lots de graines en pépinière, où le taux



Photo 11. Bloc « mériclonal » de teck – issu de la culture *in vitro* d'un seul méristème – quatre mois après plantation, récemment mis en place et poussant bien malgré une forte concurrence des adventices.

de germination moyen était de 4 % pour les graines extraites des fruits ou de 11 % lorsque les fruits sont alternativement immergés, puis séchés au soleil (rapport d'activités PISP, 1996). La germination *in vitro* peut, dans des cas similaires de faible capacité germinative, permettre de sauver certains lots et d'assurer leur représentativité tout en augmentant le « gene pool » disponible. L'intérêt est manifeste pour les programmes de conservation *ex situ* et d'amélioration de l'espèce, à différents niveaux.

Les conditions *in vitro* permettent également de mieux étudier la faculté germinative des graines, en fonction de leur origine, et les anomalies de développement précoce susceptibles d'affecter certains lots, comme présenté.

L'obtention de cultures saines et réactives constitue la phase la plus critique de la micropropagation de matériel poussant en conditions naturelles.

Le protocole de désinfection actuellement en vigueur permet, de façon routinière, d'initier des cultures saines et réactives à partir de portions mononodales et terminales d'axes végétatifs provenant de génotypes d'âges variables en conditions naturelles. Les efforts faits pour améliorer les taux de réussite en culture primaire se poursuivent néanmoins, à l'occasion des fréquentes introductions de nouveaux matériels.

L'initiation de cultures à partir de méristèmes primaires caulinaires requiert plus de finesse, de concentration et d'habileté de la part du manipulateur. A titre indicatif, une personne compétente peut introduire 100 méristèmes en quatre heures. Sous réserve de disposer en quantités suffisantes d'extrémités caulinaires apicales, le rendement en termes de cultures primaires initiées avec succès peut être nettement supérieur à celui obtenu par la technique précédente. La culture de méristèmes permet d'introduire *in vitro*

du matériel végétal indemne de germes pathogènes exogènes et surtout endogènes qu'il est très difficile d'éradiquer par d'autres moyens (HARTMANN *et al.*, 1990). Elle peut être adaptée à l'introduction *in vitro* de génotypes à proximité des zones de récoltes *in situ*, étant donné le faible encombrement des boîtes de culture, la proximité d'une flamme assez puissante réduisant les risques de contaminations atmosphériques. Enfin, la culture de méristèmes devrait permettre de développer des protocoles de cryoconservation adaptés à l'espèce, dont l'intérêt pour le stockage de germplasma *ex situ* est évident (HAINES, 1994).

Indépendamment de l'origine et des techniques d'introduction du matériel végétal, le protocole de micropropagation a été conçu dans la perspective d'une production intensive de vitroplants de teck conformes à moindre coût.

Ce protocole repose sur un milieu d'élongation-multiplication de base unique, avec une concentration minimale en substance de croissance. Simples de composition, les solutions les plus économiques ont été adoptées quant au choix de certains composants et autres produits consommables.

Le fait d'enraciner et d'acclimater directement les microboutures produites en conditions horticoles (KAOSA-ARD *et al.*, 1987 ; KAOSA-ARD, APAVATJUT, 1988) permet également de réduire considérablement les coûts de production *in vitro* (MONTEUUIS, BON, 1987), tout en assurant des taux de réussite supérieurs à 90 %.

L'expérience montre que ces tâches peuvent être confiées à du personnel sans formation initiale particulière, dès lors que les manipulateurs sont attentifs, motivés et sérieux.

Cette procédure, applicable à des génotypes de teck d'âge variable, s'avère plus simple que certains protocoles publiés récemment en la ma-

tière (MASCARENHAS, MURALIDHARAN, 1993 ; SUNITIBALA DEVI *et al.*, 1994). Elle nous a permis de produire à ce jour, et à titre expérimental, quelque 50 000 microboutures dans des conditions économiques fort intéressantes. Cette production pilote laisse entrevoir de belles perspectives quant à la propagation du teck par culture *in vitro*.

