

Divers aspects de l'utilisation possible des cultures «*in vitro*» pour la multiplication végétative de l'*Ananas comosus* L. MERR, variété 'Cayenne lisse'.

C. PANNETIER et C. LANAUD*

DIVERS ASPECTS DE L'UTILISATION POSSIBLE DES CULTURES «IN VITRO» POUR LA MULTIPLICATION VEGETATIVE DE L'ANANAS COMOSUS L. MERR, VARIETE 'CAYENNE LISSE'

C. PANNETIER et C. LANAUD

Fruits, dec. 1976, vol. 31, n°12, p. 739-750.

RESUME - L'utilisation des techniques de culture *in vitro* permet d'aborder un certain nombre de problèmes posés par la multiplication végétative de l'ananas, en particulier au niveau du taux de multiplication.

Grâce à un choix précis du matériel végétal et des méthodes de culture, deux types de multiplication végétative *in vitro* ont pu être obtenus.

Dans l'un et l'autre cas le matériel végétal de départ est constitué de bourgeons axillaires de couronnes.

Il s'agit, d'une part d'un bouturage simple afin d'obtenir le démarrage de bourgeons présents sur les boutures (fragments d'axes de jeunes plantes obtenues *in vitro*) ; d'autre part on provoque une ramification intensive à partir d'un implant primaire, préalablement démarré *in vitro* et isolé sur un milieu de culture particulier. C'est cette dernière méthode qui s'est révélée la plus efficace et qui doit pouvoir offrir des possibilités d'application à brève échéance.

Nous avons essayé, dans le cadre de ce travail, d'apporter au moyen des techniques de culture *in vitro*, des éléments de réponse aux problèmes de la multiplication végétative de l'ananas.

Nous avons travaillé sur le cultivar Cayenne lisse de l'espèce *Ananas comosus* L. MERR, le plus cultivé dans le monde.

Nous rappellerons brièvement les traits morphologiques marquants de cette plante en nous référant plus spécialement aux travaux de B.H. KRAUSS (1948), de C. PY et M.-A. TISSEAU (1965).

L'individu adulte (1 m environ de hauteur) possède une

tige relativement réduite (30 cm) à entre-nœuds très courts et possède 70 à 80 feuilles dont les variations morphologiques ont déjà été décrites (C.P. SIDERIS et B.H. KRAUSS, 1936). Outre le bourgeon terminal (couronne) surmontant le fruit, on observe un bourgeon à l'aisselle de chacune des feuilles. Ces bourgeons axillaires restent généralement à l'état latent à l'exception de quelques-uns qui produisent les rejets dans les conditions naturelles. Selon leur niveau d'insertion sur la plante-mère, trois types de rejets sont distingués :

- les **cayeux** ou **rejets de tige** (on distingue des cayeux de base qui, encore fixés sur la plante-mère, émettent des racines qui pénètrent en terre),
- les **bulbilles** qui se développent sur le pédoncule floral à partir de bourgeons axillaires,
- enfin les «**chapas**», issus de la région intermédiaire entre la

* - Laboratoire de Morphologie végétale expérimentale, associé au CNRS. Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, 91405 ORSAY.

tige et le pédoncule. Signalons que ces derniers sont souvent, dans la pratique, assimilés aux cayeux (C. PY).

L'ananas est une plante multipliée végétativement, tant lors de la sélection que pour la propagation des variétés et ces différents types de rejets peuvent être utilisés.

Cependant seuls les cayeux sont formés tout au long de l'année et sont susceptibles de poursuivre leur développement sur le plant-mère tant qu'on ne les détache pas de celui-ci ; en général ils sont peu nombreux. Les bulbilles ne sont abondantes que durant quelques mois (C. PY, 1965).

Enfin, les couronnes ne peuvent évidemment pas être utilisées en cas de commercialisation de fruits frais.

De ce fait, le taux de multiplication est faible, donc le délai nécessaire à la propagation d'une variété sélectionnée relativement important, d'autant plus qu'on est souvent contraint de planter certains rejets à une période de l'année qui ne leur est pas la plus favorable.

Un autre inconvénient est que cette multiplication végétative s'accompagne d'une hétérogénéité plus ou moins marquée de la floraison et de la fructification.

Afin d'accroître le taux de multiplication végétative de l'ananas, différentes méthodes ont été mises au point :

- multiplication par boutures de portions de tige (B. TKATCHENKO, 1947 ; C. PY et P. ESTANOVE, 1964),
- multiplication par boutures de feuilles associées à leur bourgeon axillaire («leaf bud», K.K. SEOW et Y.C. WEE, 1970),
- et plus récemment multiplication par suppression de la dominance apicale.

Certains auteurs ont également tenté d'aborder ces problèmes de multiplication végétative par l'utilisation des cultures *in vitro*. Ils ont obtenu, dans ce domaine, divers résultats intéressants. Nous citerons l'utilisation de fragments de couronnes (AGHION et BEAUCHESNE, 1960), l'obtention de plantes par bouturage de portions de cayeux (LAKSMI CITA G. et col., 1974). Signalons également les travaux de C.K.H. TEO (1974) qui obtient une multiplication par l'intermédiaire de plantes «néoformées» sur cal. Enfin M.O. MAPES (1974) a mis en évidence la possibilité d'une multiplication végétative par culture de méristèmes.

Les résultats que nous avons obtenus s'inscrivent dans la continuité de ces travaux ; ils sont en relation avec ceux obtenus au laboratoire sur d'autres plantes et avec les enseignements généraux tirés par R. NOZERAN et L. BANCILHON (1972) sur les cultures *in vitro* de végétaux.

IMPLANTATION PRIMAIRE DE BOURGEONS

«*IN VITRO*»

Matériel végétal et technique utilisés.

Choix du matériel.

Lors du premier travail exploratoire nous avons recherché quels sont les types de bourgeons qui peuvent être efficacement implantés.

