

Multiplication végétative *in vitro* du chanvre (*Cannabis sativa* L.). Application à la conservation des clones sélectionnés

Christine RICHEZ-DUMANOIS (*) (**), Françoise BRAUT-BOUCHER (*) (**), Louis COSSON (*) (***) & Michel PARIS (**)

(*) C.N.R.S., Institut de Physiologie végétale, Phytotron, F 91190 Gif-sur-Yvette.

(**) Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Pharmacognosie, F 92290 Châtenay-Malabry.

(***) Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Botanique et Phytochimie, F 92290 Châtenay-Malabry.

RÉSUMÉ

Le chanvre à fibres (ou chanvre textile) est l'objet de nombreux travaux de sélection tant au niveau de la qualité de la fibre que sur le contenu en cannabinoïdes des plantes. Notre étude est réalisée afin de pouvoir conserver les plantes durant une période suffisamment longue nécessaire à l'analyse d'un échantillon correspondant. Dans ce but nous avons entrepris, en conditions phytotroniques, l'étude du bouturage horticole, couplé ou non à la micropropagation *in vitro*.

Le bouturage horticole a été réalisé sur plusieurs variétés dans différentes conditions thermiques et photopériodiques. L'alternance 22 °C le jour et 17 °C la nuit sous 24 h d'éclairage continu favorise le développement des boutures sur le plan morphologique et chimique. Elle permet de contrôler la croissance qui est d'autant plus lente que la température diminue. En vue de la mise en culture *in vitro*, on prélève l'apex et les nœuds sous-jacents des rameaux principaux et axillaires des plantes-mères. La prolifération des méristèmes a été obtenue en 3 semaines sur le milieu de MURASHIGE & SKOOG additionné d'une cytokinine (BAP $5 \cdot 10^{-7}$ M) et d'une auxine (AIB 10^{-7} M). Les pousses axillaires ainsi développées ont servi à l'initiation de pieds-mères *in vitro*, producteurs de boutures, par repiquages successifs sur le milieu établi ci-dessus. Une phase d'allongement réalisée en présence de charbon actif (2 g/l) et de AIB (10^{-5} M) est nécessaire pour permettre l'enracinement des microboutures. Celui-ci est obtenu plus facilement par repiquage direct sur vermiculite, après 3 à 4 semaines, que dans les différentes conditions de culture *in vitro* réalisées. Les jeunes plantes se développent ensuite à 22 °C/17 °C de façon identique aux plantes issues du bouturage horticole. Leurs teneurs en cannabinoïdes sont conformes à celles des plantes-mères. Le rendement de la méthode (180 boutures enracinables/plantes-mères) peut encore être amélioré.

Mots clés additionnels : Croissance, apex, cal, rhizogenèse, conditions phytotroniques, cannabidiol, Δ^9 -tétrahydrocannabinol, CPG.

SUMMARY

In vitro propagation of hemp: application to selected clones of Cannabis sativa L. for preservation of plants.

Much work has been done on the breeding of hemp for agronomic and chemical criteria. In order to keep plants available for the long period required for chemical analysis, we have propagated clones as horticultural cuttings, under controlled conditions, with or without micro-propagation.

Different temperature and photoperiod conditions were used to obtain cuttings of several clones. Under these conditions, growth could be controlled: morphological and chemical development decreased at low temperature and were promoted by a regime of 22 °C (daily temperature) and 17 °C (night temperature) under 24 h illumination and 70 % relative humidity. In the *in vitro* experiment, shoot proliferation was obtained three weeks later on the MURASHIGE and SKOOG medium with added cytokinin (BAP $5 \cdot 10^{-7}$ M/l) and auxin (AIB 10^{-7} M/l). The axillary shoots which developed were used as mother-plants *in vitro*; they provided numerous cuttings after repeated sub-culturing on the same medium. A long thinning stage was necessary for rooting the microcuttings in the presence of charcoal (2 g/l) and AIB (10^{-5} M). The best method for rooting *in vivo* shoots involved non aseptic conditions (3 to 4 weeks). The further growth of plants at 22 °C/17 °C was comparable to that of corresponding horticultural cuttings and the cannabinoid pattern was similar to that of mother-plants.

Additional key words : Growth, apex, callus, rhizogenesis, phytotronic conditions, cannabidiol, Δ^9 tetrahydrocannabinol, G.L.C.

