

Micropropagation *in vitro* de l'ananas.

F. COTE, R. DOMERGUE, M. FOLLIOU, J. BOUFFIN et F. MARIE

INTRODUCTION

L'intérêt du vitroplant d'ananas est lié à sa rapidité de multiplication, à sa très bonne qualité sanitaire et à son faible encombrement. A l'IRFA, le vitroplant d'ananas est préféré au matériel classique de plantation (le rejet) dans les situations suivantes : dans le cadre d'un renouvellement variétal, pour la diffusion de nouvelles variétés sélectionnées (hybrides), pour l'échange de germplasm.

Les méthodes de micropropagation sont décrites dans la première partie de ce document. La seconde partie de l'exposé est une synthèse des communications présentées dans la session «culture *in vitro*» de la Réunion annuelle Ananas 1990. Ces travaux décrivent les possibilités de réaliser la phase de croissance de la micropropagation de l'ananas en conditions de nutrition carbonée autotrophique, l'influence du substrat de culture sur la croissance en phase d'acclimatation *in vivo*, des exemples de protocole d'acclimatation. Les performances agronomiques des plants d'ananas issus de culture *in vitro* sont discutées dans le thème «Amélioration variétale».

MICROPROPAGATION *IN VITRO* DE L'ANANAS METHODES

(DOMERGUE, R., Laboratoire de culture *in vitro* IRFA - Document de Réunion annuelle n° 63).

La multiplication *in vitro* de l'ananas est classiquement réalisée par prolifération de bourgeons (PANNETIER et LANAUD, 1976; RAMIREZ *et al.*, 1988). Au cours de cette micropropagation, trois phases successives sont distinguées : la culture initiale, la multiplication, la croissance (figure 1). Cette dernière phase est suivie du transfert *in vivo* des plants en phase d'acclimatation.

La phase de culture initiale.

- Les bourgeons sont prélevés sur une couronne ou plus rarement un cayeux. La couronne est parée (enlèvement des gaines foliaires) une première fois puis désinfectée

(hypochlorite de sodium à 8° chlore pendant 30 mn). Un deuxième cycle de parage-désinfection est ensuite réalisé en conditions stériles (hypochlorite de sodium à 6° chlore pendant 20 mn suivi de 3 rinçages à l'eau distillée). Chaque bourgeon, attaché à une portion de tige d'un demi cm³, est ensuite isolé et placé sur le milieu de culture. Dix à vingt bourgeons peuvent être isolés d'une couronne. Sur le haut de la tige, les bourgeons sont difficilement distinguables à l'oeil nu. Les bourgeons de cette zone sont cependant réactifs et peuvent être exploités en plaçant en culture la partie périphérique du haut de la tige.

- Le milieu de culture est constitué des éléments suivants : macro et micro-éléments minéraux de Murashige et Skoog (1962), Na₂ EDTA 20 mM ; Fe SO₄ 7 H₂O 20 mM ; saccharose 0,12 M ; vitamines de Morel (1950) ; acide 3-indole acétique 1,14 μM ; 6-benzylaminopurine 2,2 μM. Le pH du milieu est ajusté à 5,8. Le milieu est solidifié par un gélifiant (gelrite 2 g l⁻¹) ou utilisé liquide.

- Après 2 à 3 mois de culture, les plants issus des bourgeons de la couronne atteignent une taille de 1 à 2 cm. Ils sont alors transférés en phase de multiplication.

La phase de multiplication.

La phase de multiplication (= phase de prolifération) est réalisée en touffe de 3 à 6 explants. Cette touffe est obtenue en coupant longitudinalement le vitroplant en 2 ou 4 pour les plants les plus développés (ces 4 quarts restent alors attachés par la base du plant). Le milieu de multiplication est identique à celui de la phase de culture initiale, excepté pour les régulateurs de croissance (6-benzylaminopurine 2,2 μM). La durée moyenne de la phase de prolifération est de 1,5 mois. Le taux de multiplication pendant cette période est de 6 à 10.