Dans les conditions de culture utilisées, les bourgeons axillaires des feuilles portées par le pédoncule floral ne démarrent pas *in vitro* (et cela bien qu'ils aient été prélevés à différents stades de leur développement). De même, aucun résultat positif n'a pu être obtenu à partir de portions de cayeux. Par contre, les bourgeons axillaires de feuilles portées par les tiges démarrent dans un certain nombre de cas. Mais les meilleurs résultats, en particulier du point de vue du développement et de la vigueur des jeunes plantes obtenues, ont été le fait de la mise en culture de bourgeons axillaires de feuilles de couronnes, au stade «deux mois après la floraison».

Les couronnes doivent être entières et non écimées («réduites») comme on le pratique en vue de la commercialisation des fruits frais. En effet, la blessure détermine l'installation d'un grand nombre de microorganismes qu'il est très difficile d'éliminer. D'autre part, ces couronnes ne doivent pas avoir subi de traitement antifongique, car, dans ce cas, la levée d'un certain nombre de phénomènes de compétition entre bactéries et champignons provoque un important développement bactérien lors de la mise en culture. Des traitements par antibiotiques n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants.

Dans un souci d'homogénéité, seule la partie médiane de la couronne est utilisée. La partie basale est pratiquement impossible à stériliser et, dans la partie apicale, les feuilles sont trop imbriquées les unes dans les autres pour permettre la localisation et le prélèvement des bourgeons axillaires. Il nous faut signaler en effet que sur le type de couronnes choisi (au stade «deux mois après la floraison»), les bourgeons sont de taille très réduite et se présentent en fait comme de petits renflements (souvent décelables uniquement à la loupe binoculaire) situés au milieu de l'aisselle de la feuille axillante. En fait les couronnes sont fragmentées et ce sont des fragments de couronnes porteurs d'un bourgeon qui sont mis en culture. En moyenne 30 à 35 bourgeons sont utilisables par couronne.

Stérilisation du matériel.

En nous inspirant, dans un premier temps, de la technique utilisée par D. AGHION et BEAUCHESNE (1960), différentes méthodes de stérilisation ont été expérimentées. Nous avons fait agir un ou plusieurs agents stérilisants

(merceryl laurylé, alcool, hypochlorite de calcium) et d'autre part nous avons travaillé soit sur des couronnes non fragmentées soit sur des couronnes progressivement fractionnées et plongées dans des bains successifs stérilisants.

Le choix entre les différentes méthodes s'avère très difficile. En effet les résultats sont essentiellement fonction de la couronne traitée.

En particulier au sein d'un même lot de couronnes (même âge et même période de récolte) les résultats peuvent être très différents d'une couronne à l'autre. Ainsi pour des lots de couronnes de même âge (deux mois après la floraison) nous avons observé 10 p. cent d'infections pour le premier envoi (mois d'avril) et plus de 50 p. cent pour le deuxième (mois de juin avec un traitement de stérilisation identique).

A l'heure actuelle nous avons retenu la méthode suivante qui nous a donné les résultats les plus constants :

Les couronnes dont on a supprimé les feuilles jusqu'à environ 5 mm de leur niveau d'insertion sont plongées quelques instants dans de l'alcool à 95°, puis sont stérilisées dans une solution d'hypochlorite de calcium à 60 grammes par litre pendant vingt minutes en faisant plusieurs passages sous vide de quelques minutes. On ôte ensuite stérilement la base des feuilles ; puis les couronnes sont rincées trois fois dans de l'eau stérile. Enfin on les fragmente et on met en culture des implants primaires présentant un bourgeon repérable.

Milieux et conditions de culture.

Tous les milieux de culture utilisés sont des variantes du même milieu de base. Ce milieu de base est le suivant :

macro éléments de MURASCHIGE et SKOOG (1962)	50 ml par litre
micro éléments de HELLER (1953)	1 ml par litre
fer EDTA	10 ml par litre *
vitamines d'après MOREL (1948)	2 ml par litre
saccharose	30 g par litre
agar	7,5 g par litre

* - d'une solution mère contenant 3,73 g de Na₂ EDTA et 2,78 g de Fe SO₄ 7 H₂O pour 1000 ml d'eau bidistillée.

Selon le type de réaction recherché pour les implants, ce milieu de base est enrichi de différentes substances activatrices : ANA (acide alpha naphthalène acétique), AIB (acide indolbutyrique), Benzyladénine.

En ce qui concerne les conditions d'environnement, les tubes de culture sont placés dans une enceinte dont la température est de 25°C avec une photopériode de 12 heures.

Résultats.

Les conditions dans lesquelles nous avons été contraints de manipuler à partir de matériel envoyé de Côte d'Ivoire rendait difficile une analyse systématique. Nous sommes néanmoins parvenus à obtenir des résultats auxquels il est vraisemblablement possible d'apporter des améliorations.

L'implantation primaire de fragments de couronne porteurs d'un bourgeon a été réalisée sur le milieu de base enrichi en benzyladénine (concentration $2 \cdot 10^{-7}$) et en ANA (concentration 10^{-7}). Du point de vue du pourcentage de réussite de l'implantation on observe une importante hétérogénéité liée pour une large part à la variabilité des stades d'ontogénèse des bourgeons au moment du prélèvement. Ceux-ci sont donc, d'une part, différemment sensibles aux agents stérilisants et ne répondent pas, d'autre part, de la même façon à la levée des corrélations d'inhibition existant au sein de la plante entière. En l'état actuel de nos investigations, il n'est pas possible de prévoir le nombre de bourgeons susceptibles de démarrer après la mise en culture.

Dans le meilleur des cas, nous avons pu obtenir, dans les conditions de culture stérile, le démarrage de 15 à 20 bourgeons à partir d'une couronne.

