

Facteurs affectant la reprise au sevrage des vitroplants enracinés de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) régénérés par embryogénèse somatique

E. K. KONAN¹, D. ALLOU¹, S. DIABATE¹, B. KONE¹, N. HALA¹, A. E. ISSALI², J. K. YATTY³
T. DURAND-GASSELIN⁴

¹Programme Palmier, CNRA - Station de La Mé 13 BP 989 Abidjan 13, Côte d'Ivoire. E-mail : eugkonank@gmail.com

²Programme Cocotier, CNRA –STATION Marc Delorme, 07 BP 13 Abidjan 07, Côte d'Ivoire.

³Laboratoire de Biologie et Amélioration des Productions Végétales, UFR des Sciences de la Nature, Université Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

⁴PalmElit SAS B14, Parc Agropolis 2214 Boulevard de la lironde, 34980 Montferrier sur Lez (France)

Soumis le : 01 / 09 / 2014

Accepté le : 12 / 05 / 2015

RESUME

L'élevage des vitroplants de palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) pour les amener au stade de plants plantables comprend une phase préliminaire délicate. Il s'agit du sevrage, qui a pour but de les acclimater aux conditions naturelles. Cette étape n'excède pas trois à quatre semaines. Malgré la mise au point de nouvelles conditions de sevrage plus adaptées, l'on enregistre des pertes résiduelles augmentant ainsi le coût de production de vitroplants. Pour y remédier, les facteurs qui influencent une bonne reprise en acclimatation ont été recherchés à partir de 70 000 plants sortis des tubes d'enracinement. A la fin de 3 semaines de sevrage, les plants vivants ont été comptés, puis les pourcentages de reprise pour chacune des 81 combinaisons constituées de plants ont été calculés. Le pourcentage moyen global de reprise a été d'environ 90 % pour l'ensemble des combinaisons. Néanmoins, les résultats sur plusieurs sorties ont mis en évidence une influence significative de la qualité morphologique des plants enracinés. La reprise dépend fortement du développement foliaire, notamment la taille des plants racinés. La bonne qualité des racines produites *in vitro* concourt aussi au succès de la reprise en l'acclimatation, mais ce facteur n'est pas déterminant. Le nombre de racines est sans effet notable, mais interagit avec les deux autres variables. Les plantules ayant enregistré un bon développement foliaire et racinaire (Groupe A), celles moyennement bien développées (Groupe B) ainsi que celles faiblement développées ont exprimé respectivement 97 %, 91 % et 77 % de taux de reprise. Le taux de reprise global des plants transférés en sol était de 92 %, grâce à une méthode de sevrage simple qui assure, pendant 3 à 4 semaines, une adaptation progressive des plants aux conditions naturelles et qui regroupe les plants en classes de racines.

Mots clés : Culture *in vitro*, palmier à huile, enracinement, sevrage, taux de reprise.

ABSTRACT

FACTORS INFLUENCING THE RECOVERY DURING THE WEANING STAGE OF THE OIL PALM RAMETS REGENERATED VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS

Raising *in vitro* plantlets of the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) regenerated via somatic embryogenesis to the stage where they are ready to be planted includes preliminary delicate phase - weaning - which is intended acclimatize them to natural conditions. This stage doesn't exceed 3 to 4 weeks. In spite of the development of new conditions of weaning more adapted, we note residual losses increasing the production costs of to ramets. To remedy there, the factors influencing a good recovery in acclimatization of oil palm vitroplants regenerated by somatic embryogenesis were investigated using 70,000 plantlets taken out from rooting tubes. Three weeks after the weaning, the alive plantlets were scored, and then the percentages of recovery for each of the 81 plants combinations were calculated. The total average percentage of recovery was approximately 90 %. Nonetheless, the results observed on several outlets showed a significant influence of the morphological quality of rooted plantlets. The recovery strongly depends on the leaf growth, in particular the height of rooted plantlets. The good quality of roots produced with *in vitro* culture also

contributes to the success of acclimatization, but this factor is not determining. In contrast, the roots number does not influence acclimatization, but is correlated with two other variables. Plantlets with good leaf and root growth (Group A), those fairly grown (Group B), as well as those weakly grown (Group C) expressed a success rate of 97 %, 91 % and 77 %, respectively. The overall rate of recovery of plantlets transferred in ground was 92 %, thanks to a simple method of weaning which provides for 3 to 4 weeks, a gradual adaptation of plantlets to natural conditions and which clusters the plantlets in root clusters.

Keywords : *In vitro* culture, recovery rate, somatic embryo-derived plantlets, rooting, recovery percentage, weaning.

INTRODUCTION

L'étape de transfert des vitroplants en conditions naturelles, appelée aussi le sevrage ou l'acclimatation (Dustan et Turner, 1984), a été définie comme un processus contrôlé par l'homme pour adapter un organisme à un environnement donné (Brainerd et Fuchigami, 1981). C'est la dernière étape de tout procédé de micropropagation végétale. Elle doit être maîtrisée car à la sortie du tube d'enracinement, le vitroplant a déjà une valeur économique importante (Kozai, 1991).

L'acclimatation est nécessaire car le matériel végétal dans le tube à essais est dans un environnement d'hygrométrie voisine de 100 % qui n'est pas adapté aux conditions naturelles. Les vitroplants régénérés *in vitro* restent sensibles à une diminution trop brusque de l'humidité relative. C'est pourquoi, une méthode de sevrage adaptée aux vitroplants de palmier à huile a été mise au point pour limiter les pertes de transfert. En effet, des pertes pouvant atteindre jusqu'à 50 % des vitroplants de palmier à huile transférés au sevrage ont été enregistrées avec le protocole d'acclimatation mis au point par Ahée *et al.* (1981). Ces pertes jugées trop élevées, étaient essentiellement liées aux difficultés de maîtrise des conditions physiques d'environnement du transfert en condition naturelle. Ainsi des conditions de sevrage plus adaptées aux plants avaient été définies (Konan *et al.*, 1989 ; Wuidard et Konan, 1989). Malgré l'amélioration des conditions de sevrage, le taux de reprise des vitroplants n'atteignait pas plus de 85 %. Or dans notre système de micropropagation du palmier à huile, le coût de régénération du vitroplant enraciné reste encore élevé. Il a été estimé à 10 fois le prix de la graine germée de palmier à huile à cause du coût élevé des charges de production (Konan, 2011). Celles-ci incluent plusieurs niveaux de dépenses

dont les charges d'achat des consommables chimiques importés et de l'énergie électrique nécessaire au maintien des salles de culture à la bonne température et aux conditions requises de lumière et d'hygrométrie. Dans le but de réduire les coûts de production en micropropagation végétale, des tentatives d'adaptations de protocoles par des alternatives moins coûteuses ont été rapportées ailleurs : Ananas comosus (Be et Debergh, 2006), *Vetiveria zizanioides* L. (Be *et al.*, 2008). L'impact négatif des pertes résiduelles sur le coût de production des vitroplants de palmier à huile a donc conduit notre laboratoire à orienter les études du sevrage vers la recherche de plants potentiellement aptes à supporter les stress du transfert. L'influence de différents facteurs de développement des vitroplants, sur leur reprise a donc été étudiée. Chez beaucoup de végétaux, l'implication des feuilles et des racines développées *in vitro* sur la réussite au sevrage a été souvent mise en évidence (Marin et Gella, 1987 ; Karhu et Ulvinen, 1995 ; Diaz-Pérez *et al.*, 1995 ; Youmbi *et al.*, 2005 ; Mazinga *et al.*, 2014). Cette étude a donc été initiée pour évaluer et comprendre l'impact de ces facteurs sur le comportement des vitroplants de palmier à huile sortis de l'*in vitro*.