Le matériel germé *in vitro*, ou introduit en culture à partir de génotypes d'âges variables en conditions naturelles, peut être micropropagé à diverses fins :

- Constitution de « banques de gènes » (CHELIAK, ROGERS, 1990 ; HAINES, 1994) ou, plus modestement, de collections de génotypes en préservant au cours du temps la réactivité du matériel sélectionné dans un encombrement beaucoup plus réduit que les conservatoires traditionnels, lourds à gérer.
- Production de boutures à partir de génotypes sélectionnés pour la mise en place de vergers à graines « francs de pied », afin d'éviter les problèmes d'« illégitimes », lorsque le porte-greffe supplante le greffon.
- Production en masse et intensive de boutures de qualité génétique supérieure destinées aux reboisements. Celles-ci peuvent être micropropagées soit « en vrac », à partir de graines comme mentionné précédemment ou dans le cas de variétés polyclonales par exemple, soit sous forme de clones (photo 12). Le coût de revient *in vitro* et le bon comportement à l'acclimatation, puis dans les stades ultérieurs de pépinière et en plantations (photos 13 et 14), nous incitent à envisager de plus en plus cette option. Il semblerait en effet que, dans le cas du teck, la technique de micropropagation mise au point soit tout à fait compétitive, voire plus avantageuse que la solution horticole. Ce n'est pas le cas de bien d'autres espèces pour lesquelles la culture *in vitro* serait plutôt préconisée dans le but de réactiver



Photo 12. Bloc monoclonal, quatre mois après plantation, de vitroplants de teck issus d'un génotype âgé (15 ans minimum).



Photo 14. Vitroplants de teck un an après plantation.



Photo 13. Aperçu de la morphologie de l'appareil racinaire de type adventif d'un vitroplant de teck un an après plantation.

l'aptitude organogène de certains génotypes ultérieurement bouturés à grande échelle, et à moindre coût, sous la forme de pieds-mères en pépinière (MONTEUUIS, BON, 1987).

Le fait d'avoir développé la micropropagation *in vitro* et le bouturage horticole du teck au sein du même

projet permet de comparer, sur des bases relativement fiables, ces deux options qui peuvent se compléter. L'étude comparative est en cours, essentiellement d'un point de vue économique, facteur déterminant pour des perspectives de développement industriel. Si la solution *in vitro* doit tenir compte de l'amortissement du

laboratoire, elle s'affranchit en revanche de tous les aspects inhérents aux parcs à pieds-mères, et à leur gestion adéquate, par du personnel compétent qui conditionne le succès du bouturage horticole (MONTEUUIS *et al.*, 1995). Un autre avantage de la micropropagation réside dans la possibilité d'expédier les plants *in vitro* vers des destinations lointaines en bénéficiant des immunités phytosanitaires indispensables pour les envois internationaux. De larges perspectives de marché peuvent en découler, d'autant plus justifiées et bénéfiques pour les plantations de teck que le matériel végétal diffusé sera de qualité. □

► Olivier MONTEUUIS
Marie-Claude BON
CIRAD-Forêt/Baillarguet
B.P. 5035
34032 MONPELLIER CEDEX 1
France