I. INTRODUCTION

Le chanvre (*Cannabis sativa* L.) est une apétale de l'ordre des Urticales, famille des Cannabinacées. Cette plante allogame est cultivée depuis fort longtemps en France. Au cours des 30 dernières années elle a fait l'objet, en Europe, de nombreux travaux de sélection (BREDEMANN *et al.*, 1961 ; ARNOUX *et al.*, 1969). Ceux-ci ont permis une amélioration génétique importante des variétés à teneurs élevées en fibre. On utilise actuellement la fibre cellulosique dans l'industrie papetière pour la fabrication de papiers fins et résistants. Le chanvre commun est dioïque. Les variétés employées sont le fruit d'une sélection rigoureuse et permanente de plantes monoïques à port femelle et à teneurs constamment contrôlées en cannabinoïdes. Les cannabinoïdes de la classe des terpénoïdes sont les constituants spécifiques du chanvre. On s'intéressera au cannabinoïde (CBD), composé majeur du chanvre à fibres et au Δ^9 -tétrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) responsable de l'activité psychotrope du chanvre. Le Δ^9 -THC est présent en forte proportion dans le chanvre de type drogue. De nombreuses analyses (FOURNIER, 1981) ont permis de distinguer, dans une population, 3 chimiotypes qui se différencient par leurs teneurs en CBD et Δ^9 -THC. Le Δ^9 -THC est présent, généralement, à des taux faibles chez le chanvre à fibres. Une sélection stricte s'avère cependant indispensable par le contrôle des teneurs en CBD et Δ^9 -THC afin d'obtenir des variétés plus homogènes quant à leur teneur en Δ^9 -THC, celle-ci devant être la plus faible possible.

Ce travail de sélection nécessite l'analyse chimique de plusieurs milliers d'échantillons cultivés en champ et prélevés à un stade de développement défini (FOURNIER *et al.*, 1983). Dans l'attente des résultats de l'analyse, il faut en vue de leur sélection ultérieure sur le caractère analysé, conserver et entretenir les boutures en serre avec les problèmes que cela comporte. En conséquence, ce travail a été entrepris dans le but de déterminer les conditions de conservation optimale par contrôle de la croissance et de la multiplication végétative *in vitro* du chanvre. On s'attachera, dans un premier temps, à l'étude des conditions de culture des plantes-mères en serre. Celle-ci est un élément primordial du choix de la méthode et de la nature des explants à mettre en culture pour toutes les manipulations *in vitro*. Cette mise au point doit permettre de disposer d'un délai suffisant pour préparer et réaliser l'analyse chimique quantitative en chromatographie en phase gazeuse (CPG). A notre connaissance, peu de travaux relatifs à la multiplication végétative *in vitro* du *Cannabis* ont été réalisés (YSUFOV & KHA-CHUMOVA, 1975 ; FISSE *et al.*, 1981 ; PRENEUX *et al.*, 1985).

Les étapes suivantes ont été effectuées : bouturage horticole à partir de plantes-mères de plusieurs clones et contrôle de la croissance et du développement en fonction des régimes thermiques et photopériodiques, micropropagation *in vitro* (prolifération, allongement et rhizogenèse) avec maintien du patrimoine génétique des plantes, acclimatation en serre, étude analytique systématique.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

La connaissance des plantes-mères et du bouturage horticole est nécessaire à l'étude *in vitro* du chanvre. Les clones étudiés proviennent des variétés notées F 56, issues de semis en serre puis bouturées en serre, et F 77, issues de semis en champ puis bouturées en serre. On se limitera, pour la suite des travaux, à un clone par variété, les résultats étant homogènes pour une même variété. Le schéma expérimental a été établi par analogie avec les travaux antérieurs de PARIS *et al.* (1975) et de BRAUT-BOUCHER (1978) sur le chanvre de type drogue.

A. Culture en phytotron

Les graines sont semées et les plantes cultivées sur vermiculite et alimentées avec la solution nutritive du Phytotron (CHOUARD *et al.*, 1964). Les températures choisies sont : 27 °C en 16 h d'éclairage naturel pour les semis et les bouturages avec 70 p. 100 d'humidité relative, 22 °C, 17 °C et 22 °C jour/17 °C nuit pour le développement des boutures, en conditions dyspériodiques (24 h d'éclairage à 360 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) afin de retarder la floraison des plantes, le chanvre étant une plante de jours courts préférante. Un lot de 90 plantes au total a ainsi été étudié.