MATERIEL ET METHODES

L'influence sur la réussite du transfert des trois groupes de plants racinés ou classes de racines, distingués à leur sortie des tubes d'enracinement par la présence ou non de racines secondaires (plants enracinés de la classe « A », « B » et « C ») a d'abord été testée et l'évolution des pertes en fonction du temps a été suivie. L'influence sur la reprise, d'autres facteurs comme le nombre de racines et la taille des plants à leur sortie du tube d'enracinement, a été évaluée ensuite.

MATERIEL VEGETAL

Près de 70 000 pousses feuillées enracinées appartenant à 62 clones différents ont été utilisées. L'isolement des pousses feuillées pour l'enracinement (Figure 1 A) a été réalisé après 24 à 36 semaines de conversion des massifs de souches polyembryoniques préalablement placés dans des bocal sur un milieu de germination enrichi en saccharose (Konan *et al.*, 2006). L'opération d'isolement a consisté à détacher manuellement, une à une, à l'aide d'un scalpel, les pousses feuillées assemblées en touffe de plants caractérisés par des niveaux de développement morphologique différents. A l'isolement, les pousses feuillées ont présenté différents stades de développement et ont été d'aspect morphologique hétérogène. Seules les plus développées, avec une taille dépassant 5 cm ont été utilisées. Certaines pousses feuillées pouvaient atteindre jusqu'à 10 à 12 cm, mais cela dépend de la durée de l'étape de callogenèse.

CONDITIONNEMENT ET METHODES DE TRANSFERT DES VITROPLANTS AU SEVRAGE

Conditionnement du matériel végétal

L'enracinement a été fait dans des tubes à essais en enfonçant les pousses feuillées dans le milieu de culture à environ 2 centimètres (Figure 1 B) et cette étape a eu lieu en salle de culture à une température de $30^{\circ} \text{C} \pm 1$. Un éclairage de $40 \mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-2}$ (12 heures par jour) a été requis. L'humidité relative des salles d'enracinement a été de $50 \pm 5 \%$. L'étape de l'enracinement *in vitro* des pousses feuillées a duré 12 semaines.

Préparation du transfert

A la fin de l'enracinement, les plants sont sortis des tubes de culture avec précaution et lavés abondamment à l'eau courante en prenant soin de ne pas briser les racines (Figure 1 C). Toute trace de milieu de culture a été éliminée, afin d'éviter les contaminations par des micro-organismes. Trois groupes de plants racinés correspondant à des traits qualitatifs caractéristiques des racines ont été distingués (Figure 1 D, Tableau 1). Aucune classe n'a été définie pour le poids des plantules. Ce facteur a néanmoins été mesuré pour chaque plantule quand cela a été nécessaire.

Transfert des plants au sevrage

La méthode d'acclimatation des vitroplants de palmier à huile de Ahée *et al.* (1981) a été adaptée à l'aide des travaux de terrain en Côte d'Ivoire (Konan *et al.*, 1989 ; Wuidart et Konan 1989). Les plantules ont été repiquées dans le sable mouillé en maintenant le pseudo-bulbe au dessus de la surface du sol. Les vitroplants ont été repiqués par clone, en les mettant selon la qualité de l'enracinement (Tableau 1). Une classification plus fine de la qualité des plants enracinés a été nécessaire, en tenant compte, de la taille des pousses feuillées et du nombre de racines (1, 2, 3 ou plus) développées par plant à leur sortie des tubes d'enracinement (Tableau 2). La densité de repiquage a été de 400 plants par m^2 .

L'étape de sevrage a duré 3 à 4 semaines et a lieu sous ombrière en matière plastique, filtrant 50 % de la lumière. Les interventions humaines se sont limitées à l'arrosage et aux traitements phytosanitaires comme rapportés par Konan *et al.* (1989) et par Wuidart et Konan (1989). Il n'y a pas eu d'apport de fumure. Le sevrage a été considéré comme terminé à 3 semaines.

Evaluation du sevrage

Le nombre de vitroplants vivants à la fin du sevrage a permis de calculer le taux de reprise au sevrage selon la formule suivante :

$$\% \text{ plants sevrés} = \frac{\text{Nombre de plants vivants}}{\text{Nombre total de plants transférés au sevrage}} \times 100$$

a) Etude de l'influence de la qualité de l'enracinement des plants sur la reprise au sevrage

Les plants mis au sevrage ont été regroupés selon la qualité de leurs racines comme défini précédemment : plants de classe « A » bien racinés, plants de classe « B » moyennement racinés et plants de classe « C » faiblement racinés. Le taux global de reprise a été calculé pour 62 758 plants, après 3 semaines de sevrage.

b) Etude de l'influence de la taille du plant, du nombre et de la qualité des racines développées *in vitro* sur la reprise au sevrage

Trois facteurs morphologiques caractérisant le plant enraciné ont été testés :

- la qualité des racines développées (« A » « B » et « C ») ;