► Doreen K. S. GOH
I.C.S.B.
Po. Box 60793
91017 TAWAU
Sabah
Malaysia

Cet article sera publié en anglais dans le prochain numéro.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEDEL P. E., 1989.
Preliminary observations on variability of teak in India. *Indian For.* 115 (2) : 72-81.
- CHELIAK W. M., ROGERS D. L., 1990.
Integrating biotechnology into tree improvement programs. *Can. J. For. Res.* 20 : 452-463.
- C.T.F.T., 1990.
Teck. *Bois et Forêts des Tropiques* 224 : 39-47.
- DUPUY B., 1990.
Notes de voyage en Chine tropicale lors d'un séminaire régional sur le teck. *Bois et Forêts des Tropiques* 226 : 69-76.
- DUPUY B., VERHAEGEN D., 1993.
Le teck de plantation *Tectona grandis* en Côte-d'Ivoire. *Bois et Forêts des Tropiques* 235 : 9-24.
- HACKETT W. P., 1985.
Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants. *Horticultural reviews* 7 : 109-155.
- HAINES R., 1994.
Biotechnology in forest tree improvement. Rome, Italie, FAO Forestry Paper 118, 230 p.
- HARTMANN H. T., KESTER D. E., DAVIES F. T., 1990.
Plant propagation : principles and practices, 5^e éd. Englewood Cliffs, New Jersey, U.S.A., 647 p.
- KAOSA-ARD A., 1986.
Teak, *Tectona grandis* Linn. f. : nursery techniques, with special reference to Thailand. Seed leaflet n° 4. Humlebaek, Danemark, Danida Forest Seed Center, 42 p.
- KAOSA-ARD A., APAVATJRUT P., PARATASILPIN T., 1987.
Teak (*Tectona grandis* Linn. f.) tissue culture. In : His Majesty's Fifth Cycle Commemorative Conference of USAID Science Research Award, Nakorn Prathom, Thaïlande, 24-26 juillet 1987, 9 p.
- KAOSA-ARD A., APAVATJRUT P., 1988.
Teak (*Tectona grandis* Linn. f.) tissue culture : rooting and transplanting techniques. In : P.S.T.C. Conference on Biotechnology for Health and Agriculture, Washington DC, U.S.A., 6-9 juin 1988, 12 p.
- MASCARENHAS A. F., MURALIDHARAN E. M., 1993.
Clonal forestry with tropical hardwoods. In : Clonal forestry II, conservation and application. Berlin, Heidelberg, Allemagne, Springer Verlag, p. 169-187.
- MONTEUUIS O., 1989.
Maturation concept and possible rejuvenation of arborescent species. Limits and promises of shoot apical meristems to ensure successful cloning. In : Symposium IUFRO : Breeding Tropical Trees, Pattaya, Thaïlande, 28 novembre-3 décembre 1988. Oxford, U.K., Oxford Forestry Institute ; Arlington, Virginia, U.S.A., Winrock International, p. 106-118.
- MONTEUUIS O., 1993.
Biotechnologies au Sabah. *Bois et Forêts des Tropiques* 236 : 57-59.
- MONTEUUIS O., VALLAURI D., POUPARD C., HAZARD L., YUSOF Y., WAHAP L. A., GARCIA C., CHAUVIERE M., 1995.
Propagation clonale de tecks matures par bouturage horticole. *Bois et Forêts des Tropiques* 243 : 25-39.
- MONTEUUIS O., BON M.-C., 1987.
Enracinement et acclimatation de vitro-plants forestiers. In : Symposium Florizel 87 : Plant micropropagation in horticultural industries, Arlon, Belgique, 10-14 août 1987. Liège, Belgique. Presses Universitaires, p. 160-169.
- SUNITIBALA DEVI Y., MUKHERJEE B. B., GUPTA S., 1994.
Rapid cloning of elite teak (*Tectona grandis* Linn.) by *in vitro* multiple shoot production. *Indian Journal of Experimental Biology* 32 : 668-671.
- WAREING P. F., 1987.
Phase change and vegetative propagation. In : Improving vegetatively propagated crops. Londres, U.K., Acad. Press, p. 263-270.
- WHITE K. J., 1991.
Teak : some aspects of research and development. FAO Regional Office for Asia and the Pacific (RAPA), publication 1991/17, 53 p.

R É S U M É

PROPAGATION DU TECK PAR CULTURE *IN VITRO*

Les possibilités de propager le teck par culture *in vitro* ont été analysées sur des bases réalistes de production dans le cadre d'un projet de Recherche-Développement au Sabah (Malaisie orientale). Les conditions *in vitro* définies permettent d'améliorer sensiblement la germination de lots de graines à faible faculté germinative. Les semis obtenus *in vitro* peuvent être ultérieurement micropropagés. Le protocole de micropropagation, simple de conception, permet de multiplier végétativement, par microbouturage de pousses issues de bourgeonnement axillaire, des génotypes de tecks germés *in vitro*, ou d'âges variables poussant en conditions naturelles. Dans ce dernier cas, l'introduction se fait sous forme de portions mononodales ou terminales, de 1 à 2 cm de long, d'axes végétatifs préférentiellement en croissance active. L'initiation des cultures peut également se faire sous forme de méristèmes primaires caulinaires avec 60 % de succès. Quelle que soit leur origine, les génotypes se multiplient de façon exponentielle à raison de 3^n , n étant le nombre de subcultures de deux mois. L'acclimatation sous « mist-system » en conditions de pépinière s'effectue avec plus de 90 % de succès. Les plants se développent de façon tout à fait satisfaisante durant 3-4 mois de culture en pépinière avant de pouvoir être plantés.