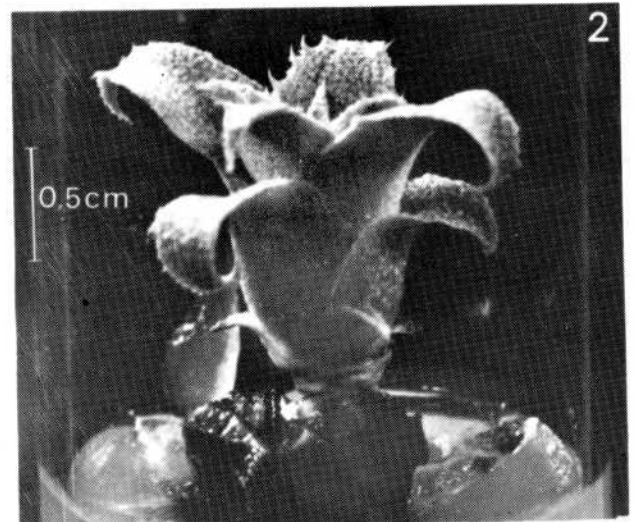
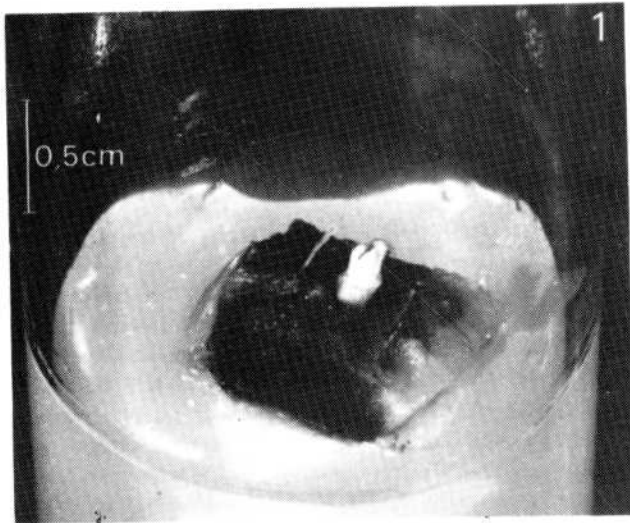
Le développement de ces bourgeons commence, en moyenne, une semaine après la mise en culture (photo 1). Deux tiers des bourgeons ayant démarré poursuivent leur développement et donnent de jeunes plantes. Au point de vue morphologique, ces plantes « miniaturisées » (phénomène lié aux conditions de culture *in vitro* (R. NOZERAN et L. BANCILHON, 1972) présentent des feuilles raides, légèrement enroulées et portant toujours des épines vers leur extrémité (photo 2).

Afin de mieux apprécier leur développement, nous avons choisi de mesurer la taille de l'ensemble du jeune pied issu du bourgeon (elle est peu différente en fait de celle de la plus grande feuille). Au bout de trois semaines sa dimension est de 1 cm ; lorsqu'elle atteint 4 cm (au bout de deux mois environ), il est facile de séparer les jeunes plantes obtenues du fragment de tige porteur et de les implanter en terre (photo 3).

Maintenu dans le même milieu de culture, le fragment de tige porteur du bourgeon ne produit pas de racines. Ceci peut paraître curieux car, même sur la plante-mère, la tige édifiant la couronne donne spontanément des racines. Par contre, celles-ci peuvent apparaître à la longue à la base du jeune pied issu du bourgeon et plonger dans le milieu en contournant le fragment de tige qui le porte.

On peut aussi obtenir, à plus ou moins longue échéance, l'enracinement des jeunes plantes après leur prélèvement et leur implantation sur milieu neuf.

Après transplantation en terre (photo 3), en serre tropi-



Photos 1 et 2. État de développement *in vitro* d'un bourgeon axillaire de couronne dix jours (photo 1) et 50 jours (photo 2) après la mise en culture (milieu de base + benzyladénine $2 \cdot 10^{-7}$ + ANA 10^{-7}).



Photo 3. Développement en terre (deux mois après la transplantation) d'une jeune plante issue du développement d'un bourgeon axillaire de couronne cultivé *in vitro*.

Photos 4 et 5. Différents types de démarrage de bourgeons sur fragments d'axes de jeunes plantes préalablement obtenues *in vitro* par développement d'un bourgeon axillaire de couronne (milieu de base + benzyladénine $2 \cdot 10^{-7}$ + ANA 10^{-7}).

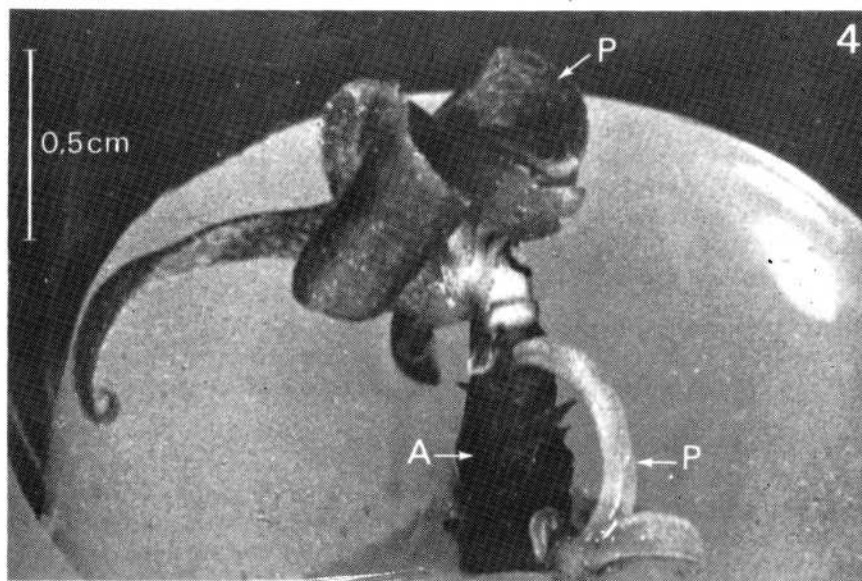


Photo 4. Deux plantes (P) développées sur un même fragment (A.).