B. Culture *in vitro*

Les rameaux terminaux et axillaires sont prélevés sur les plantes-mères âgées de 6 semaines et mesurant environ 1,5 m avec 28 nœuds. Ils sont désinfectés dans une solution filtrée d'hypochlorite de calcium à 40 g/l en présence d'un agent mouillant pendant 15 mn. Le traitement est suivi de 3 rinçages à l'eau distillée stérile avant la mise en culture *in vitro* des explants (apex et nœuds isolés jusqu'au 5^e nœud sous-jacent). Les cultures sont réalisées en présence des macro-éléments et oligo-éléments de MURASHIGE & SKOOG (1962) additionnés des vitamines de SKOOG, de Fer-EDTA, de glucose (30 g/l) ou de saccharose (10 g/l) et de Bacto agar Difco (7 g/l). Le charbon actif (MERCK art. 2 186) est ajouté (2 g/l) dans certains milieux (DUMANOIS *et al.*, 1984). Le pH est ajusté à $5,3 \pm 0,2$. Les substances de croissance sont dissoutes dans l'eau distillée en présence d'une goutte d'HCl-N pour les cytokinines et d'éthanol pour les auxines et ajoutées au milieu de culture ; leur choix a été guidé par les travaux antérieurs de FISSE *et al.* (1981). Les milieux de culture sont répartis à raison de 14 ml par tube ou 100 ml par fiole d'erenmeyer et stérilisés à 120 °C pendant 20 mn. Les cultures sont placées à 27 ± 2 °C en 16 h d'éclairage artificiel ($360 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Les observations sont réalisées après 3 semaines de culture. Les méristèmes développés *in vitro* sont isolés par repiquages successifs toutes les 3 semaines. Après enracinement soit *in vitro* soit directement en terrines, les microboutures ainsi obtenues sont acclimatées en serre à 27 °C en vermiculite pendant 3 à 4 semaines puis transférées à 22 °C/17 °C ou

22 °C dans les conditions retenues pour les plantes-mères afin de contrôler leur développement morphologique et leur conformité. Il sera suivi d'un contrôle analytique systématique en chromatographie en phase gazeuse selon la méthode adaptée par FOURNIER *et al.* (1983) faisant appel à la technique de l'étalon interne (PARIS, 1971).

III. RÉSULTATS

A. Bouturage horticole

A 27 °C, l'obtention de plantes-mères est aisée avec 50 p. 100 de germination et 100 p. 100 de reprises des boutures en 15 j. Le temps d'enracinement double aux températures plus fraîches (22 °C, 17 °C). La croissance des plantes est homogène au sein d'un même clone.

Les figures 1 et 2 montrent une croissance rapide à 22 °C, 2 fois plus lente à 17 °C et intermédiaire à 22°/17 °C (environ 1,5 m en 10 semaines) pour les variétés F 77 et F 56. L'« effet température » est enregistré préférentiellement au niveau de l'allongement des entre-nœuds des plantes, pour un stade de développement homogène dans chaque condition. Le nombre de nœuds est sensiblement équivalent. L'aspect morphologique des plantes obtenues est comparable à celui des

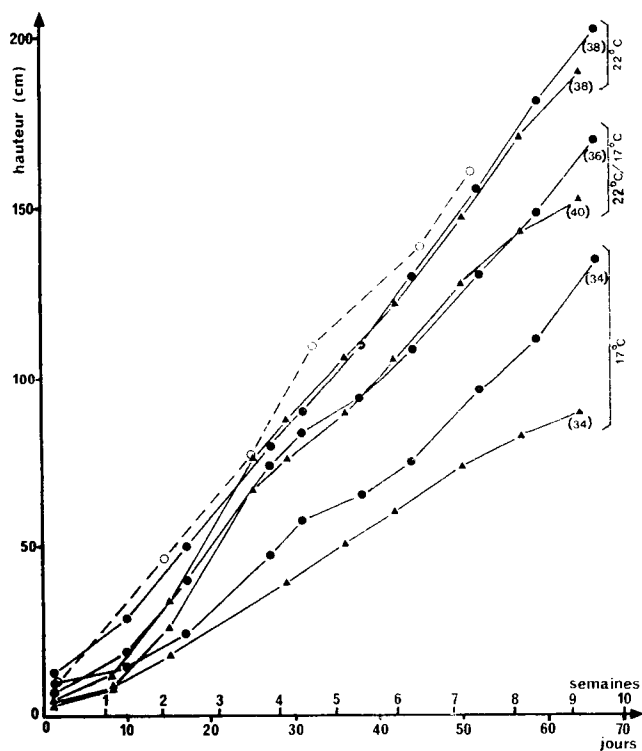


Figure 1

Croissance des boutures de chanvre issues de plantes cultivées en champ (F 77) et de plantes cultivées au phytotron (F 56).

● : F 56 ; ▲ : F 77 ; ○ : boutures maintenues à 27 °C ; () : nombre moyen de nœuds.