A ce jour, 50 000 vitroplants ont été produits à titre expérimental dans des conditions économiques très avantageuses en appliquant ce protocole conçu pour favoriser une production intensive de plants de tecks de qualité supérieure. Sur ces bases, l'intérêt de la culture *in vitro* pour propager des génotypes sélectionnés de teck par rapport au bouturage horticole est analysé, essentiellement dans une perspective de développement.

Mots-clés : *Tectona grandis*. Adaptation. Facteurs du milieu. Clonage. Génotypes. Germination. Culture *in vitro*. Micropropagation. Vitroplants.

A B S T R A C T

PROPAGATION OF TEAK BY *IN VITRO* CULTURE

Possibilities of propagating teak by *in vitro* culture were assessed from a realistic standpoint of production within the framework of a Research and Development project in Sabah (East Malaysia). The tissue culture conditions developed noticeably improved the germination rate of poor germination capacity seed lots. Those obtained *in vitro* could be further micropropagated. The micropropagation protocol was conceived as simply as possible to multiply vegetatively, through axillary budding-derived shoots, teak genotypes issuing from *in vitro* germination or of different ages growing outdoors. For this latter type of plant material, the cultures were initiated using 1 to 2 cm long mononodal portions collected from preferably actively growing shoots. Cultures could also be initiated from shoot apical meristems with a success rate of 60 %. Regardless of their origin, the genotypes were micropropagated according to an exponential multiplication rate of 3^n , with n as the number of the 2-month-duration subcultures. Acclimatization was carried out under mist-system in nursery conditions with more than 90 % success. The tissue-culture produced plants developed vigorously during 3 to 4 months of culture in nursery until they reached a suitable size for planting out.

To date, 50,000 *in vitro* plants have been produced on an experimental scale and at low cost applying this protocol that is suitable for intensive production of superior quality teak planting stock. Considering these achievements, the prospects of *in vitro* culture for propagating selected teak genotypes compared to what can be expected from propagation by rooted cuttings are discussed, mainly from a development point of view.

Key words : *Tectona grandis*. Adaptation. Environmental factors. Cloning. Genotypes. Germination. *In vitro* culture. Micropropagation. Vitroplants.

R E S U M E N

PROPAGACIÓN DE LA TECA POR CULTIVO *IN VITRO*

Se ha procedido al análisis de las posibilidades de propagar la teca por cultivo *in vitro* fundándose en bases realistas de producción en el marco de un proyecto de Investigación y Desarrollo (I&D) en Sabah (Malasia oriental). Las condiciones *in vitro* definidas permiten mejorar de forma apreciable la germinación de lotes de semillas de reducida facultad germinativa. Las siembras obtenidas *in vitro* se pueden micropropagar ulteriormente. El protocolo de micropropagación, que obedece a un concepto sencillo, permite multiplicar, vegetativamente, por microreproducción mediante estacas de vástagos procedentes de brotes axilares de genotipos de tecas germinadas *in vitro*, o de edades variables que se desarrollan en condiciones naturales. En este último caso, la introducción se efectúa en forma de porciones mononodales o terminales de 1 a 2 cm de longitud de ejes vegetativos en crecimiento activo, preferentemente. La iniciación de los cultivos se puede efectuar, asimismo, en forma de merisistemas primarios caulinares con la probabilidad de un 60 % de logros. Sea cual fuere su origen, los genotipos se multiplican de forma exponencial a razón de 3^n , siendo n el número de subcultivos de dos meses. La aclimatación en forma de mist-system en condiciones de vivero se efectúa con más de un 90 % de logros. Las plantas se desarrollan de forma perfectamente substancial durante 3 a 4 meses de cultivo en vivero antes de poder ser trasplantadas.

Hasta la fecha, se han producido 50 000 vitroplantas a título experimental en condiciones económicas sumamente ventajosas, aplicando este protocolo diseñado para propiciar una producción intensiva de plantas de teca de calidad superior. Con arreglo a estas bases, se analiza el interés del cultivo *in vitro* para la propagación de genotipos seleccionados de teca, por comparación con el procedimiento hortícola por estacas, y principalmente, situándose en una perspectiva de desarrollo.

Palabras clave : *Tectona grandis*. Adaptación. Factores ambientales. Clonación. Genotipos. Germinación. Cultivo *in vitro*. Micropropagación. Vitroplantas.