

Influence du rythme de renouvellement des solutions de culture *in vitro* d'ananas sur milieu liquide.

J. MARCHAL et D. ALVARD*

INFLUENCE OF THE FREQUENCY AT WHICH SOLUTIONS ARE CHANGED IN *IN VITRO* PINEAPPLE CULTURE USING LIQUID MEDIA.

J. MARCHAL and D. ALVARD.

Fruits, Dec. 1988, vol. 43, n° 12, p. 701-707.

ABSTRACT - *In vitro* pineapple culture using nutrient solutions holds prospects for improving plant growth. The time at which solutions are changed affects the mineral and carbon nutrition connected with changes in the pH of the culture media.

Saccharose - which is partly hydrolyzed into fructose and glucose - is absorbed first by the plant. Under low energy - 10 W m^{-2} - pineapple is heterotrophic.

Phosphorus is absorbed in great amounts and this element is quickly removed from the solutions. The ammoniacal or nitrate nitrogen requirements are highly likely to vary with the growth stage. Consumption and efficiency of the different mineral elements are related to their respective proportions.

La culture *in vitro* est classiquement conduite sur des milieux gélosés. Ceux-ci s'épuisent progressivement en sucres, en éléments minéraux, en eau ... qui peuvent atteindre des concentrations limitant la croissance. Les plants peuvent également excréter des substances qui, à la suite d'une accumulation progressive dans le milieu, pourraient avoir une influence inhibitrice. Il est délicat de renouveler les milieux gélosés ou même de les enrichir en éléments nutritifs au cours de la culture. Par contre la conduite sur solution offre cette possibilité.

La croissance des plants d'ananas est lente en vitroculture sur milieu gélosé. Il a été constaté que ces vitroplants s'adaptent bien à une culture sur milieu liquide qui est donc une voie à explorer (C. TEISSON, communication personnelle 1987). CASALE et GARCIA (1987) ont montré qu'en phase de multiplication de l'ananas la levée de latence des bourgeons latéraux est obtenue plus rapidement sur milieu liquide que sur milieu gélosé. Le milieu liquide est de ce fait assez souvent utilisé pour cette phase de multiplication de l'ananas en vitroculture. (ZEPEDA et SAGAWA, 1981 ; RAWGAN, 1984). Cette technique pourrait

INFLUENCE DU RYTHME DE RENOUVELLEMENT DES SOLUTIONS DE CULTURE *IN VITRO* D'ANANAS. SUR MILIEU LIQUIDE.

J. MARCHAL et D. ALVARD

Fruits, Déc. 1988, vol. 43, n° 12, p. 701-707.

RESUME - La culture *in vitro* de l'ananas sur solution offre des perspectives d'amélioration de la croissance des plants. L'époque du renouvellement des solutions affecte la nutrition minérale et carbonée en liaison avec l'évolution du pH des milieux.

Le saccharose - qui est partiellement hydrolysé en fructose et en glucose - est préférentiellement absorbé par la plante. Sous une faible énergie - 10 W m^{-2} - les ananas ont un fonctionnement hétérotrophe.

L'absorption du phosphore est forte et les solutions sont rapidement épuisées en cet élément. Les besoins en azote nitrique ou ammoniacal sont très probablement fonction du stade de développement. La consommation des différents éléments minéraux et leur efficacité sont en relation avec leurs proportions respectives.

offrir une possibilité d'amélioration de la phase de croissance. Afin de le vérifier un test de culture *in vitro* d'ananas sur solution, renouvelée plus ou moins précocement, a été réalisé au laboratoire de cultures *in vitro* du CIRAD.

MATERIEL ET METHODE

Le milieu de culture est constitué des macroéléments et des microéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962) et des vitamines de MOREL. Il contient 40 g/l de saccharose et est stérilisé pendant 20 minutes à l'autoclave à 120°C .

Des explants d'ananas sont isolés après la phase de multiplication sur milieu gélosé. Ils sont placés dans des boîtes de Pétri. Chaque boîte contient 25 ml de solution stérilisée à l'autoclave et 5 explants.