Growth of hemp cuttings originating from plants cultivated either in the field (F 77) or in a phytotron (F 56).



Figure 2

Croissance et développement des plantes issues du bouturage horticole en fonction de la température après 70 j de culture et d'éclairage continu.

Appearance of horticultural cuttings placed in different cultural conditions (70 days of cultivation, 24 h illumination).

plantes maintenues à 27 °C et des plantes en champ. A noter cependant un léger étiolement des boutures de plantes obtenues en serre (F 56) par rapport aux boutures issues de plantes en champ (F 77). Les feuilles possèdent 3 à 9 folioles avec une moyenne de 5, leur surface diminue aux températures plus fraîches. Les boutures ont une phyllotaxie alterne dès les premiers bourgeons, contrairement aux jeunes plantes issues de semis dont les feuilles deviennent alternes à partir du 7^e nœud (BRAUT-BOUCHER, 1978). Les rameaux axillaires sont longs et plus développés dans les 2/3 supérieurs de la plante. La floraison apparaît en fin d'expérience dans les conditions dyspériodiques choisies.

Cette étude des plantes obtenues par bouturage horticole a été complétée par l'analyse chimique en CPG de leurs teneurs en CBD et Δ^9 -THC. Le caractère fibre (teneur élevée en CBD, faible en Δ^9 -THC) a été conservé dans tous les cas. Ces teneurs sont plus faibles que les teneurs des plantes-mères F 56 et F 77. Elles sont équivalentes pour ces 2 variétés.

L'alternance de température favorise le développement morphologique du *Cannabis* de type fibres et l'accumulation des composés chimiques. Les valeurs obtenues à 22 °C et 17 °C constants ne sont pas significativement différentes (tabl. 1).

TABLEAU 1

Analyse chimique des plantes-mères de chanvre (F 77) et des plantes (F 77) issues du bouturage horticole.
 Chemical analysis of mother plants of hemp (F 77) and plants (F 77) descended from horticultural cuttings.
 $n_1, n_2 =$ effectifs étudiés.

	Température	CBD (g p. 100 g)	Δ^9 -THC (g p. 100 g)
Plantes-mères $n_1 = 10$	27 °C	1,90 \pm 0,03	0,085 \pm 0,018
Boutures horticoles $n_2 = 20$	22 °C	0,63 \pm 0,07	0,020 \pm 0,004
n_2	22 °C/17 °C	0,91 \pm 0,09	0,034 \pm 0,004
n_2	17 °C	0,73 \pm 0,10	0,024 \pm 0,005

B. Multiplication végétative *in vitro*

Ces techniques permettent de créer un environnement artificiel stimulateur dans lequel les organes, tissus ou cellules survivent et expriment, dans un nouveau système de corrélations, certaines potentialités morphogènes inhibées au niveau de la plante entière (BIGOT, 1980).

1. Culture de l'explant primaire

Le nombre d'explants primaires susceptibles d'être prélevés sur une plante-mère dépend du stade de développement de celle-ci. La hauteur de la plante doit être supérieure à 1 m environ afin de permettre le prélèvement d'un nombre suffisant de fragments homogènes (tabl. 2).

L'isolement de l'apex et des nœuds stimule l'entrée en croissance des méristèmes axillaires préexistants à l'aisselle des feuilles du rameau. Ceux-ci apparaissent après 1 à 2 semaines de culture (fig. 3).

Un rapport auxine/cytokinine < 1 semble généralement favorable au bourgeonnement (BIGOT, 1980). Parmi les cytokinines et les auxines employées, la benzylaminopurine (BAP) à $5 \cdot 10^{-7}$ M et l'acide indolbutyrique (AIB) à 10^{-7} M se sont montrés les plus efficaces sur l'entrée en croissance des pousses

axillaires. Il ne se développe qu'un seul méristème par nœud et 2 en moyenne par apex (tabl. 3). La présence d'acide naphthalène acétique (ANA) à la place de l'AIB entraîne le développement d'un cal basal important non organogène empêchant la croissance et le développement du méristème. D'autre part, le *Cannabis* apparaît très sensible aux teneurs en hormones lorsqu'elles sont supérieures aux valeurs citées. Elles favorisent l'apparition d'anomalies de développement (plantes en « rosette », aspect vitreux des parties aériennes, PRENEUX *et al.*, 1985) ou l'inhibition de croissance.