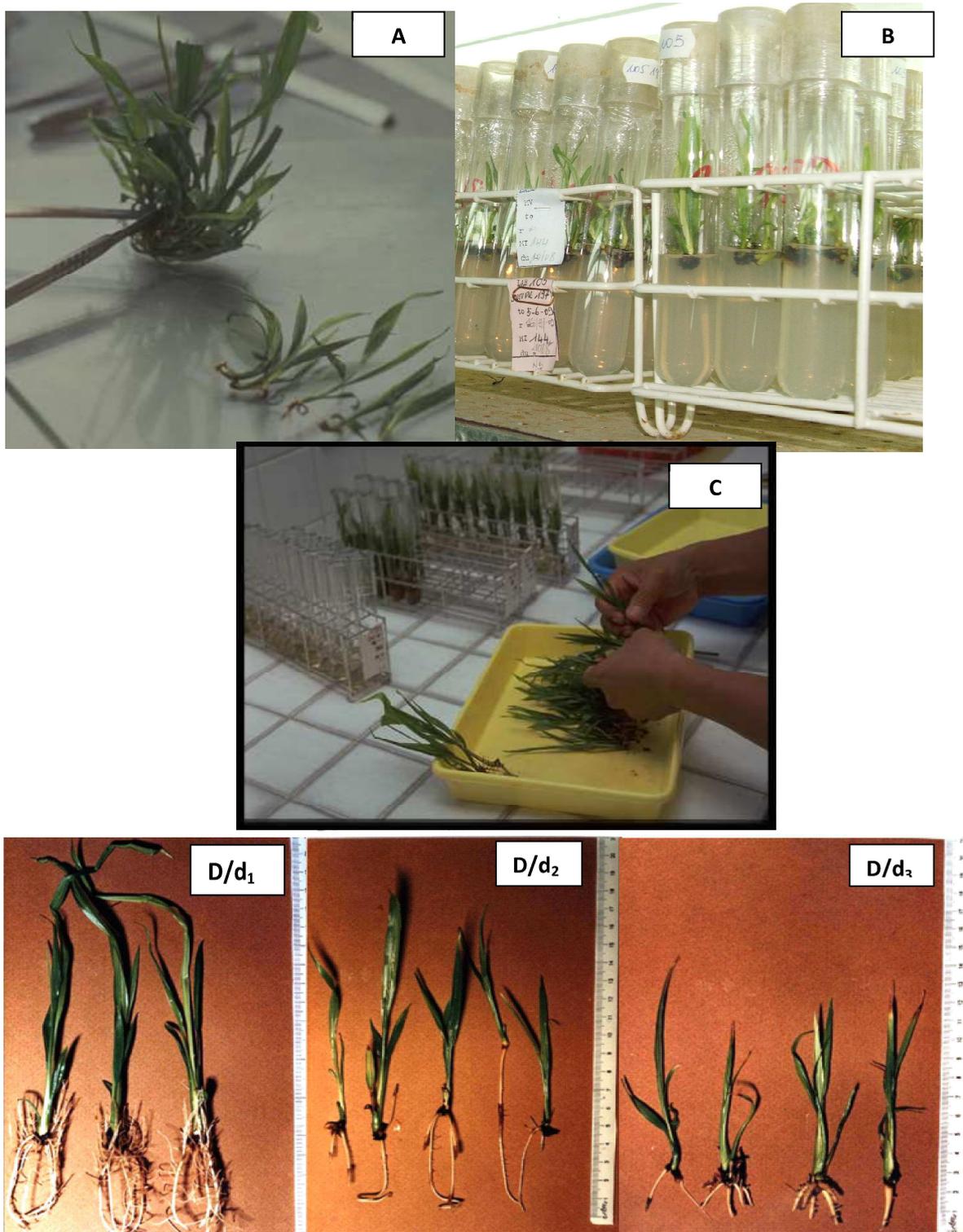


Figure 1 : Etapes d'enracinement et qualité des racines produites *in vitro*

Rooting stages and quality of roots produced in vitro

- A) Isolement manuel au scalpel des pousses feuillées développées après 36 semaines de caulogénèse pour leur enracinement
 B) Enracinement *in vitro* des pousses feuillées isolées ;
 C) Lavage à l'eau courante des traces de gélose sur les racines des pousses feuillées sorties des tubes d'enracinement pour leur acclimatation en condition naturelle ;
 D) Plants racinés *in vitro* regroupés par la qualité de développement racinaire - d1 : Plants racinés de type " A " - d2 : Plants racinés de type " B " - d3 : Plants racinés de type " C "

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques des classes de vitroplants à la fin de la rhizogenèse
Morphological characteristics of vitroplants classes at the end of rhizogenesis

Classes ou Groupe de plantules après l'enracinement	Qualité du système racinaire développé in vitro	Nombre de racines développées
A	Présence de racines secondaires bien développées (> 1 cm)	1 à 5 racines Longueur moyenne : 8 cm
	Absence de racines secondaires bien développées	
B		1 à 5 racines Longueur moyenne : 3 cm
C	Pas de racines secondaires	1 à 5 racines Longueur moyenne : 1 cm

Tableau 2 : Définition des classes "tailles de plantules" à la fin de l'enracinement
Definition of "seedlings height" classes at the end of rooting

Classes plantules	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tailles partie aérienne (cm)	4 à 6	6 à 8	8 à 10	10 à 12	12 à 14	14 à 16	16 à 18	18 à 20	20 et plus

- le nombre moyen de racines émises (1, 2, 3 Racines et plus) ;

- la taille et le poids des plants à 9 niveaux de taille : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9.

Quatre vingt (81) objets ou combinaisons (3 x 3 x 9 = 81) de niveaux des 3 facteurs ont été constitués (Tableau 3). Aucune classe n'a été définie pour le poids du plant qui est cependant mesuré.

Les plants ont été repartis entre ces combinaisons et mis au sevrage. En pratique, les 81 objets ne peuvent avoir un effectif de plants identique. Ainsi, pour avoir un effectif de plantules par objet à peu près comparable, nous avons utilisé un grand nombre de clones et de plants. Au total 1765 plants provenant de 13 clones ont été utilisés pour l'étude. A la fin du sevrage, les plants vivants ont été comptés et les pourcentages de reprise par combinaison calculés.

ANALYSES STATISTIQUES

Au sevrage, la comparaison de la reprise des plants selon les trois qualités des racines (Classe A, B et C) a été réalisée par une analyse de variance après transformation angulaire des proportions. La probabilité de reprise des plants au sevrage en fonction des facteurs considérés (qualité et nombre de racines, taille et poids du plant) a été modélisée à l'aide d'une régression logistique par la procédure NL Mixed du Statistical Analyse System (SAS Institut, 1999). Les données modélisées ont été soumises à une analyse de variance. Pour toutes les ANOVA réalisées, lorsqu'une différence a été significative (au seuil de 5%), le test de Newman et Keuls a été réalisé pour séparer les moyennes. Les corrélations entre variables (facteurs morphologiques de la reprise) et le niveau de survie des plants au sevrage ont été traitées par une technique d'analyse multivariée : l'analyse en composantes multiples (ACM) (Dagnelie,

Tableau 3 : Constitution des 81 objets ou combinaisons ($3 \times 3 \times 9 = 81$) de niveaux des 3 facteurs.*Constitution of 81 combinations ($3 \times 3 \times 9 = 81$) to 3 factor levels.*

Classes Qualité des racines	A			B			C		
Nombre de Racines	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Classes Taille									
1	A11	A21	A31	B11	B21	B31	B11	B21	B31
2	A12	A22	A32	B12	B22	B32	B12	B22	B32
3	A13	A23	A33	B13	B23	B33	B13	B23	B33
4	A14	A24	A34	B14	B24	B34	B14	B24	B34
5	A15	A25	A35	B15	B25	B35	B15	B25	B35
6	A16	A26	A36	B16	B26	B36	B16	B26	B36
7	A17	A27	A37	B17	B27	B37	B17	B27	B37
8	A18	A28	A38	B18	B28	B38	B18	B28	B38
9	A19	A29	A39	B19	B29	B39	B19	B29	B39

1975). Cette méthode d'analyse a pour objectif de condenser l'essentiel des informations apportées par les variables observées, pouvant être inter-corrélées en un nombre restreint de variables synthétiques et indépendants. Ces dernières conduisent à visualiser avec un minimum de déformation les variables observées dans une expérimentation donnée. Les résultats sont exprimés sous forme de graphes (plans factoriels) où sont projetés les individus et les variables observées.