La solution est renouvelée après soit 10, soit 20, soit 30 jours de culture ou n'est pas renouvelée. Pour chaque traitement, 12 boîtes de Pétri sont ensemencées. L'expérience est poursuivie durant 40 jours à une température de $27 \pm 1^\circ\text{C}$; la photopériode est de 12 h. L'énergie lumineuse de 10 W m^{-2} est fournie par des lampes fluorescentes (1/3 Blanc, 1/3 TLD 83 et 1/3 GROLUX).

* - J. MARCHAL - IRFA/CIRAD - B.P. 5035 - 34032 MONTPELLIER CEDEX

A. ALVARD - Laboratoire de Culture In Vitro du CIRAD - B.P. 5035 34032 MONTPELLIER CEDEX

Des boîtes témoins non ensemencées sont placées dans les mêmes conditions ; la solution n'y est pas renouvelée.

Traitements	Solutions
A	renouvelée après 10 jours de culture
B	renouvelée après 20 jours de culture
C	renouvelée après 30 jours de culture
D	non renouvelée

En début d'essai 100 explants d'ananas ont été analysés (poids de la matière fraîche et sèche, contenu en éléments minéraux) ainsi que de la solution de culture avant et après autoclavage (éléments minéraux et sucres).

Au moment du renouvellement, les solutions résiduelles sont analysées et les plants pesés. En fin d'essai, les solutions résiduelles et les plants sont analysés.

RESULTATS ET DISCUSSION

Croissance des plants.

Elle est suivie par l'évolution du poids des plants (tableau 1). A la mise en place de l'essai la dispersion du poids moyen des explants de chaque traitement est importante ; il est compris entre 314 et 413 mg. Seul le taux d'accroissement du poids permet donc de juger de l'influence des traitements.

Le taux d'accroissement de la masse de matière fraîche ou sèche est toujours le plus faible avec la solution renouvelée très précocement. Le non renouvellement est plus favorable. Son effet sur la masse de matière fraîche est voisin de celui observé avec les renouvellements après 30 ou 20 jours. Ce dernier par contre a une influence très positive en augmentant la teneur en matière sèche et la masse de celle-ci (tableau 2).

Ce résultat peut suggérer que les concentrations des différents constituants et, ou les équilibres entre eux, dans la solution neuve ne sont pas les plus favorables en début de culture et que la composition la mieux adaptée pourrait être différente en fonction de l'âge des plants. Il est possible aussi que des substances, excrétées par les plants dès le

début de la culture, aient une influence positive et que l'élimination du milieu les contenant, dès le dixième jour, ait limité leur action. Les conditions de culture, la composition du milieu - en particulier en hormones de croissance - en phase de multiplication et la composition des explants issus de celle-ci peuvent jouer.

Dans des conditions expérimentales voisines, la culture d'explants de bananiers a montré que le non renouvellement des solutions limite leur croissance mais que l'époque de renouvellement n'a pas d'influence. Le comportement des espèces, dans des conditions identiques, peut donc être différent. Il apparaît bien que les techniques *in vitro* (composition des milieux, énergie ...) doivent être adaptées à chacune d'elle.

Le pH acide du milieu neuf - 4,0 après autoclavage - permet d'éviter le développement des bactéries mais est-il optimum pour l'ananas ? Sans être ensemencé le milieu s'acidifie en accord avec les observations de REDEL (1974) et de SINGHA *et al.* (1987) (tableau 3). L'acidification se produit déjà pendant l'autoclavage (SKIRVIN *et al.*, 1986). Elle peut être liée à une perte de NH_3 , à une fixation de CO_2 atmosphérique ...

Le milieu a donc une activité chimique qui peut dépendre des conditions externes - température, éclairage, conduite de l'autoclavage - de sa composition initiale et du pH.

L'acidification des milieux ensemencés est encore plus intense puisqu'au vingtième jour après l'apport d'une solution neuve le pH est de 3,11 et 3,26 (tableau 3). Par la suite le pH s'accroît. Une telle évolution du pH a été observée, sans renouvellement, dans des milieux gélosés ensemencés avec des explants de bananiers (SENS, 1988), de pommiers ou de poiriers (SINGHAL *et al.*, 1987). Cette cinétique du pH est liée aux échanges ioniques entre les milieux et les racines (MENGEL et KIRKBY, 1982). Pour chacun des traitements, excepté le traitement C (renouvellement après 30 jours), le milieu de culture a pu suivre cette évolution (acidification puis augmentation du pH). Or les accroissements des poids ne sont pas en rapport avec cette différence. Cet essai ne permet donc pas de juger si le pH

TABLEAU 1 - Evolution du poids moyen des plants pendant la culture.