2. Prolifération

Les jeunes pousses ainsi développées sont prélevées et repiquées sur milieu neuf identique au milieu de l'explant primaire soit BAP ($5 \cdot 10^{-7}$ M) et AIB (10^{-7} M), après 3 semaines de culture. Le nœud initial est éliminé, son activité organogène disparaît. Ces pousses sont soumises à une forte dominance apicale. La suppression de l'apex va permettre l'entrée en croissance et le développement de méristèmes axillaires. On obtient ainsi des pieds-mères *in vitro* qui fourniront des microboutures enracinables par repiquages successifs. Les pieds-mères trop petits vont dégénérer. Actuellement, une plante-mère en serre peut fournir

TABLEAU 2

Estimation du nombre d'explants primaires susceptibles d'être prélevés en fonction de la croissance des plantes-mères.
 (5 plantes-mères par clone).

$t_1 = 25$ j après la reprise des boutures, $t_2 = 46$ j.

Evaluation of primary explants provided by mother plants and related to their development. $t_0 =$ rooting of cutting.
 (5 mother-plants in each clone).

$t_1 = 25$ days later, $t_2 = 46$ days later.

F 77	Hauteur (cm)		Nombre de nœuds		Nombre d'explants primaires	
	t_1	t_2	t_1	t_2	t_1	t_2
Clone 1	97,8 \pm 4,8	156 \pm 14,9	31 \pm 3	40 \pm 3	17 \pm 8	49 \pm 13
Clone 2	88,6 \pm 7,1	144 \pm 12,6	28 \pm 3	36 \pm 3	28 \pm 12	77 \pm 23
Clone 3	83 \pm 5,7	145 \pm 7,1	30 \pm 1	38 \pm 4	24 \pm 3	67 \pm 18
Clone 4	74,6 \pm 4,3	132,6 \pm 4,3	31 \pm 3	40 \pm 4	44 \pm 9	77 \pm 19



Figure 3
Développement de l'explant primaire et entrée en croissance des méristèmes axillaires à l'aisselle des feuilles.
Development of the primary explant and initiation of axillary meristem growth.

environ 70 explants primaires ou encore 180 boutures enracinables en 3 mois (tabl. 2 et 3).

3. Allongement des microboutures

L'allongement des microboutures est nécessaire pour assurer l'enracinement et l'acclimatation ultérieurs. Il est réalisé en présence de charbon actif (CA) à 2 g/l et d'AIB à 10^{-5} M. Cette auxine est déjà présente dans les milieux précédents ce qui permet une

adaptation plus facile. L'addition de gibbérelline provoque une stimulation rapide puis un arrêt total de la croissance qui s'accompagne de diverses anomalies du développement. Cependant VINE & JONES (1969) avaient ainsi obtenu l'allongement de fragments de tige de houblon.

4. Rhizogenèse

Pour de nombreux végétaux une balance hormonale auxine/cytokinine > 1 favorise la rhizogenèse adventive. Le *Cannabis* présente des difficultés à s'enraciner *in vitro* (c'est un matériel « récalcitrant » *in vitro*).

Les principaux essais entrepris sont rassemblés dans le tableau 4. Il apparaît : un enracinement possible avec la kinétine (10^{-7} M) et l'AIB (10^{-5} M) avec un faible allongement, un allongement possible avec CA (2 g/l) et AIB (10^{-5} M) suivi d'un faible enracinement (fig. 4). Dans la plupart des cas, l'enracinement est possible mais aléatoire. Parfois les racines induites se développent à l'extérieur du milieu (géotropisme inversé).

L'enracinement *in vitro* étant difficile, on a donc tenté de provoquer un enracinement direct des boutures obtenues *in vitro*. Plusieurs essais ont été réalisés sur vermiculite à 27 °C et 70 p. 100 d'humidité relative. Cette condition est plus favorable à l'enracinement : 40 boutures enracinées/88 entre 15 et 30 j soit 45 p. 100. Les pertes sont dues essentiellement au problème de dessiccation du matériel végétal ainsi qu'à la taille trop faible de la bouture au moment du transfert. La taille minimale d'une bouture nécessaire à sa reprise est en moyenne de 4 nœuds et 4 cm. L'enracinement direct devrait permettre de supprimer une étape délicate du microbouturage *in vitro* et de réduire les manipulations.

C. Acclimatation et développement en serre

Les boutures enracinées (*in vitro* ou directement) à 27 °C sont rempotées sur vermiculite et transférées à 22 °C ou 22°/17 °C. Maintenues à 27 °C, elles ont tendance à s'étioler. Les observations concernant la croissance et le développement sont effectuées comme précédemment (tabl. 5, fig. 5). L'allongement des plantes issues du microbouturage est plus faible que celui des plantes issues du bouturage horticole. L'appareil foliaire est parfois dense et les rameaux axillaires

TABLEAU 3

Nombre de pousses développées de Cannabis obtenues à partir des explants primaires.
Number of shoots of Cannabis provided by primary explants.