La phase de croissance-enracinement.

Les plants issus de la phase de multiplication sont transférés sur le milieu de culture de base, sans régulateur de croissance.

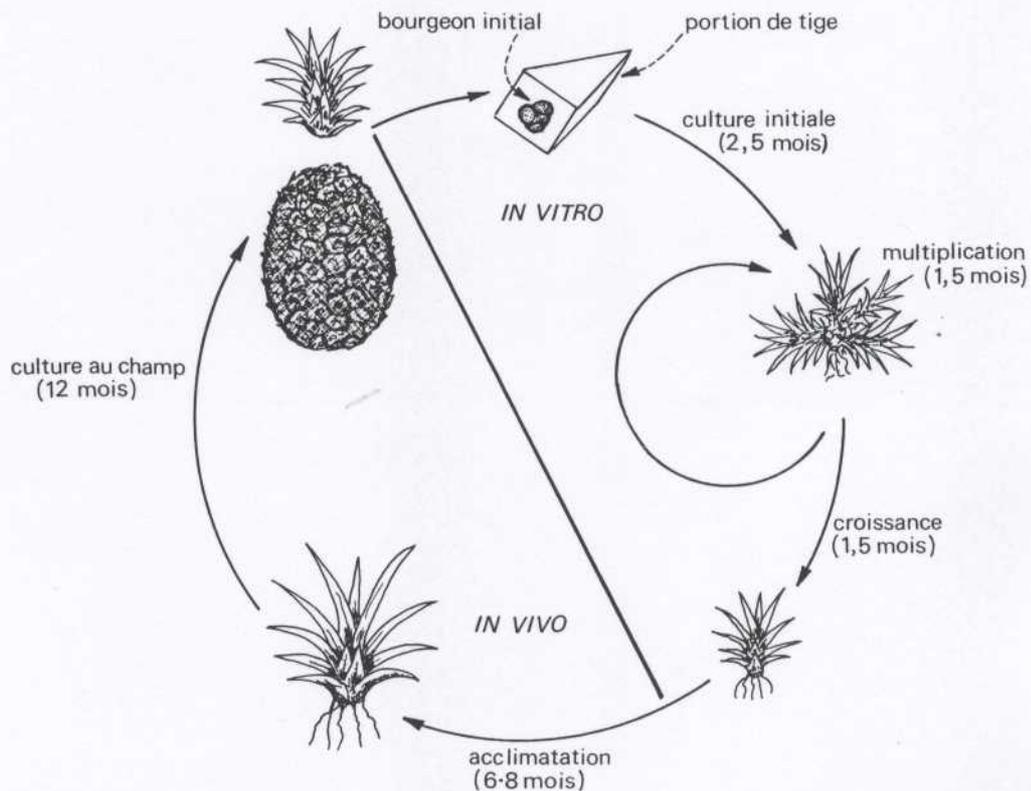


FIGURE 1 - Micropropagation *in vitro* de l'ananas. Représentation schématique des différentes phases de culture.

Sur ce milieu, les feuilles des plants se développent et les racines apparaissent. En production à grande échelle, ce sont des touffes de plants qui sont placés en croissance. Les plants les plus développés atteignent en un mois une masse de matière fraîche de 0,5 à 1 g et peuvent être transférés *in vivo* en phase d'acclimatation. Les plants les plus petits sont placés pendant un cycle supplémentaire en phase de croissance.

La phase d'acclimatation.

L'acclimatation est une étape intermédiaire entre la phase *in vitro* et la plantation au champ. Elle est réalisée en serre ou sous ombrière. Les conditions de son déroulement varient d'une station agronomique à l'autre, les deux règles communes suivantes sont cependant adoptées :

a) au niveau de l'intensité de l'éclaircissement, une transition progressive entre les conditions *in vitro* et l'éclaircissement naturel doit être respectée. Une ombrière de 80 p. 100 est généralement maintenue pendant les 3 premières semaines de la phase d'acclimatation. Cette valeur élevée d'ombrage n'est probablement pas optimum pour la croissance des vitroplants mais évite aux jeunes ananas de recevoir une insolation trop importante lorsque le soleil est au zénith. Un ombrage de 40 p. 100 est ensuite utilisé pendant 2 mois, puis de 10 p. 100 au cours des 3 derniers mois d'acclimatation ;

b) au début de la phase d'acclimatation, une humidité

saturante est maintenue au niveau des plants (à l'aide d'une toile plastique pour assurer un confinement et par brumisation d'eau).