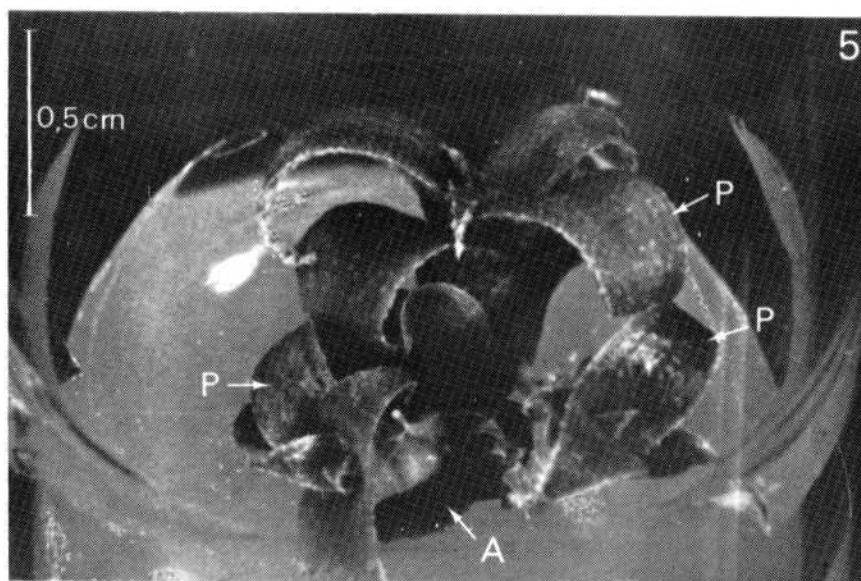


Photo 5. Trois plantes (P) développées sur un même fragment (A.).

calisée, l'enracinement intervient dans 100 p. cent des cas, même si au départ la jeune plante ne porte pas de racines visibles. En fait une étude histologique révèle à la base de l'implant l'existence d'ébauches de racines.

En conclusion, l'obtention d'implants primaires pose un certain nombre de problèmes techniques liés à l'organisation de l'appareil végétatif (fragmentation des couronnes et localisation des bourgeons) et aux problèmes de stérilisation.

Mais il est possible d'obtenir *in vitro* dans un certain nombre de cas, des plantes susceptibles d'être utilisées pour l'implantation en terre. Du point de vue du taux de multiplication, cette technique est encore peu efficace par rapport aux pratiques habituelles, d'autant plus que certaines méthodes, en particulier la multiplication par portions de tiges (B. TKATCHENKO, 1947 ; C. PY et P. ESTANO-VE, 1964) ont déjà apporté une nette amélioration.

Il nous fallait donc déterminer des conditions permettant une multiplication plus rapide.

MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE ACCÉLÉRÉE

Sur la base des résultats obtenus chez d'autres plantes, on peut retenir deux possibilités de multiplication végétative accélérée qui sont pour une large part fonction du type de végétal en cause :

- soit on pratique un bouturage simple d'implants primaires peu ou pas ramifiés mais qui présentent une morphologie telle que l'on peut à chaque génération isoler un certain nombre de noeuds ;

- soit on provoque une ramification intensive à partir d'un implant primaire et on utilise ces rameaux.

Fragmentation des plantes obtenues à l'issue de l'implantation primaire.

Nous avons tenté d'utiliser la méthode du bouturage qui donne, par exemple chez la vigne des résultats très spectaculaires de l'ordre de trois millions de plantes en un an à partir d'un seul bourgeon [(R. NOZERAN et L. BANCI-LHON, 1972)].

Cependant, chez l'ananas, la fragmentation des tiges en portions correspondant à un seul noeud est rendue pratiquement impossible du fait de la structure en rosette, conséquence de l'existence d'un axe très court.

Néanmoins nous avons réalisé la mise en culture de portions de tiges de plantes obtenues *in vitro*.

De jeunes plantes issues de bourgeons axillaires de couronne (ces implants primaires avaient été obtenus sur le milieu de base enrichi en benzyladénine et en lait de coco) et dont les plus grandes feuilles ont atteint 10 à 15 cm ont

été utilisées en vue d'un bouturage d'un certain nombre de portions de tiges. Malgré leur développement foliaire important, l'axe de ces plantes n'excède pas 1 cm de hauteur. Deux types de fragmentation ont été réalisés :

- transversalement, afin d'isoler des fragments porteurs d'un nombre réduit d'aisselles ; mais les portions de tige sont généralement trop petites et le pourcentage de réussite est très faible.

- longitudinalement, la tige étant divisée en plusieurs secteurs (2 à 8). Les meilleurs résultats ont été constatés pour une fragmentation en quatre secteurs.

Les portions de tiges ainsi obtenues, portant plusieurs aisselles, sont implantées dans la majorité des cas sur le milieu de base enrichi en benzyladénine ($2 \cdot 10^{-7}$) et en ANA (10^{-7}).

On observe alors le démarrage d'un certain nombre de bourgeons. On peut ainsi obtenir deux ou trois plantes par fragment ; elles sont issues de bourgeons situés à l'aisselle de feuilles différentes (photos 4 et 5).

Il est intéressant de noter que par cette méthode (pour les mêmes conditions de milieu de culture et d'environnement que pour l'implantation primaire) les jeunes plantes obtenues présentent un certain nombre de différences au niveau de leur morphologie foliaire. Les feuilles sont en effet plus molles, plus étroites et plus enroulées (photos 4 et 5) que celles des plantes dont elles sont issues (photo 2).

En outre on observe une importante hétérogénéité dans le démarrage et le développement ultérieur de ces plantes ; le délai nécessaire au développement jusqu'à une taille suffisante pour effectuer une nouvelle fragmentation est plus long que celui nécessaire pour obtenir un implant primaire utilisable à cette fin.

Cette méthode doit être susceptible d'amélioration en particulier sous l'influence de modifications du milieu de culture. Les premières indications à ce sujet montrent que l'utilisation de milieux moins riches en régulateurs de croissance favorise le développement de ces jeunes plantes. D'autres améliorations peuvent être vraisemblablement apportées en modifiant les systèmes de corrélations intervenant au sein de la bouture.

Cette méthode ne s'étant pas révélée d'une grande efficacité, nous avons essayé de provoquer, avant bouturage, une ramification intensive.

Obtention des ramifications multiples.

C'est dans cette voie que les résultats les plus intéressants ont été obtenus.

- Conditions d'obtention.