F 77	Développement des pousses/explants primaires		Observations
	Explants primaires	Apex + 1 ^{er} nœud sous-jacent	
Clone 2	45/22 204,5 %	33/41 80,5 %	Développement hétérogène des méristèmes + cal basal
Clone 4	41/22 186 %	41/46 89 %	Développement homogène des méristèmes

TABLEAU 4

Enracinement in vitro des boutures en fonction de l'équilibre hormonal et des conditions d'environnement (plantes-mères F 77, clones 2 et 4).

In vitro rooting of cuttings related to hormonal balance and environmental conditions, (mother-plants F 77, clones 2 et 4).

Equilibre hormonal à 27 °C (Moles)	Enracinement quantité	Enracinement %	Observations
Milieu de base (Mo) sans hormone (PRENEUX <i>et al.</i> , 1985)	2/36 1/54 0	5,5	état stationnaire, temps de passage 2 semaines maximum
Mo + obscurité partielle		—	état stationnaire, feuilles pâles
Mo + passage préalable à 32 °C pendant 1 semaine (VINE & JONES, 1969)		1/37	2,7
Mo + Kinétine 10^{-7} + AIB 10^{-5} :	13/60 40/115 21/40	22	nécrose, inhibition de croissance
+ Saccharose 20 g/l (PRENEUX <i>et al.</i> , 1985)		34,8	dessèchement des feuilles, mauvais développement
+ Glucose 30 g/l		47,7	nécrose, développement hétérogène
Mo + ANA $5 \cdot 10^{-6}$	5/48	10,4	peu d'allongement, développement de cal
Mo + AIB $5 \cdot 10^{-6}$	9/48	18,7	peu d'allongement, développement de cal
Mo + ANA 10^{-6} + BAP $5 \cdot 10^{-7}$	0	—	cal important, pas de développement
Mo + AIB 10^{-6} + BAP $5 \cdot 10^{-7}$	0	—	cal important, pas de développement
Mo + AIB 10^{-5} + Ca 2 g/l (Ca = charbon actif)	7/52	13,5	racines rares et fines, mais bon allongement, plantes apparemment saines, feuilles très chlorophylliennes



Figure 4

Rhizogenèse adventive in vitro des microboutures après transfert sur charbon actif et AIB.

Adventitious rhizogenesis in vitro of microcuttings sub-cultured on charcoal and AIB medium.

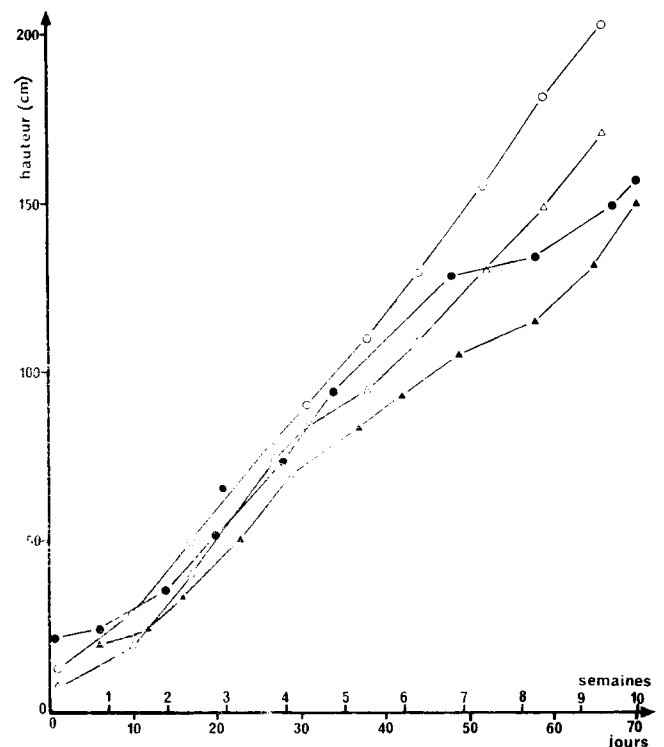


Figure 5

Croissance des boutures de chanvre issues de la micropropagation in vitro puis cultivées à 22 °C (●) ou 22 °C/17 °C (▲) ; ○ : boutures horticoles cultivées à 22 °C ; △ : boutures horticoles cultivées à 22 °C/17 °C.