RESULTATS

Influence de la qualité de l'enracinement des plants sur la réussite du sevrage

Le taux moyen global de reprise a été de 92 % pour toutes les qualités de racines confondues, avec une variation de 90 % à 94 %. Les différences de comportement entre les 3 groupes de plants racinés « A », « B » et « C » sont hautement significatives. Les plantules du groupe racinaire « A » (97 %) et « B » (91 %) ont eu les meilleurs taux de reprise de plants sevrés. Ces taux ne sont pas statistiquement différents. Les plants du groupe « C » ont eu le plus faible taux de reprise avec 77 % de plants sevrés (Tableau 4).

Influence combinée de la taille du plant et du nombre de racines développées sur la reprise au sevrage

Effet de la taille du plant

La reprise des plants au sevrage a été très significativement dépendante de la taille de la plantule ($p < 0.0001$). On a observé 27 % de reprise pour les plants de taille inférieure à 8 cm (classe taille 2) et plus de 80 % pour les plants de plus de 14 cm (classe taille 6 à 9) (Tableaux 5 et 6). Le développement foliaire du plant a été donc un facteur déterminant de la reprise. Ceci veut signifier que les plants qui ont développé des racines de faible qualité à la fin de l'enracinement (classe C) et qui réussissaient au sevrage sont ceux qui ont un bon développement foliaire (grande taille). A l'inverse, les plants qui ont enregistré un bon développement racinaire (classe A) et qui ne survivaient pas au sevrage, sont ceux de petite taille (< 14 cm).

Effet de la qualité des racines du plant

La qualité des racines développées a eu une influence significative sur la reprise. On a observé 80 % de reprise au sevrage pour les plants racinés de qualité «A» et 70 % pour les «B» et «C» (Tableau 7). Cet effet qualité des racines sur la reprise est confirmé encore dans cet essai,

Tableau 4 : Pourcentage de reprise des plantules 3 semaines après sevrage.*Recovery percentage of seedlings 3 weeks after weaning*

N° et date de sortie des plants au sevrage	Nbre de clones	Grpe de plantules	Effectif mis au sevrage à to	Plants vivants fin du sevrage	% plants vivants
Sortie n° 1 (Mars 1986)	34 clones	A	665	4527	97
		B	4103	3815	93
		C	1044	884	85
Total			9812	9226	94
Sortie n° 2 (Juillet 1986)	7 clones	A	4253	4060	95
		B	3670	3238	88
		C	672	573	85
Total			8595	7871	92
Sortie n° 3 (Décembre 1986)	10 clones	A	6731	6510	97
		B	5450	4854	89
		C	1242	727	59
Total			13423	12094	90
Sortie n° 4 (Janvier 1987)	25 clones	A	15412	14905	97
		B	11200	10377	93
		C	4316	3402	79
Total			30928	28684	93
Total sorties		A	31061	30002	97 a
		B	24423	22287	91 a
		C	7274	5586	77 b
Total			62758	57875	92

F = 13,57
Prob = 0,002

quoique dans cette expérience, les taux de reprise des plants « A » et « B » soient statistiquement différents.

Influence du nombre de racines

Le nombre de racines du plant n'a pas d'influence significative sur la reprise, mais ce facteur interagit, en moyenne, avec les deux autres facteurs (Tableau 8).

Corrélation entre facteurs et individus

Un diagramme de dispersion dans lequel apparaissent, dans chacun des 4 variables observées (qualité des racines, nombre racines, taille des plantules et le niveau de survie), les points représentatifs des individus observés a été établi (Figure 2).

Le comportement des objets peut être décrit par deux facteurs (axe 1 et axe 2) qui rendent compte respectivement de 11,15 % et 9,77 % de la variation totale.

Sur le premier axe (axe 1), on peut retenir qu'il y a une opposition très nette entre les niveaux de survie GG6 /GG5 /GG4 et GG1 (très fort niveau de survie et très faible niveau de survie). Il y a opposition entre les modalités extrêmes et les modalités moyennes. La figure 2 montre également que les niveaux de survie se répartissent autour d'une parabole. Les classes

de taille se répartissent sur la même courbe. Ce qui montre bien qu'il y a un lien étroit entre la taille et le niveau de survie. Les individus de grande taille (T9, T8, T7, T6 et T5) sont très liés à GG6 (très fort niveau de survie). Les individus de petite taille (T1, T2) sont très liés à GG1 (faible niveau de survie). Les individus de taille moyenne (T3 et T4) sont, quant à eux, associés à un moyen niveau de survie.

Pour ce qui concerne la qualité des racines, on voit sur l'axe 1 que les objets à enracinement « A » ont un bon niveau de survie, ils sont liés à GG6. Par contre, pour les objets « B » et « C » qui sont très liés entre eux, la survie peut être moyenne ou faible.

Dans le deuxième axe (axe 2) on note que tous les objets à 1 racine (1 R) ont un niveau de survie autour de GG2 et GG3. Pour les plants à 2 racines (2 R), des individus peuvent aussi bien avoir un bon niveau de survie qu'un niveau de survie très faible. Les individus à 3 racines sont projetés sur l'axe 1 avec une mauvaise qualité de représentation.

La figure 2 confirme effectivement que le facteur intervenant dans la reprise des plantules est la taille des plantules au sevrage. Les individus de grande taille, quels que soient la classe et le nombre de racines, sont très liés à GG6 et GG5. En revanche, tous les individus de petite

Tableau 5 : Taux de reprise des plantules au sevrage en fonction de la qualité des racines, le nombre de racines et la taille du plant.
Recovery percentage of seedlings at weaning according to roots quality, the number of roots and the height of plant.