Le substrat de culture utilisé a comme base principale le terreau ou la tourbe. En phase d'acclimatation, les plants passent d'une masse de matière fraîche d'1 g à une masse de 100 g en 6 mois environ. A ce stade de développement, ils peuvent être utilisés comme le matériel classique de plantation.

MICROPROPAGATION *IN VITRO* ESSAI DE REALISATION DE LA PHASE DE CROISSANCE EN CONDITIONS DE NUTRITION CARBONEE AUTOTROPHE

(COTE F., Laboratoire de culture *in vitro*, IRFA).

La micropropagation de l'ananas est maîtrisée à l'échelle de la production industrielle. Le taux de multiplication *in vitro* élevé facilite la gestion de cette production. Pour réduire le coût du vitroplant, il est cependant souhaitable de simplifier le protocole de micropropagation précédemment décrit.

La manipulation des plants en conditions stériles est la part principale du coût de production. Des essais sont en cours pour réaliser la dernière phase de la micropropagation *in vivo*.

Pour cela, il est indispensable d'utiliser un milieu sans saccharose dans le but d'éviter le développement de bactéries et de champignons. Dans cet exposé, on présentera les possibilités de réaliser la phase de croissance de la micropropagation de l'ananas dans des conditions de nutrition carbonée autotrophe.

Matériel et méthode.

- Matériel végétal : *Ananas comosus* Cayenne lisse. Les plants sont issus d'une phase de prolifération.

- Conditions standard de culture décrite ci-dessus. Les plants sont placés en boîte de 14 x 14 x 12 cm avec 200 ml de milieu par boîte, chaque boîte contient 250 plants ; photopériode : 12 h/12 h ; intensité lumineuse témoin : $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, température 28°C :

- Conditions de nutrition carbonée : 3 traitements ont été étudiés :

- . traitement 1 - milieu de culture avec saccharose, conditions standard de culture,
- . traitement 2 - milieu de culture avec saccharose, apport de CO_2 , intensité lumineuse élevée ($250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$).
- . traitement 3 - milieu de culture sans saccharose, apport de CO_2 , intensité lumineuse élevée.

L'apport de CO_2 est réalisé par balayage continu d'air enrichi en CO_2 . Le débit est choisi pour que la concentration de CO_2 dans la boîte de culture soit voisin de $2000 \mu\text{l l}^{-1}$.

Résultats et discussions.

- Après 35 jours de culture, les lots de plants placés sur un milieu sans source de carbone (traitement 3) ont accumulé 1,4 fois plus de masse de matière sèche que les plants témoins (traitement 1). Les plants bénéficiant à la fois de saccharose dans le milieu de culture et d'un apport de CO_2 (traitement 2) ont accumulé 1,9 fois plus de matière sèche que les plants témoins.

Ces résultats indiquent que la croissance de vitroplants d'ananas est possible sans source de carbone dans le milieu de culture, les possibilités de fixation photosynthétique de CO_2 existent dès la fin de la phase de multiplication. La croissance plus importante des plants du traitement 3 par rapport au témoin doit être interprétée avec prudence, la faible accumulation de matière sèche chez les plants de ce dernier traitement pendant la deuxième partie de la phase de culture traduit probablement l'existence de facteurs limitants du développement.