Growth and development of microcuttings of hemp transferred in phytotronic and non axenic conditions. (a) 22 °C - (b) 22 °C/17 °C.

TABLEAU 5

Croissance des plantes issues du microbouturage in vitro et contrôle chimique. Comparaison avec le bouturage horticole.
Growth and chemical characteristics of plants : comparative data concerning horticultural and in vitro vegetative propagation.

		Température	Temps de culture (jour)	Hauteur des plantes (cm)	Nombre de nœuds	Longueur des entre-nœuds (cm)	CBD (g p. 100 g)	Δ^9 -THC (g p. 100 g)
Bouturage horticole,	n = 20 n = 10	22 °C	69 73	203 ± 12 254 ± 25	41 ± 2 41 ± 2	5,16 ± 0,39 6,22 ± 0,59	0,65 ± 0,09 0,58 ± 0,12	0,020 ± 0,005 0,019 ± 0,007
Microbouturage	n = 12	22 °C	81	185 ± 19	35 ± 4	5,07 ± 0,92	0,40 ± 0,07	0,013 ± 0,003
Bouturage horticole	n = 30	22 °C/17 °C	73	174 ± 5	40 ± 2	4,35 ± 0,2	0,91 ± 0,09	0,034 ± 0,004
Microbouturage	n = 20	22 °C/17 °C	77	169 ± 10	35 ± 4	5,02 ± 1,01		

rapidement développés. Les différences dues aux conditions climatiques sont celles observées pour le bouturage horticole. Il apparaît une certaine hétérogénéité de l'allongement due principalement aux tailles variables des boutures au moment du transfert direct (fig. 6). Celle-ci tend à s'atténuer en fin de croissance et à la suite de repiquages *in vitro* plus nombreux. La phyllotaxie alterne est conservée, les feuilles ont 5 folioles allongés en moyenne. La floraison apparaît également en fin d'expérience.



Figure 6
Croissance et développement des boutures de chanvre issues de la multiplication in vitro.
Appearance of plants descended from in vitro multiplication.

D. Contrôle de la conformité morphologique et chimique

La méthode du microbouturage du chanvre ne présente un intérêt que si les plantes obtenues *in vitro* sont conformes aux plantes d'origine pour les critères choisis (BIGOT, 1980).

Les observations précédentes permettent de penser que les plantes obtenues *in vitro* sont semblables aux plantes d'origine quant à leur physiologie (développement et croissance), ceci malgré une croissance un peu plus lente.

Les plantes issues du microbouturage ont conservé les caractéristiques chimiques du type fibres. Ces teneurs sont légèrement inférieures aux teneurs des plantes issues du bouturage horticole et des plantes-mères mais le rapport ne varie pas (PRENEUX *et al.*, 1985) (tabl. 5).

IV. CONCLUSION ET DISCUSSION

Le contrôle de la croissance de *C. sativa* de type fibres en conditions phytotroniques permet de conserver les plantes pendant une période assez longue (3 mois, voire davantage) pour répondre aux problèmes d'analyse du matériel sélectionné, avec le maintien du capital génétique.

La conservation de *C. sativa* par ralentissement de la croissance des clones étudiés est obtenue en diminuant la température. L'alternance de température 22 °C jour/17 °C nuit favorise le développement morphologique et chimique du chanvre de type fibres. Des résultats comparables ont déjà été obtenus pour le chanvre de type drogue (BRAUT-BOUCHER, 1978). D'autre part, ces températures sont proches des conditions thermiques naturelles observées en zone tempérée à l'époque où sont cultivées les plantes.

La mise en œuvre des techniques de culture *in vitro* a permis de multiplier et conserver les clones de *C. sativa* dont l'analyse est en cours. Cette technique doit aider à résoudre plusieurs difficultés (GAUTHERET, 1977 ; TRAN THANH VAN, 1980 ; BIGOT, 1981) : maintien des explants, induction de divisions cellulaires et multiplication de plantes conformes, stockage sur de petites surfaces de grandes quantités de micro-

plantes, sélection de plantes indemnes de virus, culture possible toute l'année, etc...

L'ensemble des résultats obtenus permet de proposer dans l'état actuel de nos investigations un protocole expérimental résumé à la figure 7.