Les bourgeons, issus de l'implantation primaire *in vitro* sur milieu de base plus benzyladénine ($2 \cdot 10^{-7}$) plus ANA

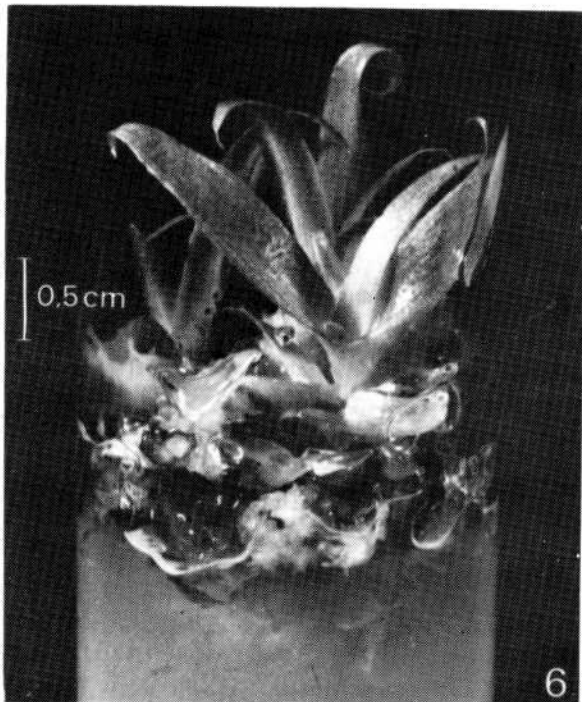


Photo 6. Ramifications multiples obtenues en tube (milieu de base + benzyladénine 10^{-7} + AIB 10^{-6} , saccharose 2 p. cent).

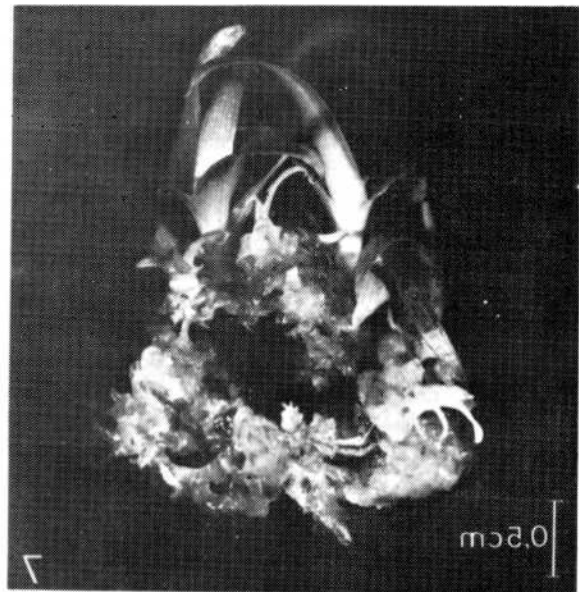


Photo 7. Sorties du tube.

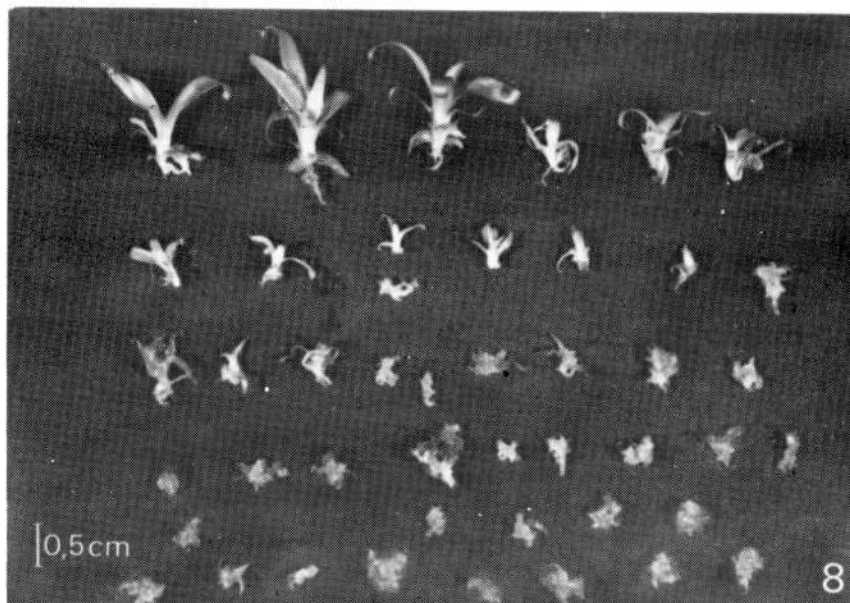


Photo 8. Après dissection (pour les ramifications les plus jeunes, tous les individus n'ont pu être séparés les uns des autres).

(10^{-7}) et ayant atteint une taille d'environ 3 mm (photo 1), sont séparés du fragment mère et isolés sur un nouveau milieu qui a donné des résultats intéressants au laboratoire, en particulier chez le fraisier (R. NOZERAN c.v.).

Il s'agit du milieu de base enrichi en benzyladénine à la concentration 10^{-7} et en AIB à la concentration 10^{-6} et où le saccharose est à 2 p. cent. Ces bourgeons présentent des destinées différentes dont nous n'avons pu comprendre le déterminisme. Ou bien ils meurent après un temps plus ou moins long, ou bien on constate sur l'implant le démarrage d'un certain nombre de petits bourgeons. Par la suite, le phénomène s'accroît et on observe dans les tubes de culture des amas au sein desquels on distingue un très grand nombre de bourgeons (photo 6).

Lorsqu'on dissèque ces amas (photos 7 et 8), on constate une ramification intense des rameaux du bourgeon mis en culture conduisant à des structures en « balai de sorcière » comparables à celles obtenues par la culture *in vitro* de fragments de tiges de *Citrus aurantium* L. (BOUZID, 1975).

Les différents bourgeons sont rattachés les uns aux autres ; il est cependant très difficile de localiser leur point d'insertion exact et de bien comprendre leurs relations morphologiques. En effet, la masse des proliférations est assez compacte et en outre, il semble intervenir un léger phénomène de gonflement au niveau des feuilles des bourgeons les plus petits qui sont peu chlorophylliens.