Classes qualité et nombre de racines	Classes tailles des plants	Effectif plants au sevrage	Poids moyen des plants (mg)	Effectif plants fin sevrage	Classes qualité et nombre de racines	Classes tailles des plants	Effectif plants au sevrage	Poids moyen des plants (mg)	Effectif plants fin sevrage	Classes qualité et nombre de racines	Classes tailles des plants	Effectif plants au sevrage	Poids moyen des plants (mg)	Effectif plants fin sevrage	Classes qualité et nombre de racines	Classes tailles des plants	Effectif plants au sevrage	Poids moyen des plants (mg)	Effectif plants fin sevrage	%	%	Effectif Plants fin sevrage	%
A1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	5	287,6	1	20	2	3	268,33	2	2	2	8	405,00	2	2	2	8	405,00	2	67	2	25	
	3	8	480,87	7	88	3	18	338,00	3	3	3	10	382,73	3	3	3	19	382,73	3	56	10	8	42
	4	30	596,90	25	83	4	31	464,96	4	4	4	24	487,96	4	4	4	34	487,96	4	77	24	22	65
	5	39	675,90	35	90	5	33	498,40	5	5	5	27	559,15	5	5	5	36	559,15	5	82	27	24	67
	6	62	697,23	50	81	6	45	615,56	6	6	6	32	649,57	6	6	6	28	649,57	6	92	32	23	82
	7	42	801,00	38	90	7	23	759,13	7	7	7	20	787,04	7	7	7	23	787,04	7	87	20	16	70
	8	42	1027,32	34	81	8	11	851,00	8	8	8	6	1236,93	8	8	8	16	1236,93	8	55	6	12	75
	9	50	1352,71	46	92	9	4	1040,33	9	9	9	4	1491,75	9	9	9	16	1491,75	9	100	4	9	56
Total	278	853,15	236	85	Total	168	567,81	Total	125	74	Total	180	706,55	Total	116	64	180	706,55	Total	74	125	74	64
A2	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	3	603,33	1	33	2	1	326,00	2	2	2	0	288,00	2	2	2	3	288,00	2	0	0	0	67
	3	11	792,70	5	45	3	7	378,25	3	3	3	3	518,00	3	3	3	15	518,00	3	43	3	4	27
	4	31	725,63	19	61	4	21	446,40	4	4	4	11	553,11	4	4	4	16	553,11	4	52	11	12	75
	5	32	784,84	28	88	5	24	581,04	5	5	5	17	653,47	5	5	5	21	653,47	5	71	17	13	62
	6	43	781,71	39	91	6	24	722,37	6	6	6	22	758,00	6	6	6	14	758,00	6	92	22	10	71
	7	42	934,51	40	95	7	18	793,33	7	7	7	16	825,46	7	7	7	15	825,46	7	89	16	13	87
	8	34	1046,34	29	85	8	10	805,50	8	8	8	10	862,02	8	8	8	7	862,02	8	100	10	7	100
	9	83	1436,32	78	94	9	8	1119,87	9	9	9	7	1681,28	9	9	9	13	1681,28	9	88	7	12	92
Total	279	1024,32	239	86	Total	113	662,44	Total	86	76	Total	104	815,13	Total	73	70	104	815,13	Total	76	86	73	70
A3	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	2	671,50	1	50	2	1	513,27	2	2	2	5	572,14	2	2	2	7	572,14	2	-	5	0	0
	3	8	713,62	5	63	3	11	657,21	3	3	3	13	775,95	3	3	3	14	775,95	3	45	13	10	71
	4	42	897,78	24	57	4	20	621,07	4	4	4	20	850,80	4	4	4	22	850,80	4	65	20	15	68
	5	43	992,95	33	77	5	28	804,34	5	5	5	22	949,65	5	5	5	25	949,65	5	71	22	22	88
	6	56	1005,82	51	91	6	26	1005,57	6	6	6	19	1015,65	6	6	6	26	1015,65	6	85	19	19	100
	7	53	1034,07	49	92	7	23	972,23	7	7	7	9	1385,86	7	7	7	19	1385,86	7	83	9	15	75
	8	51	1087,64	48	94	8	13	972,23	8	8	8	10	944,29	8	8	8	20	944,29	8	69	10	20	91
	9	98	1506,43	93	95	9	14	1288,66	9	9	9	10	1385,86	9	9	9	22	1385,86	9	71	10	20	91
Total	353	1137,92	304	86	Total	135	796,17	Total	98	73	Total	155	944,29	Total	126	81	155	944,29	Total	73	98	126	81

Tableau 6 : Reprise des plants en fonction de la taille au sevrage
Recovery plants according to the height at the weaning

Classes Tailles	Pourcentage de reprise
T1	
T2	26,56 c
T3	52,78 b
T4	66,92 b a
T5	77,80 a
T6	86,42 a
T7	89,13 a
T8	82,48 a
T9	86,70 a
P < 0,001	
Khi ² = 98,76	

Tableau 7 : Reprise des plants au sevrage en fonction de la qualité des racines
Recovery of plants at the weaning according to the roots quality

Classes racines	Pourcentage de reprise
Classe A	79,95 a
Classe B	71,82 b
Classe C	70,18 b
P = 0,0219	
Khi ² = 7,64	

Tableau 8 : Nombre de racines à la reprise des plants après le sevrage
Roots number at recovery after weaning

Sources de variation	DDL	Khi ²	PROBA
Nombre de Racines	2	1,76	0,4158
Nombre Racines × Classes Racines	4	13,41	0,0095
Nombre Racines × Classes Taille	14	32,32	0,0036
Classes racines × Classes Taille	14	10,37	0,7353