La présence d'une fixation photosynthétique de carbone s'ajoutant à la fixation hétérotrophique est l'explication la plus probable de la stimulation de croissance observée entre les traitements 2 et 3. Une fixation photosynthétique de CO_2 , *in vitro* sur un milieu de culture contenant du saccharose a été observée chez diverses plantes en micropropagation (MOUSSEAU, 1986 ; KOZAI et IWANAMI, 1988 ; NAVARRO, 1990). Le développement en conditions de nutrition carbonée autotrophique strictes est également possible chez le bananier en phase de croissance *in vitro* (NAVARRO, 1990).

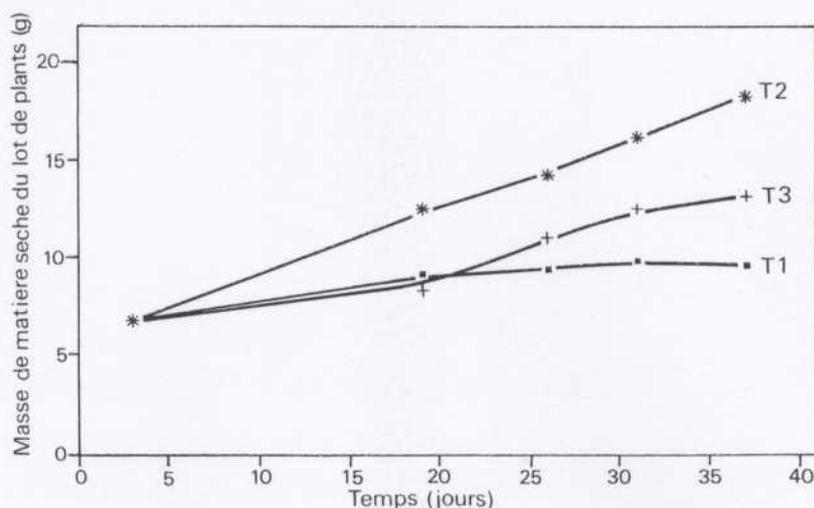


FIGURE 2 - Effet du type de nutrition carbonée sur la croissance *in vitro* de plants d'ananas.

. Traitement 1 : 40 g l^{-1} de saccharose dans le milieu de culture ; intensité lumineuse = $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; pas d'apport de CO_2 (pas de renouvellement de l'atmosphère du conteneur de culture).

. Traitement 2 : 40 g l^{-1} de saccharose ; intensité lumineuse = $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; concentration de CO_2 $2000 \mu\text{l l}^{-1}$.

. Traitement 3 : 0 g l^{-1} de saccharose ; intensité lumineuse = $250 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$; concentration de CO_2 $2000 \mu\text{l l}^{-1}$.

(Chaque point représente la masse d'un lot de 250 plants mis en culture dans un conteneur).

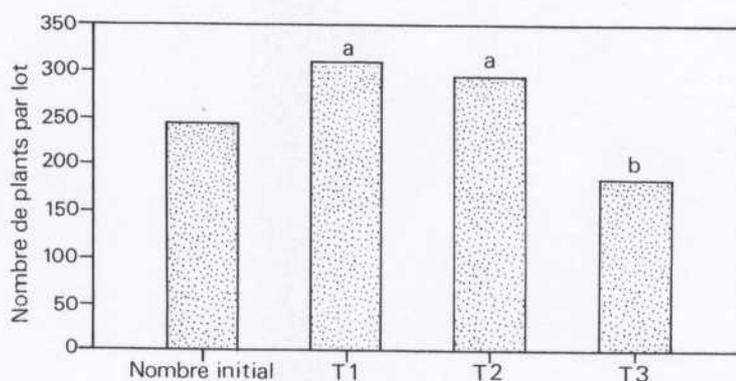


FIGURE 3 - Effet du type de nutrition carbonée sur le nombre de plants d'ananas à l'issue de la phase de croissance *in vitro*. (Traitement : voir figure 2 ; moyenne de 4 lots de 250 plants mis en culture par traitement ; a, b : groupes de moyennes non significativement différentes, $p = 0,05$).

- A la fin de la phase de croissance, le nombre de plants dans le traitement «autotrophie» est inférieur au nombre initial de plants mis en culture et au nombre de plants présents dans les traitements avec saccharose (figure 3). Il y a eu nécrose en début de culture d'une partie des jeunes plants placés sur le milieu sans sucre.