Beaucoup d'entre eux doivent provenir du développement de ramifications de type normal mais accéléré grâce à la levée d'un certain nombre de corrélations d'inhibition. Cependant nous ne pouvons affirmer que, dans certains cas, il ne s'agit pas de néoformations sur cal.

Comme nous pouvons le voir sur la photo 6 un certain nombre de bourgeons formés présentent un développement végétatif relativement important. Ils peuvent alors être repiqués en terre ; de plus, des fragments prélevés dans la zone des bourgeons les plus petits continuent à se ramifier après repiquage.

La même opération peut être répétée plusieurs fois de suite.

Il faut attendre environ six mois pour obtenir à partir d'un bourgeon primaire la production d'un ensemble tel que celui représenté sur la photo 6. Mais ensuite, le phénomène s'accroît, et il est possible d'effectuer des repiquages tous les trois mois environ. Un calcul théorique permet d'espérer la production d'un million de jeunes plantes en deux ans à partir d'un seul bourgeon.

La mise en terre de ces jeunes plantes peut être réalisée dès que la taille de leurs plus grandes feuilles atteint 2 cm. Il est intéressant de constater, qu'à ce stade, les racines sont déjà formées.

Nous avons indiqué précédemment que l'apparition de ramifications multiples est obtenue d'une part en séparant le bourgeon primaire cultivé *in vitro* du fragment de tige qui le porte et d'autre part en le transportant sur un milieu enrichi en régulateurs de croissance.

L'analyse de l'ensemble des facteurs déclenchant le phénomène n'est pas terminée mais nous avons obtenu un certain nombre d'indications concernant l'influence des conditions de culture.

Nous avons modifié en particulier les concentrations en régulateurs de croissance. On constate alors (photos 9 A à D) que le milieu enrichi, précédemment cité, favorise une intense ramification et permet un début de développement végétatif des bourgeons formés (il se poursuit si on les maintient en place sans repiquage). Par contre, des milieux plus simples et même sans apport de régulateurs, permettent un développement végétatif et un enracinement plus important (photo 9 D).

En règle générale les ramifications obtenues présentent une structure en rosette, cependant certaines montrent une nette élongation des entre-noeuds (photos 10 et 11). Ces rameaux à morphologie particulière sont situés au centre de la masse des individus obtenus par cette méthode ou apparaissent sous l'influence d'une diminution d'éclaircissement. On peut donc raisonnablement penser qu'il s'agit, au moins pour une part, d'un phénomène d'étiollement provoqué directement ou indirectement. D'ailleurs le retour des rameaux « étiolés », après repiquage, à des conditions normales d'éclaircissement se traduit par la réacquisition de la structure en rosette (photo 12). L'intérêt de l'obtention de ces formes réside dans la possibilité de réaliser un bouturage noeud par noeud permettant le démarrage du bourgeon axillaire. On est alors ramené à un processus de multiplication classique tel que celui réalisé chez la vigne par exemple.

- Essai d'interprétation et perspective.

Nous avons déjà souligné que les observations morphologiques, après dissection, des amas de ramifications obtenues, semblent indiquer que cette méthode favorise le développement anticipé de bourgeons axillaires d'ordre de plus en plus élevé.

Les premières investigations histologiques réalisées au cours des premières semaines de culture d'un implant primaire isolé ne font pas apparaître la formation d'un cal mais le développement de plusieurs méristèmes sur l'implant.

Les conditions expérimentales permettraient une levée des corrélations d'inhibition déterminant l'expression de tout ou partie des territoires méristématiques caulinaires présents sur un petit bourgeon déjà formé.

Bien qu'en opérant de façon différente, en particulier par prélèvement du méristème d'un bourgeon primaire cultivé