	Jours après mise en culture sur milieu liquide	Poids d'un plant		p. 100 M.S.
		matière fraîche mg	matière sèche mg	
Solution renouvelée				
A - après 10 jours	0	314	24,2	7,7
	10	391	-	-
	40	1.142	97,7	8,6
B - après 20 jours	0	361	27,8	7,7
	20	706	-	-
	40	1.506	153,8	10,2
C - après 30 jours	0	413	31,8	7,7
	30	1.306	-	-
	40	1.716	144,7	8,4
D - non renouvelée	0	372	28,6	7,7
	40	1.640	129,7	7,9

TABLEAU 2 - Taux d'accroissement du poids des plants après 40 jours de culture - exprimé en p. 100 du poids initial.

	matière fraîche	matière sèche
A	264	304
B	317	453
C	316	355
D	341	353

TABLEAU 3 - Evolution du pH des solutions.

Solution \ Jours	0	10	20	30	40
Sans plants	4,03				3,79
Avec plants					
A	4,03	3,58			3,57
B	4,03		3,11		3,26
C	4,03			3,82	3,64
D	4,03				3,86

TABLEAU 4 - Perte d'eau des milieux de culture (en ml) des 60 plants de chaque traitement.

Solutions \ Jours	0		10		20		30		40	
	Volume initial	V.R.	V.P.	V.R.	V.P.	V.R.	V.P.	V.R.	V.P.	
Sans plants = évaporation	300								269,0	31,0
Avec plants										
A	300	288,7	11,3						221,5	78,5
B	300			256,0	44,0				216,5	83,5
C	300					216,9	83,1		252,9	47,1
D	300								186,0	114,0

V.R. : volume résiduel V.P. : absorption par le plant+ évaporation.

TABLEAU 5 - Estimation de la quantité d'eau absorbée par un vitroplant d'ananas en 40 jours en ml (VP total - évaporation/60)

	ml d'eau absorbée	poids d'un plant (mg de M.F.)	p. 100 M.S.
A	0,98	1.142	8,6
B	1,61	1.506	10,2
C	1,65	1.716	8,4
D	1,35	1.640	7,9

TABLEAU 6 - Teneurs en sucres des milieux de culture (concentration en g/l)

	fructose	glucose	saccharose	total
Milieu avant autoclavage	0	0	41,95	41,95
Milieu après autoclavage	11,15	10,60	20,35	42,10
Milieu après 40 jours sans plants	13,75	13,70	19,80	47,25
Milieu :				
A après 10 jours de culture	12,90	12,30	17,65	42,85
après 30 jours de culture	16,45	14,00	7,20	37,65
B après 20 jours de culture	15,00	11,00	10,80	36,80
après 20 jours de culture	15,45	11,95	3,35	30,75
C après 30 jours de culture	15,80	12,70	6,25	34,75
après 10 jours de culture	15,85	14,10	8,95	38,90
D après 40 jours de culture	17,65	12,70	0,85	31,20

TABLEAU 10 - Quantités d'éléments minéraux absorbés par un plant d'ananas durant les 40 jours de culture (calculées à partir de l'épuisement des solutions).

	mg					mg 10 ⁻³		
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn
A 10 jours	0,5	0,17	0,6	0,07	0,08	5	3	1
40 jours	2,0	0,45	2,8	0,28	0,17	8	15	8
total	2,5	0,62	3,4	0,35	0,25	13	18	9
B 20 jours	1,1	0,35	1,4	0,18	0,08	3	7	5
40 jours	2,2	0,45	3,2	0,37	0,10	7	16	6
total	3,3	0,80	4,6	0,55	0,18	10	23	11
C 30 jours	1,9	0,45	3,0	0,32	0,10	8	16	6
40 jours	1,4	0,44	2,0	0,20	0,12	5	10	5
total	3,3	0,89	5,0	0,52	0,22	13	26	11
D 40 jours	2,5	0,45	3,8	0,43	0,22	13	23	10