Des problèmes d'adaptation de très jeunes plants, présentant des surfaces chlorophylliennes réduites, à des conditions de nutrition carbonée autotrophique sont peut-être à l'origine de cette observation. Le passage des plants d'un milieu à 40 g l^{-1} de saccharose à un milieu dépourvu de cet élément pourrait perturber les flux hydriques de la plante et être à l'origine de nécroses.

- L'absence de saccharose dans le milieu de croissance modifie la répartition des plants du conteneur de culture en fonction de leur masse (figure 4). Les effectifs des classes de plants supérieurs à 3 g sont plus importants dans le traitement «sans saccharose» que dans les traitements «avec saccharose». Après 20 jours de culture, ceci intervient alors que la masse totale de plants est, en conditions d'autotrophie, inférieure ou égale à celle présente dans les traitements bénéficiant d'une source carbonée dans le milieu de culture.

Le type de répartition des plants obtenus dans des conditions de croissance autotrophique est la conséquence d'une compétition entre plants pour la lumière nécessaire

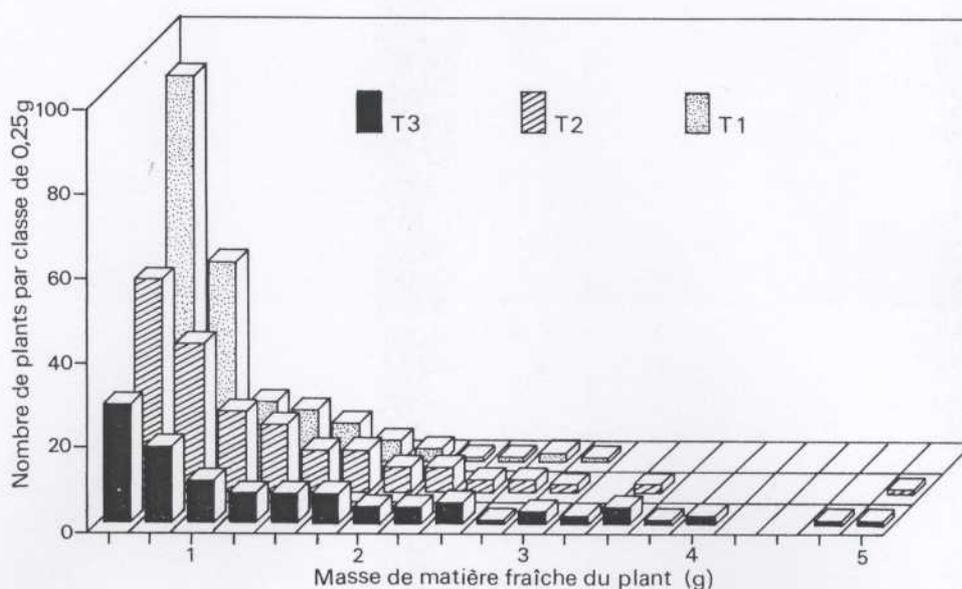


FIGURE 4 - Effet du type de nutrition carbonée sur la répartition de plants d'ananas par classe de masse après 20 jours de croissance *in vitro*. (Traitement : voir figure 2 ; lot de 250 plants mis en culture par traitement ; masse de matière fraîche après 20 jours de culture : T1 : 154 g ; T2 : 176 g ; T3 : 144 g).

à la réduction de CO₂ dans le cycle photosynthétique de CALVIN-BENSON. Cette compétition n'existe pas lorsque la nutrition carbonée est hétérotrophique.

En conclusion, ces quelques observations montrent que la dernière phase de croissance de la micropropagation de l'ananas peut se dérouler en autotrophie vis-à-vis du carbone. Cependant, sans saccharose dans le milieu de culture, une partie des plus jeunes plants se nécrosent. La suite des travaux a pour but de déterminer l'origine de ces nécroses et de préciser les conditions bioclimatiques à utiliser pour réaliser *in vivo* la phase de croissance en conditions autotrophiques de nutrition carbonée.