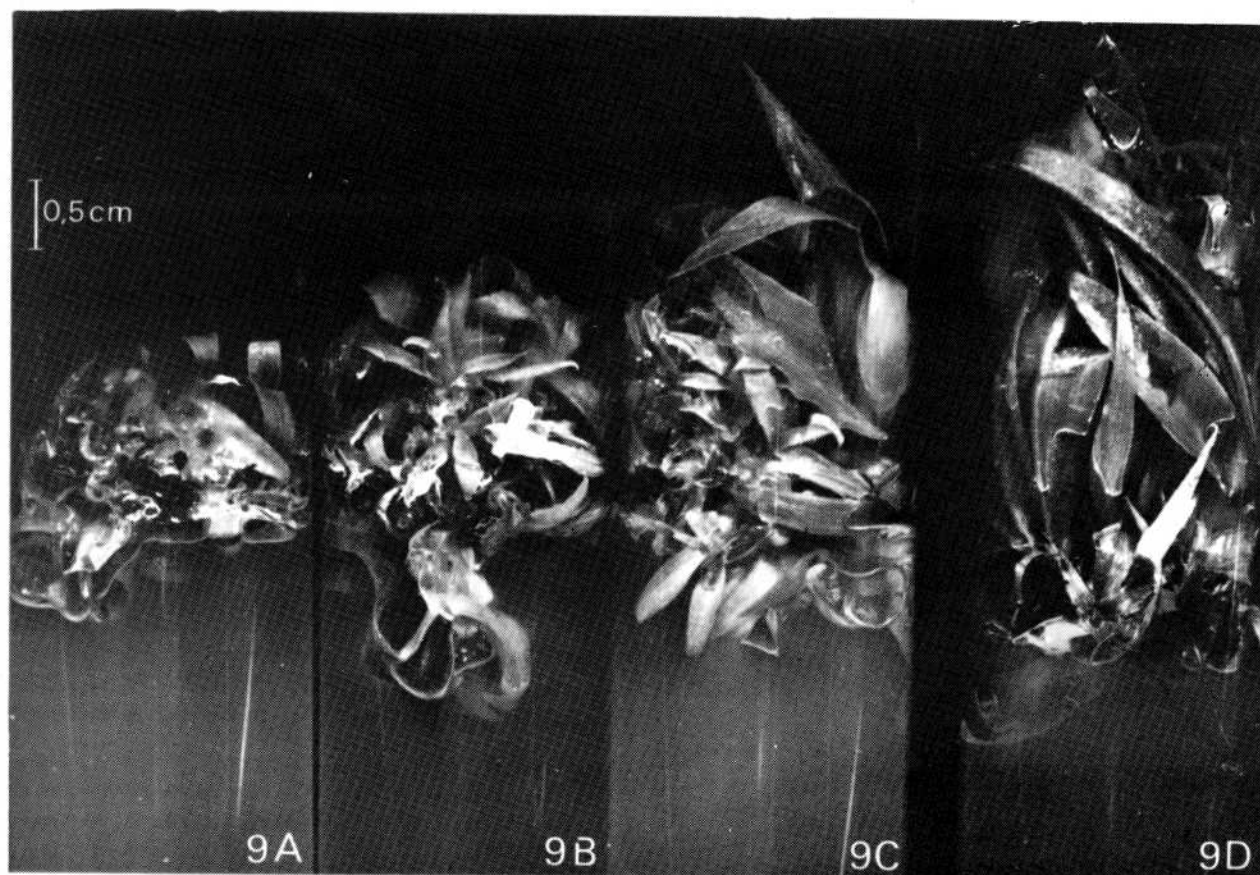


Photo 9. Influence du milieu de culture sur le développement des jeunes plantes obtenues par ramification intense : état des cultures deux mois après le repiquage.
A - milieu de base + benzyladénine $2 \cdot 10^{-7}$ + ANA 10^{-7} .
B - milieu de base + benzyladénine 10^{-7} .
C - milieu de base + benzyladénine 10^{-7} + AIB 10^{-6} .
D - milieu de base.

in vitro, M.O. MAPES (1974) provoque un processus semblable de multiplication. BOUZID (1975), déjà cité, obtient des résultats tout à fait comparables chez le Citrus. On peut également obtenir, chez le fraisier, par « éclatement de la rosette » une multiplication végétative très importante (ADAMS A. 1972 ; BOXUS Ph. 1973-1974 ; R. NOZERAN c. v.).

Si, comme nous l'avons vu, l'obtention d'une ramification intense s'avère très efficace pour une multiplication végétative accélérée, le déclenchement du processus est aléatoire et le pourcentage de réussite à partir des bourgeons primaires reste faible.

Plus précisément, l'aptitude à réagir d'un méristème (en liaison avec le rôle éventuel de substances activatrices) peut être fonction de son âge physiologique et d'une modification des actions corrélatives, s'exerçant entre les différentes parties de l'implant au cours de son développement ; en conséquence de quoi, l'aptitude à activer des zones méristématiques axillaires est plus ou moins favorisée.

Une étude comparative approfondie sur des bourgeons d'âges physiologiques différents, si elle conduisait à connaître les causes de ce type de fonctionnement pourrait permettre d'améliorer la méthode par un choix précis des bourgeons à implanter et ainsi, d'augmenter le pourcentage de réussite au stade de l'isolement des bourgeons primaires.

ETUDE DES JEUNES PLANTES OBTENUES *IN VITRO*

Les jeunes plantes obtenues par une ramification intensive présentent une morphologie différente de celles obtenues directement à partir de bourgeons axillaires de couronne. En particulier leurs feuilles sont plus étroites, longues et souples, portant très rarement des épines (photos 6 et 7).

Transplantées en terre, elles réacquièrent, au bout d'un certain temps, les caractères morphologiques habituels et forment à nouveau des épines.

Le déterminisme des modifications foliaires observées n'a pas été clairement élucidé. On peut se poser la question de savoir en particulier si le fragment de couronne, conservé à la mise en culture de l'implant primaire (photo 1), joue un rôle. D'autre part, les plantes issues des ramifications multiples sont placées dans des conditions écologiques particulières du fait de la compétition, au niveau de l'espace et de la nutrition, liée à la très grande quantité de matériel végétal se développant dans un même tube (photo 7).

En outre, il serait intéressant de pouvoir comparer les jeunes plantes issues du phénomène de ramification intense à celles obtenues à partir de la germination de graines ; il existe en effet une analogie entre ces deux types de végétaux. D'ailleurs, chez la plupart des végétaux multipliés végétativement *in vitro*, on observe un phénomène de

rajeunissement lié certainement pour une large part à la miniaturisation des méristèmes caulinaires (R. NOZERAN et L. BANCILHON, 1974). En ce qui concerne les plantes à feuilles raides et épineuses observées *in vitro*, il n'est pas impossible de penser qu'elles ne représentent qu'un stade ultérieur de l'individu issu de semence et que le déterminisme de certains caractères, en particulier la spinosité, est pour une large part sous la dépendance des conditions écologiques.

CONCLUSION

Nous venons de décrire deux types de méthodes permettant la multiplication végétative de l'ananas *in vitro*. D'une part un bouturage simple obtenu par une fragmentation des axes de plantes afin d'isoler un certain nombre de bourgeons axillaires et d'en permettre le démarrage. D'autre part une technique très efficace permettant l'obtention de ramifications multiples que nous avons interprétée, comme le démarrage anticipé de territoires méristématiques d'ordre de plus en plus élevé.

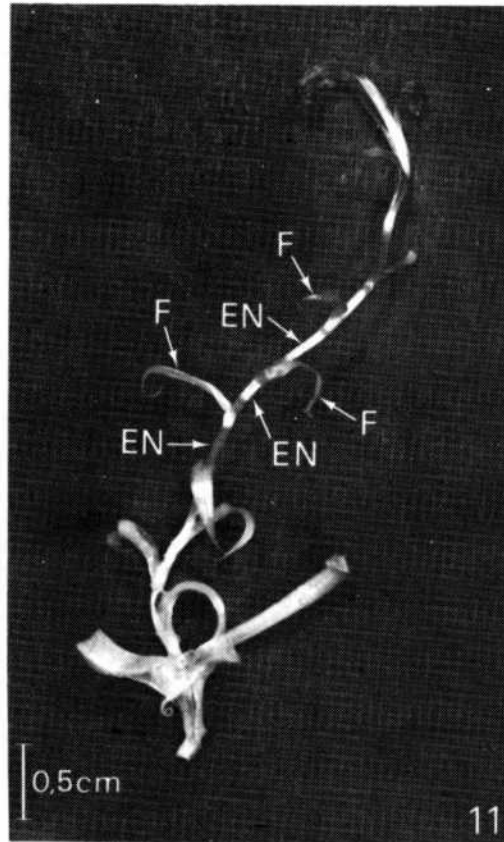
Nous pouvons donc dire que nous avons à faire dans l'un et l'autre cas à une multiplication qui doit être de type « conforme ». Celle-ci a été définie par R. NOZERAN et L. BANCILHON (1972) comme aboutissant à l'obtention d'individus pourvus du même stock d'information héréditaire que la plante dont ils sont issus et qui reproduisent un type de fonctionnement correspondant à tout ou partie du cycle de développement normal de la plante issue de semence.