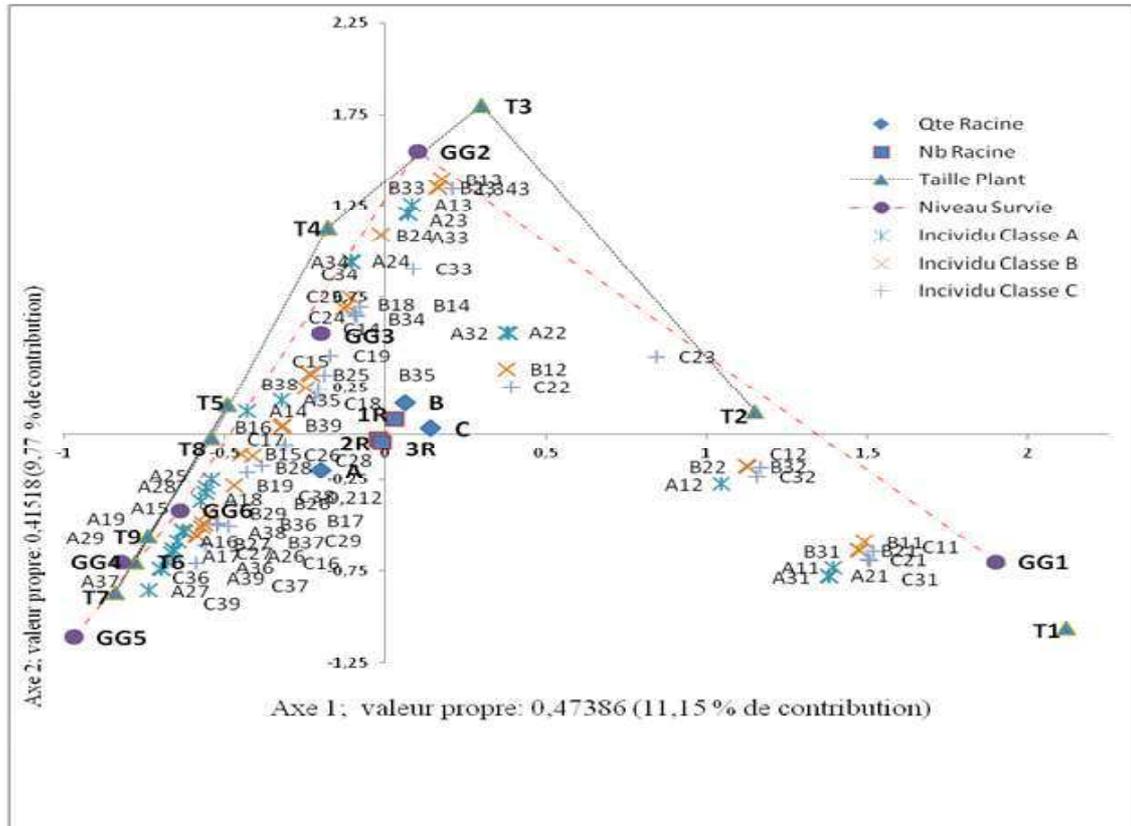


Figure 2 : Plan de projection des modalités des variables de niveaux des niveaux de survie des vitroplants au sevrage par l'analyse des correspondances multiples (ACM).

Projection pattern of ramets survival variable's levels at weaning stage by multiple correspondence analyses (MCA).

taille, quels que soient la qualité et le nombre de racines, sont liés à GG1. La qualité et le nombre de racines interviennent, mais moins sur la reprise en acclimatation. La bonne qualité des racines participe à une bonne reprise.

Le lien très étroit qui vient d'être montré entre la reprise en acclimatation et la taille des plantules à la fin de l'enracinement (sortie du tube) existe entre le poids et la reprise.

DISCUSSION

Le taux de reprise moyen de 90 % de plants sevrés dans nos conditions d'acclimatation confirment ceux d'autres équipes travaillant sur le sevrage des vitroplants de palmier à huile (Ginting et Fatmawati, 1995 ; Tan *et al.*, 1999). Cette confirmation démontre finalement que le palmier à huile est une espèce dont le sevrage des vitroplants ne constitue pas un handicap majeur, comparée à d'autres plantes issues de

micropropagation (Hayashi et Kozai, 1987 ; Montéuus et Bon, 1987 ; Preece et Sutter, 1991 ; De Riek et Van Huylenbroeck, 1994 ; Van Huylenbroeck, 1994 ; Van Huylenbroeck et Debergh, 1996b).

En effet, durant l'acclimatation, le plant doit s'adapter aux nouvelles conditions d'environnement comme la faible humidité relative du milieu naturel, la forte intensité de la lumière du jour, les fluctuations de la température (Preece et Sutter, 1991). La non maîtrise de ces facteurs environnementaux peut affecter la reprise à l'acclimatation (Brainerd et Fuchigami, 1981). La qualité intrinsèque du plant produit *in vitro* semble être véritablement le facteur le plus important qui influence la réussite au sevrage (Van Huylenbroeck, 1994 ; Van Huylenbroeck et Debergh, 1995).

Nos résultats ont mis en évidence l'influence positive de la qualité morphologique des plants racinés sur le succès au sevrage. La reprise dépend fortement du développement foliaire, notamment la taille des plants. La bonne qualité

des racines produites *in vitro* concourent aussi à la reprise à l'acclimatation. Le nombre de racines est sans effet notable, mais interagit avec les deux autres facteurs. Les plantules ayant un bon développement foliaire et racinaire (Groupe A) ont un taux de reprise de 97 %, celles moyennement bien développées (Groupe B), ont un taux de reprise de 91 %, les plantules du groupe C, elles, réussissent à 77 %.

L'implication des feuilles et des racines développées *in vitro* sur la réussite au sevrage a été aussi observée avec d'autres plantes telles que *Prunus cerasus* L (Marin et Gella, 1987), *Malus domestica* Borkh (Karhu et Ulvinen, 1995), *Malus pumila* (Diaz-Pérez *et al.*, 1995). Chez les végétaux, il est connu que les feuilles et les racines sont les sièges d'importantes fonctions dont la photosynthèse et la régulation stomatique et que les racines interviennent dans le transport de l'eau et l'absorption de nutriments. Grout et Aston (1978) ont attribué aux structures anatomiques de la feuille obtenue *in vitro*, une fonction de réserve nutritive qui permet à la plante de réduire ses stress lors de son transfert. Les pertes des plants sont souvent attribuées à des causes liées aux dysfonctionnements morphologiques, anatomiques et physiologiques provoqués par l'environnement *in vitro* (Dunstan et Turner, 1984 ; Preece et Sutter, 1991 ; Ziv, 1991 ; Desjardins, 1995).

Chez le palmier à huile, contrairement à certaines espèces ligneuses (Boulay, 1985 ; Monteuuis et Bon, 1986), les racines et les feuilles formées *in vitro* ne dégèrent pas pendant le déroulement du sevrage. Elles poursuivent leur croissance et leur développement. Nous n'avons pas réalisé d'étude histo-physiologique sur les plants, à leur sortie du laboratoire, pour évaluer l'état fonctionnel des feuilles et des racines. Toutefois, la mise en évidence d'une activité photosynthétique précoce observée *in vitro* sur les jeunes pousses en développement, au cours des premières semaines du débourrement (Rival *et al.*, 1997a), semble indiquer que les plants ont acquis un niveau d'autotrophie suffisante à leur sortie du tube d'enracinement. Les grandes feuilles supposées avoir de grandes surfaces foliaires, seraient le siège d'une intense activité photosynthétique. De plus, sur ces feuilles, la densité de stomates serait plus importante que sur les autres feuilles. Le saccharose utilisé à forte concentration dans le milieu de culture a contribué significativement à améliorer le métabolisme général des pousses feuillées et

ceci s'est traduit par l'obtention de plants plus vigoureux dont l'enracinement subséquent était toujours meilleur. Le bon niveau de survie des plants racinés de grande taille, serait la conséquence de l'effet des milieux enrichis en saccharose (45 g/l en caulogénèse et 60 g/l en enracinement), nécessaires au processus de régénération du palmier à huile. Des résultats similaires de l'impact positif des fortes concentrations du saccharose ont été aussi observés pendant le sevrage des vitroplants de rosier et de pommier (Capellades *et al.*, 1991 ; Karhu et Ulvinen, 1995) et ceci a été attribué à l'accumulation de l'amidon et de sucre comme une source de réserve nutritive ou énergétique (Van Huylbroeck et Debergh, 1996b). Chez d'autres espèces, la relation «forte concentration de sucre du milieu et reprise en acclimatation» n'a pas été formellement établie, mais la forte influence des doses élevées de saccharose améliore progressivement la performance photosynthétique des vitroplants au cours du sevrage (Desjardins, 1995 ; Karhu et Ulvinen, 1995 ; Van Huylbroeck *et al.*, 2000).