INFLUENCE DU SUBSTRAT DE CULTURE SUR LA CROISSANCE DE VITROPLANTS D'ANANAS EN PHASE D'ACCLIMATATION, DETERMINATION DE LA SURFACE FOLIAIRE DES PLANTS PAR UNE METHODE NON DESTRUCTIVE

(FOLLIOT M., MARCHAL J., Laboratoire de Physiologie végétale IRFA - Document de Réunion annuelle n° 46, 1990).

- La croissance de vitroplants de deux espèces d'ananas placés sur différents supports de culture à base de terreau, tourbe, perlite et sable a été suivie en serre tropicalisée.

La tourbe et le mélange terreau+perlite sont les substrats sur lesquels les plants des deux cultivars se développent le mieux (figure 5). D'un point de vue pratique, le substrat terreau + perlite est préférable à la tourbe. La culture de plants sur tourbe nécessite en effet un suivi étroit pour éviter les risques de déshydratation.

Sur les autres substrats de culture, le développement des plants varie en fonction de l'espèce d'ananas (figure 5). Les plants de 'TW 12' (*Ananas comosus*) ont une croissance plus importante que ceux de 'BR 67' (*Ananas lucidus*), quel que soit le support de culture sur lequel ils sont placés.

Des expérimentations sont en cours pour déterminer, avec le substrat terreau+ perlite, la nutrition minérale optimale à utiliser.

- Détermination par une méthode non destructive de la croissance de l'ananas. Il existe une relation étroite entre la surface projetée du plant, obtenue d'après photographie,

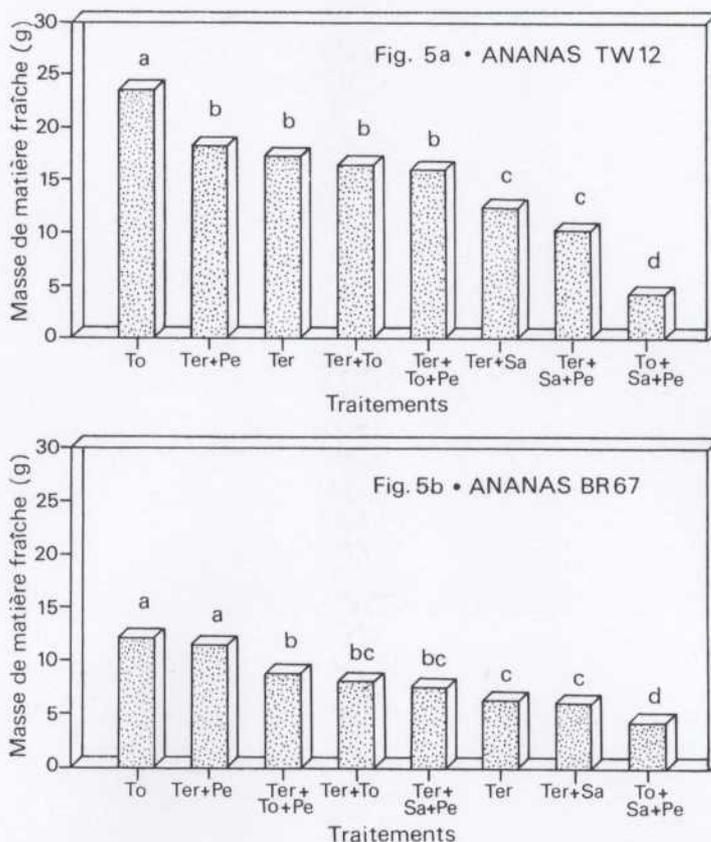


FIGURE 5 - Effet du substrat de culture sur la masse de matière fraîche d'ananas issus de culture *in vitro* après 4 mois de phase d'acclimatation. Figure 5a : *Ananas comosus* TW 12. Figure 5b : *Ananas lucidus* BR 12. (To : tourbe ; Ter : terreau ; Pe : substrat inerte (silicate d'alumine) ; Sa : sable ; a, b, c : groupes de moyennes non significativement différentes, p : 0,05).

et la surface foliaire totale du plant ou sa masse (FOLLIOT, 1990). La détermination de la surface projetée est une méthode non destructive simple pour évaluer la croissance d'un plant d'ananas pendant la phase d'acclimatation.