TABLEAU 11 - Teneurs en éléments minéraux des vitroplants d'ananas.

	p. 100 M.S.					ppm M.S.		
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn
Vitroplants au moment de la mise en culture sur milieu liquide	3,41	0,580	4,42	0,361	0,141	95	98	73
Vitroplants après 40 jours de culture Renouvellement de la solution après :								
A 10 jours	3,81	0,771	4,54	0,429	0,179	269	167	99
B 20 jours	2,95	0,584	3,38	0,354	0,119	134	119	73
C 30 jours	3,84	0,746	4,57	0,417	0,178	244	169	101
D non renouvelée	3,40	0,508	4,14	0,452	0,168	213	196	94

TABLEAU 12 - Quantités d'éléments minéraux contenues dans les jeunes plants au début de l'expérimentation.

	mg					mg 10 ⁻³		
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn
A	0,8	0,14	1,1	0,09	0,03	2	2	2
B	1,0	0,16	1,2	0,10	0,04	3	3	2
C	1,1	0,18	1,4	0,12	0,05	3	3	2
D	1,0	0,17	1,3	0,10	0,04	3	3	2

TABLEAU 13 - Quantités d'éléments minéraux contenues dans les vitroplants d'ananas à la fin de la culture (40 jours) (calculées à partir de l'analyse des plants)

	mg					mg 10 ⁻³		
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Mn	Zn
A	3,7	0,75	4,4	0,42	0,18	26	16	10
B	4,5	0,90	5,2	0,54	0,18	20	18	11
C	5,5	1,08	6,6	0,60	0,26	35	25	15
D	4,4	0,66	5,4	0,59	0,22	28	25	12

P dans les organes jeunes en voie de croissance sont toujours les plus importants.

CONCLUSION

Les résultats de cet essai préliminaire, qui manque d'une référence : la culture sur milieu gélosé, confirment l'intérêt d'une culture sur milieu liquide. Mais surtout ils permettent

d'orienter les travaux à réaliser pour optimiser cette technique.

Le renouvellement de la solution nutritive; après 20 ou 30 jours, améliore en proportions limitées la croissance des vitroplants d'ananas. Même sans renouvellement de la solution les plants sont, semble-t-il, un peu mieux développés que sur milieu gélosé. Ainsi dans des conditions identiques, mais pas dans le même essai, des plants obtenus sur un milieu gélosé ayant la même composition pèsent environ 1,2 g (matière fraîche) et 120 mg (matière sèche).

Sur un milieu liquide il est vraisemblable que l'aération et peut-être une moindre acidification permettraient d'obtenir une amélioration. La nature, les concentrations, les proportions des sucres peuvent avoir également une certaine influence. Sous une énergie de 10 W l'hétérotrophie est apparemment pratiquement totale. Des travaux en cours ont montré, en culture sur milieu gélosé, une réponse très favorable des plants d'ananas à un accroissement de l'éner-

gie lumineuse; elle devrait être obtenue également sur milieu liquide.

La culture en boîtes de Pétri n'est certainement pas la mieux adaptée, en particulier des accumulations importantes de CO₂ peuvent se produire et avoir une influence négative.

Les quantités d'éléments et leurs proportions relatives dans la solution doivent être adaptées à la vitesse de croissance qui est elle-même dépendante de facteurs externes. La satisfaction des besoins en P - élément qui est totalement épuisé dans le milieu - pourrait conduire à une modification des rapports entre les différents constituants. Le rapport azote nitrique azote ammoniacal pourrait être modifié en fonction de l'âge de la culture.

* * *

Les analyses ont été effectuées par les laboratoires d'analyses organiques et biochimiques et d'analyses minérales des plantes du GERDAT à Montpellier.