Concernant l'influence de la qualité des racines obtenues *in vitro* sur l'acclimatation, elle est associée à un bon niveau de survie chez le Douglas (Mohammed et Vidaver, 1990). Les racines constituent pour les vitroplants de microboutures du jasmin d'Asie (*Trachelospermum asiaticum*) et du pommier en cours de sevrage, une source importante de réserve en eau, démontrant ainsi que ces racines sont fonctionnelles pour le transport de l'eau de la plante (Apter *et al.*, 1993a ; Diaz-Pérez *et al.*, 1995). L'existence d'une interconnexion complète et vasculaire entre les racines et les feuilles a également été mise en évidence (Apter *et al.*, 1993b). Chez le pommier, la corrélation entre la teneur en eau de toute la plante avec le flux d'eau des feuilles et l'activité photosynthétique mise en évidence, suggèrent que les microboutures se comportent comme des unités hydrauliques intégrées (Diaz-Pérez *et al.*, 1995). Pourtant, les racines développées *in vitro*, comparées à celles obtenues naturellement sur les plantes, ont été considérées comme non fonctionnelles par de nombreux auteurs (Debergh et Maene, 1981 ; Ziv, 1986) ou pauvres en connections avec la tige (Grout et Aston, 1977). Chez le palmier à huile, une interconnexion entre le plateau racinaire et le bulbe du vitroplant a été mise en évidence par Verdeil et Rival (résultat non publié). Les pertes d'eau par les feuilles durant le sevrage seraient immédiatement compensées par l'eau

de réserve des racines. La régulation de l'eau serait mieux assurée dans les plantes de grande taille (groupe A) dont les feuilles plus fonctionnelles présentent sans doute une anatomie plus complète que celles des plants de petite taille. Nous avons montré que les plantules du groupe C qui ont une bonne reprise, sont celles qui présentent un bon développement foliaire (taille supérieure à 14 cm). La réduction de la phase d'enracinement pourrait donc s'envisager si les pousses feuillées sont très bien développées avant la rhizogenèse qui est fort coûteux en durée et en rendement de caulogenèse. Dans le cas général et dans les conditions de sevrage définies, il n'est pas souhaitable de réaliser un sevrage précoce de plantules insuffisamment développées. Quoi qu'il en soit, les plantules du groupe C supportent moins bien le sevrage, même si celui-ci est réalisé dans les meilleures conditions. On peut penser que ces plantules qui présentent un développement plus faible, souffrent d'un manque de réserves hydriques ou biochimiques (sucres et protéines) ou d'une déficience physiologique (mauvais fonctionnement des stomates) qui ne permettent pas de supporter les stress au sevrage.

CONCLUSION

L'incidence de la qualité du système racinaire du plant sur la reprise au sevrage a été mise en évidence, avec un taux élevé de survie pour les plants bien enracinés de type « A » (97 %). Alors que la qualité de développement des racines était considérée comme déterminant pour la réussite au sevrage, les résultats présentés ont mis plutôt en évidence un effet « taille du plant enraciné » sur la reprise. Le développement foliaire est donc le principal facteur de la reprise du plant au sevrage des vitroplants de palmier à huile, quoique ce facteur ait une forte interaction avec la qualité du système racinaire. Ces indications montrent, finalement, qu'on aurait à sevrer, à qualité de racines équivalente, des plants les plus développés possibles et à développement foliaire égal, les plants les mieux enracinés possibles.

REFERENCES

- Ahée J., Arthuis P., Cas G., Duval Y., Guenin G., Hanower J., Hanower P., Lievoux D., Lioret C., Malaurie B., Pannetier C., Raillot D., Varéchon C., Zuckermann L., 1981. La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogenèse somatique. *Oléagineux* 36 (3) : 113 - 118.
- Apter R. C., Williams M. C., Davies E. L., Jr F.T., 1993a. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian jasmine (*Trachelospermum asiaticum*). I. Comparative morphology. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118 : 902 - 905.
- Apter R. C., Williams M. C., Davies E. L., Jr 1993b. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in Asian jasmine (*Trachelospermum asiaticum*). II. Physiological comparisons. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118 : 906 - 909.
- Be L. V., Tan T. V., Uyen N. T. T., Dung L. V. (2008). Low-cost micropropagation of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). *AU J.T.*, 12 (1) : 18 - 24.
- Be L. V., Debergh P. C., (2006). Potential low-cost micropropagation of pineapple (*Ananas comosus*). doi : 10.1016/j.sajb. 2005. 07. 002.
- Boulay M. 1985. Aspects pratiques de la multiplication *in vitro* des essences forestières. *Annales AFOCEL* : 7- 43.
- Brainerd L. E., Fuchigami L. H. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low humidity. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106 (4) : 515 - 518.
- Capellades M., Lemeur L., Debergh P. 1991. Effects of sucrose on starch accumulation and rate of photosynthesis in *Rosa* cultured *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 25 : 21 - 26.
- Dagnelie P. 1975. Théories et méthodes statistiques, Applications agronomiques. In : presses agronomiques de Gembloux, Belgique Editeur, 2 : 99 -105.
- De Riek J. et Van Huylenbroeck J. 1994. Acclimatization of micropropagation roses