ACCLIMATATION DE VITROPLANTS D'ANANAS A LA REUNION

(BOUFFIN J., IRFA-Réunion - Document de Réunion annuelle n° 39).

Sur 2 500 plants de la variété «Queen Pomare», un taux de réussite au sevrage de plus de 99 p. 100 et une masse de matière fraîche moyenne de plants de 130 g après 13 mois

d'acclimatation ont été obtenus dans les conditions de culture suivantes :

- ombrage : 80 p. 100 d'ombrage en début de culture puis ombrage dégressif jusqu'à la fin de l'acclimatation ;

- substrat : terreau + sable (1:1, volume/volume) : l'utilisation de mottes individuelles de tourbe à humecter est déconseillée car elles se déshydratent trop rapidement pour être utilisées en routine ;

- conteneur de culture et densité de plantation : sac plastique d'un litre, 100 plants par m² ;



Photo 1 - Acclimatation de vitroplant d'ananas sous serre semi-ouverte.



Photo 2 - Stade 1.

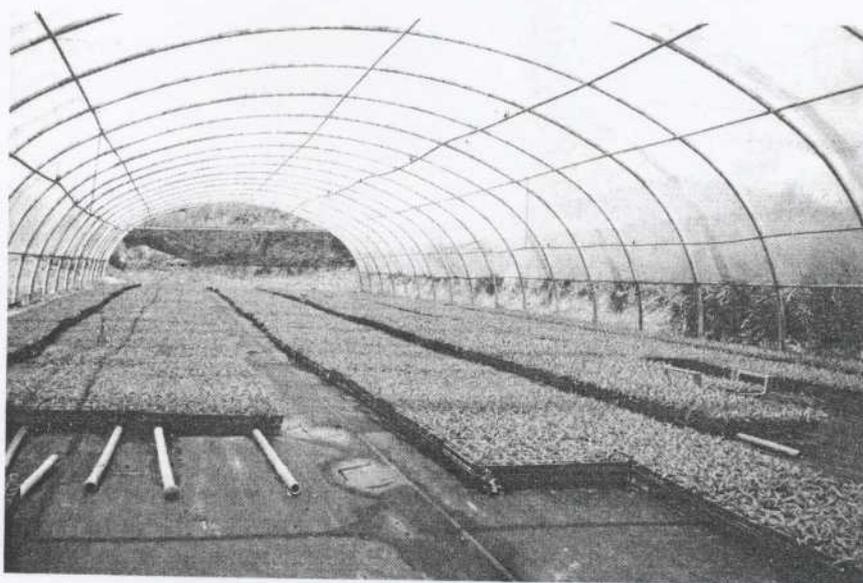


Photo 3 - Stade 2.



Photo 4 - Stade 3



Photo 5 - Mise au champ.

- fertilisation :

- . de 0 à 5 mois d'acclimatation : 0,1 g N+ 0,2 g de K₂O par plant
- . de 6 à 8 mois d'acclimatation : 0,4 g de N+ 0,8 g K₂O par plant
- . à partir du 9e mois d'acclimatation : 0,5 g N+ 1 g K₂O par plant.

Les éléments minéraux sont apportés par pulvérisation tous les 15 jours. Un apport d'oligo-éléments est réalisé au 3e et 7e mois.

Dix mois après repiquage au champ, les plants issus de culture *in vitro* ont produit des fruits de taille comparable à ceux obtenus avec des rejets.

ACCLIMATATION DE VITROPLANTS D'ANANAS A LA MARTINIQUE

(MARIE F., IRFA-Martinique).