BIBLIOGRAPHIE

- CASALE (I.M.O.) et GARCIA (E.L.). 1987.
Multiplicación clonal acelerada de tres variedades de Piña.
Archiv. Boletín Científico, 2, 3-18.
- MARCHAL (J.), TEISSON (C.), ESCALANT (J.V.) et NAVARRO-MASTACHE (L.C.). 1987.
Echanges minéraux et carbonés en culture *in vitro* : cas du bananier.
7e Colloque sur les Recherches fruitières, Bordeaux, déc. 1987, CTIFL-INRA, 135-145.
- MENGEL (K.) et KIRKBY (E.A.). 1982.
Principles of plant nutrition.
3rd Ed. International Potash Institute, 665 p.
- MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.
A revised medium for rapid growth and bio assays with tissue culture.
Physiologia Plantarum, 15, 473-487.
- RANGAN (T.S.). 1984.
Pineapple.
in *Handbook of plant cell culture - crop species*.
Ammirato (P.V.), Evans (D.A.), Sharp (W.R.), Yamada (Y.). Ed.
Macmillan Publishing Co, vol. 3, chapt. 14, 373-382.
- REDEI (G.P.). 1974.
Fructose effect in higher plants.
Ann. Bot., 38, 287-297.
- SENS (I.). 1988.
Approche sur la nutrition minérale et hydrocarbonée des bananiers en culture *in vitro*.
DEA Univ. des Sci. et Techn. du Languedoc, Montpellier, 47 p.
- SINGHA (S.), OBERLY (G.H.) et TOWNSEND (E.C.). 1987.
Changes in nutrient composition and pH of the culture medium during *in vitro* shoot proliferation of crabapple and pear.
Plant Cell Tissue and Organ Culture, 11, 209-220.
- SKIRVIN (R.M.), CHU (M.C.), MANN (M.L.), YOUNG (M.), SULLIVAN (J.) et FERMANIAN (T.). 1986.
Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, tissue and culture plant material.
Plant Cell Reports, 5, 292-294.
- ZEPEDA (C.) et SAGAWA (Y.). 1981.
In vitro propagation of pineapple.
HortScience, 16 (4), 495.

EINFLUSS DES REGENERATIONSRHYTHMUS DER LÖSUNGEN BEI ANANAS-INVITROKULTUREN MIT FLÜSSIGEM SUBSTRAT.

J. MARCHAL und D. ALVARD.

Fruits, dec. 1988, vol. 43, n° 12, p. 701-707.

KURZFASSUNG - Die Invitrokultur der Ananas mit gelöstem Medium bietet Chancen zur Verbesserung des Wachstums der Jungpflanzen. Der Zeitpunkt der Lösungserneuerung beeinflusst in Verbindung mit der Veränderung des pH-Werts der Zuchtmedien die Versorgung mit Mineralstoffen und Kohlenstoff.

Saccharose, die teilweise zu Fruktose und Glukose hydrolysiert, wird von der Pflanze mit Vorliebe aufgenommen. Bei geringer Energiezufuhr - 10 Wm² - ist die Funktionsweise der Ananas heterotroph.

Die Phosphoraufnahme ist hoch und den Lösungen mangelt es ziemlich schnell an diesem Element. Der Bedarf an Nitrat- und Ammoniakstickstoff richtet sich aller Wahrscheinlichkeit nach dem Entwicklungsstadium. Verbrauch und Effizienz der einzelnen Mineralstoffe steht mit deren Anteil in engem Zusammenhang.

INFLUENCIA DEL RITMO DE RENOVACION DE LAS SOLUCIONES EN CULTIVO *IN VITRO* DE PINA SOBRE MEDIO LIQUIDO.

J. MARCHAL y D. ALVARD.

Fruits, Dec. 1988, vol. 43, n° 12, p. 701-707.

RESUMEN - El cultivo *in vitro* de la piña sobre solución ofrece perspectivas de mejora del crecimiento de las plantas. La época de la renovación de las soluciones afecta a la nutrición mineral y carbonada en relación con la evolución del pH de los medios.

La sacarosa - que se hidroliza parcialmente en fructosa y en glucosa - es absorbida preferentemente por la planta. Bajo una escasa energía - 10 Wm² - las piñas tienen un funcionamiento heterotrofo.

La absorción del fósforo es fuerte y las soluciones se agotan rápidamente en este elemento. Las necesidades en nitrógeno nítrico o amoniacal están probablemente en función del estadio de desarrollo. El consumo de los diferentes elementos minerales y su eficacia están en relación con sus proporciones respectivas.