- in multi-layer-cells : effect of different stage III-conditions and CO₂ enrichment. In Physiology, Growth and Development of Plants in Culture Lumsden P. J., Nicholas J. R., Davies W. J., eds. Kluwer Academic Publishers, Netherlands : 309 - 313.
- Debergh P. C., Maene L., 1981. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort.*, 14 : 335 - 345.
- Desjardins Y. 1995. Factors affecting CO₂ fixation in string to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. *Plant Tiss. Cult. Biotechnol.*, 1 (1) : 13 - 25.
- Diaz-Pérez J. C., Shackel K. A., Sutter E., 1995. Effects of *in vitro*-formed Roots and Acclimatization on Water status and Gas Exchange of Tissue-cultured Apple Shoots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120 (3) : 435 - 440.
- Dustan D. I. et K. E. Turner 1984. The acclimatization of micropropagated plants. In : *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 1 (15) : 123 -129. Academic Press, Inc, ISBN 0 -12 - 715001 - 3.
- Ginting G., Fatmawati. 1995. Vegetative propagation of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from laboratory to field. FELDA's experience. In : *Proceedings of the 1993 ISOPB International Symposium on Recent Development in Oil palm Tissue Culture and Biotechnology*. Eds : V. Rao, I. E. Henson and N. Rajanaidu. Kuala Lumpur : 33 - 37.
- Grout B. W. W., Aston M. J. 1977. Transplanting cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. *Hort. Res.*, 17 : 1 - 7.
- Grout B. W. W., Aston M. J., 1978. Transplanting cauliflower plants regenerated from meristem culture. II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic ability. *Hort. Res.*, 17 : 65 - 71.
- Hayashi M., Kozai T., 1987. Development of a facility for accelerating the acclimatization of tissue-cultured plantlets and the performance of test cultivations. In : *Ducaté et al.* (eds.) : 123 -134.
- Karhu S. T., Ulvinen S. K., 1995. The effect of different carbohydrates on the rooting of micropropagated apple shoots and their adaptation after transplantation. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 30 : 87 - 101.
- Kodym A., Zapata-Arias F. J. (2001). Low-cost alternatives for the micropropagation of banana. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 66 : 67 - 71.
- Konan K. E., Durand-Gasselien T., Duval Y., Pannetier C. 1989. Weaning oil palm ramets obtained by *in vitro* micropropagation (*Elaeis Guineensis* Jacq.). Communication In « Proc. 50 th Annivesary of Nifor « 22-25 Nov 1989, Benin City (Nigeria).
- Konan K. E. (2011). Contribution à la micropropagation industrielle du palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) par la méthode de l'embryogenèse somatique secondaire sur cals compacts nodulaires. Thèse Unique, Université d'Abobo-Adjamé, Côte d'Ivoire. 2011, 318 p.
- Kozai T. 1991. Photoautotropic micropropagation. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 27 : 47 - 51.
- Marin J., Gella R. 1987. Factors affecting acclimatization of micropropagated *Prunus cerasus* L. In : *Actes du Symposium Florizel 87*, 10 -14 August, Arlon, Belgique, pp 11.
- Mazinga Kwey M., Useni Sikuzani Y. , Nyembo Kimuni L., Kasongo Lenge M. E., Tshitungu Bilitu E., Kapenda Dumba E., Mario Godoy J., Louvieux J., Baboy Longanza L., Van Koninckxloo M. (2014). Étude de l'acclimatation en serre de vitroplants de bananiers de la FHIA : «cas de FHIA-01 AAAB et FHIA-23 AAAA». *Journal of Applied Biosciences* 73 : 5911 - 5924.
- Mohammed G. H., Vidaver W. E. 1990. The influence of acclimatization treatment and plantlets morphology on early greenhouse-performance of tissue-cultured Douglas-fir. *Plant Cell Organ Cult.*, 21 : 111 -117.
- Monteuuis O. et Bon M. C. 1986. Micropropagation du Séquoia géant. *Ann. Afocel* 1985 : 49 - 87.
- Monteuuis O., Bon M. C., 1987. Enracinement et acclimatation de *vitro-plants* forestiers. In : *Symposium Plant Micropropagation in Horticultural Industries, preparation, hardening and acclimatization processes*. Arlon Belgiun : Belgian Plant Tissue Culture Group Florizel, 87 : pp 160 - 169.
- Preece J. E., Sutter E. G. 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and the fields. In : *Micropropagation*. P.C. Debergh, and R. H. Zimmermann, eds. Kluwer academic publishers, Netherlands. pp 71 - 93.
- Rival A., Beulé T., Lavergne D., Nato A., Harvaux M., Puard M. 1997a. Development of photosynthetic characteristics in oil palm during *in vitro* micropropagation. *Plant Physiol.*, 150 : 11 - 26.

- SAS Institut Inc. 1999. SAS User's Guide : Statistic. SAS Institut, Cary NC. USA.
- Tan C. C., Wong G., Soh A. C. 1999. Acclimatization and handling of oil palm tissue cultured plantlets for large scale commercial production. Applied Agriculture Research Sdn. Bhd., Locked Bag N°. 212, 47000 Sg. Buloh, Selangor. 8 p.
- Van Huylbroeck J. M. Piqueras A. et Debergh P. C. 2000. The evolution of photosynthetic capacity and the antioxidant enzymatic system during acclimatization of micropropagated Calathea plants. Plant Sci., 155 : 59 - 66.
- Van Huylbroeck J. M., De Riek J. 1995. Sugar and starch metabolism during *ex vitro* rooting and acclimatization of micropropagation Spathiphyllum «Petite» plantlets. Plant Sci., 111 : 19 - 25.
- Van Huylbroeck J. M., Debergh P. C. 1996b. Impact of sugar concentration *in vitro* on photosynthesis and carbon metabolism during *ex vitro* acclimatization of Spathiphyllum plantlets. Physiol. Plant., 96 : 298 - 304.
- Van Huylbroeck J. M. 1994. Influence of light stress during the acclimatization of *in vitro* plantlets. In : Plant production on the threshold of a new century. P. C. Struit, Vredenberg W. J., Renkema J. A., Parlevliet J. E., eds Kluwer Academic Publishers, Netherlands : 451 - 453.
- Wuidard W., Konan K. 1989. Le sevrage des vitroplants de palmier à huile. Oléagineux, 44 (12) : 573 - 582
- Van Huylbroeck J. M. 1994. Influence of light stress during the acclimatization of *in vitro* plantlets. In : Plant production on the threshold of a new century. P. C. Struit, W. J. Vredenberg. J. A., Renkema J. E. Parlevliet, eds Kluwer Academic Publishers, Netherlands : 451 - 453.
- Youmbi E., Fonkam Nanga J. P., Ngaha D., Nkeng Ndoumbé M., Kwa M. (2005). Comportement de vitroplants de bananiers plantains issus de bourgeons axillaires et apicaux au cours de l'acclimatation et en champ. Fruits, 2005, vol. 60 (2), p. 91 - 100. DOI : 10.1051/fruits : 2005019.
- Ziv M. 1986. *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants, p. 187-196. In : L. A. Withers and P. G. Anderson (eds). Plant Tissue Culture and Agriculture Applications. Butterwoths, London.
- Ziv M. 1991. Vitrification : morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In : Micropropagation. Debergh P.C., Zimmermann R. H, eds. Kluwer academic publishers.