Dans le cadre d'une opération de reconversion variétale, 240 000 vitroplants ont été plantés en Martinique depuis août 1989, à raison d'un lot de 20 000 plants par mois.

Les infrastructures et les mises au point techniques de différentes phases d'acclimatation ont été adaptées au nombre particulièrement important de vitroplants à sevrer.

Durant cette acclimatation, on peut distinguer 3 phases :

- le sevrage : dès leur arrivée, les plants sont individualisés, triés et plantés sur un substrat tourbe + sable (1:1 volume/volume) dans des plaques alvéolées comprenant chacune 60 individus.

Ces plaques, préalablement désinfectées, sont placées dans une serre fermée, à l'atmosphère confinée et saturée en eau, sous une double toile plastique assurant un ombrage de 80 p. 100.

Pendant 3 semaines, aucune fertilisation n'est apportée, seul un fongicide est appliqué et l'apport d'eau est assuré par de fréquentes pulvérisations (aspersion).

- L'endurcissement : les plants sur plaques alvéolées sont placés dans une serre semi-ouverte, sous un ombrage de 40 p. 100. Une solution nutritive est apportée régulièrement par aspersion. Cette phase a une durée de 2 mois.

- Le grossissement : les plants sont repiqués sur un substrat composé de sable et de ponce, à une densité de 50 plants m², sous une serre semi-ouverte avec un ombrage de 10 p. 100 (photo 1). Un système de goutte à goutte assure la fertilisation et l'alimentation hydrique. Un traitement insecticide et nématicide est effectué ainsi qu'un sarclage manuel régulier. A l'issue de cette phase qui dure 3 mois, les plants atteignent une masse de matière fraîche de 100 g environ et peuvent être transférés au champ.

De nombreuses observations sont en cours pour caractériser le comportement de ces vitroplants au champ. Le traitement d'induction florale a été réalisé après 12 mois de culture. La durée mise au champ-récolte est estimée à 18 mois, soit 2 ans après la réception des vitroplants.

BIBLIOGRAPHIE

FOLLIOT (M.). 1990.

Détermination par une méthode non destructive de la surface foliaire de plants d'ananas et de bananiers issus de culture *in vitro*, en phase d'acclimatation.
Fruits, 45 (3), 245-249.

FOLLIOT (M.) et MARCHAL (J.). 1990.

Influence du support de culture sur la vitesse de croissance des vitroplants d'ananas en phase d'acclimatation.
Fruits, 45 (4), 367-376.

KOZAI et IWANAMI. 1988.

Effects of CO₂ enrichment and sucrose concentration under high photon fluxes on plant growth of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in tissue culture during the preparation stage.
Japan Soc. Hort. Sci., 57, 279-288.

MOREL (G.). 1950.

Sur la culture des tissus de deux monocotylédones.
C.R. Acad. Sc. Paris, 230, 1099-1101.

MOUSSEAU (M.). 1986.

CO₂ enrichment *in vitro*. Effect on autotrophic and heterotrophic cultures of *Nicotiana tabacum* (var. Samsum).
Photosynthesis Research, 8, 187-191.

MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.

A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures.
Physiol. Plant, 47, 207-214.

NAVARRO. 1990.

Effet de l'intensité lumineuse, de l'aération et de l'enrichissement en CO₂ au cours de la micropropagation du bananier (*Musa acuminata* cv Petite Naine) sur le développement des plants *in vitro* et en phase d'acclimatation *in vivo*.
Thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 137 p.

PANNETIER (C.) et LANAUD (C.). 1976.

Divers aspects de l'utilisation possible des cultures *in vitro* pour la multiplication végétative de l'ananas.
Fruits, 31 (12), 739-750.

RAMIREZ (A.L.), SANTANA (N.), MARTINEZ (R.O.),

HERNANDEZ (A.), TERAN (Z.). 1988.
Tecnologías para la propagación acelerada de la piña (*Ananas comosus* L. MERR.).
Inca Boletín de Cultivos Tropicales, 1988, 5-50.