Dans le cas du cultivar « Cayenne lisse » de l'ananas, dans les meilleures conditions précisées à ce jour, on peut estimer possible d'obtenir en deux ans à partir d'un seul bourgeon, environ un million d'individus homogènes, car tous en phase de jeunesse.

On peut donc retenir que la culture *in vitro* permet d'augmenter de façon très efficace le taux de multiplication végétative. Sous réserve du comportement dans les conditions naturelles de développement, les méthodes mises au point doivent offrir des possibilités d'application à brève échéance. Des progrès restent à accomplir aussi bien dans le plan pratique : standardisation des techniques de stérilisation, choix des couronnes, recherche du meilleur stade de transplantation, que sur le plan fondamental : état physiologique du bourgeon implanté, ontogénèse des proliférations, comparaison des plantes issues de la multiplication *in vitro* et des clones édités par bouturage classique.

Cependant les résultats obtenus apportent des indications prometteuses dans plusieurs de ces domaines.

C'est volontairement que nous avons négligé dans cette première étape de travail les possibilités de production de



Photos 10 et 11. Plantes présentant une élévation des entre-nœuds. Vue d'ensemble d'un tube placé en conditions d'éclairage faible (photo 10). Une plante «étiolée» isolée (photo 11). Remarquer l'élévation importante des entre-nœuds (E.N.), permettant la séparation des différents nœuds (F : feuille).

Photo 12. Plante «étiolée» repiquée et placée en lumière normale. Remarquer la réacquisition du fonctionnement en rosette (II) au-dessus de la partie «étiolée» (I) ayant été édifiée auparavant dans les conditions d'éclairage faible.



plantes néoformées à partir de cals ; ce type de fonctionnement a été obtenu sur fragments primaires de couronne. Il pourrait être utilisé, dans un plus ou moins bref avenir, comme source de variabilité [mutants ou de variants (R. NOZERAN et L. BANCILHON, 1972)] et permettre d'aborder sous un angle nouveau certains des problèmes

d'amélioration de l'ananas.

Ce travail effectué au Laboratoire de Morphologie végétale expérimentale d'Orsay (Professeur NOZERAN) a pu être réalisé grâce au soutien du Ministère de la Recherche de Côte d'Ivoire et de l'IRFA.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAMS (A.N.). 1972.
An improved medium for strawberry meristem culture.
J. Hort. Sci., 47, 263-264.
- AGHION (D.) et BEAUCHESNE . 1960.
Utilisation de la technique de culture stérile d'organes pour obtenir des clones d'ananas.
Fruits, 15, n°10, p. 464-466.
- BOUZID (S.). 1975.
Quelques traits du comportement de boutures de Citrus *in vitro*.
C.R. Acad. Sci., Paris 280, 1689-92.
- BOXUS (Ph.). 1973.
La production de plants sains de fraisiers.
Acta Hort., 30, 187-191.
- BOXUS (Ph.). 1974.
The production of strawberry plants by *in vitro* micro-propagation.
J. Hort. Sci., 49, 209-210.
- HELLER (R.). 1953.
Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux *in vitro*.
Ann. Sci. Nat. Bot., 14, 1-223.
- KRAUSS (B.H.). 1948.
Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* L. MERR.
Bot. Gaz., 110, 159-217.
- LAKSMI SITA (G.), SINGH (R.) et IYER (C.P.A.). 1974.
Plant lets through shoot-tip cultures in pineapple.
Cur. Sci. India, 43 (22), 724-725.
- MOREL (G.). 1948.
Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires de tissus végétaux.
Ann. Epiphyties, 14, 123-234.
- MURAS HIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.
A revised medium of rapid growth and bio-assay with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant, 15, 473-497.
- NOZERAN (R.) et BANCILHON (L.). 1972.
Les cultures *in vitro* en tant que techniques pour l'approche des problèmes posés par l'amélioration des plantes.
Ann. Amélior. Plantes, 22, 2, p. 167-185.
- NOZERAN (R.) et BANCILHON (L.). 1974.
Multiplication végétative chez les végétaux vasculaires.
Colloque de morphogénèse 7-8 mars 1974, Orsay. Société Botanique de France (à paraître).
- O MAPES (M.). 1974.
Tissue culture of Bromeliads.
Journal of Hawaii Agricultural experiment Station, n°1676.
- PY (C.) et ESTANOVE (P.). 1964.
La multiplication des ananas par portions de tiges.
Fruits, 19, 465-468.
- PY (C.) et TISSEAU (M.-A.). 1965.
L'ananas. Techniques agricoles et productions tropicales.
G.P. Maisonneuve et Larose.
- SEOW (K.K.) et WEE (Y.C.). 1970.
The leaf bud method of vegetatif propagation in pineapple.
Malaysian agricultural Journal, 47, 499-507.
- SIDERIS (C.P.) et KRAUSS (B.H.). 1936.
The classification and nomenclature of pineapple leaves, sections of leaves and section of stems based on morphological and anatomical differences.
Pineapple Quart., 6, 135-147.
- TEO (C.K.H.). 1974.
Clonal propagation of Pineapple by Tissue culture.
Planter, Malaya, 50, n°575, 58-59.
- TKATCHENKO (B.). 1947.
Une méthode rapide de multiplication de l'ananas.
Fruits, 2, 371-373.