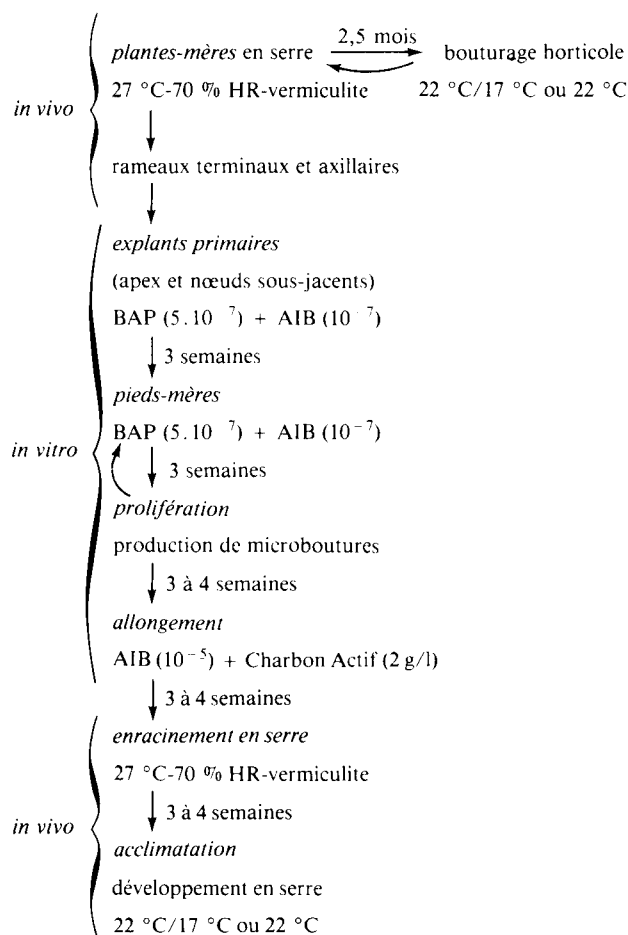


Figure 7

Schéma expérimental de la multiplication végétative *in vitro* du chanvre.

Experimental plan of *in vitro* vegetative multiplication of hemp.

Plusieurs remarques peuvent être faites concernant la culture *in vitro* du chanvre :

Dans un souci de simplification et en vue d'une application plus large, il apparaît important de noter que, durant les 2 premières phases (explant primaire et prolifération), le matériel végétal ne subit pas de modification de la balance hormonale (BAP $5 \cdot 10^{-7}$ M et AIB 10^{-7} M). Cet équilibre stimule l'entrée en croissance des méristèmes axillaires. De même, une seule auxine (AIB) sera utilisée pour toutes les phases de la micropropagation. Ceci présente un élément supplémentaire pour l'optimisation de la méthode de culture *in vitro* de *C. sativa* ; d'autre part, cela devrait permettre de limiter les risques de variations du matériel végétal.

L'installation de pieds-mères *in vitro* a l'avantage de supprimer l'étape délicate de la désinfection. Les pousses développées à partir des pieds-mères sont mises à enraciner *in vitro* en présence de CA (2 g/l) et AIB (10^{-5} M). Cet équilibre assure un certain allongement des microboutures nécessaire à l'enracinement. Ce dernier apparaît faible et peu reproductible *in vitro* malgré les diverses conditions de culture essayées. C'est pourquoi l'enracinement direct *in vivo* a été envisagé. Il est obtenu dans 45 p. 100 des cas malgré quelques problèmes de dessiccation et d'hétérogénéité des microboutures dus à leur petite taille. Ainsi le procédé retenu actuellement est l'enracinement des microboutures en conditions non ascéniques. Cependant quelques difficultés ont été rencontrées et ne sont pas encore résolues. Le rendement actuel de cette méthode est peu élevé ; une plante-mère en serre (1,5 m) fournit en effet environ 70 pieds-mères *in vitro* et 180 microboutures enracinables en 3 mois. Il serait intéressant, afin d'obtenir un rendement élevé, de sélectionner les pousses issues des pieds-mères, ce qui permettrait théoriquement, par repiquages successifs, d'obtenir un très grand nombre de boutures enracinables.

Le protocole actuel permet ainsi de disposer au minimum de 10 semaines pour réaliser les diverses opérations nécessaires à l'analyse chimique (FOURNIER, 1983). Cette durée pourrait être prolongée (6 mois, 1 an...), dans la mesure où le matériel végétal supporte les repiquages successifs *in vitro*. A ce jour, 10 repiquages successifs pendant 8 mois ont été possibles. Il existe cependant certains risques d'anomalies pour les cultures de longue durée (SUTTER & LANGHANS, 1981). Les premières analyses chimiques des teneurs en CBD et Δ^9 -THC des plantes issues de la culture *in vitro* permettent de penser que ces plantes sont semblables aux plantes-mères en serre et en champ, c'est-à-dire de type fibres, pauvre en Δ^9 -THC.

Il serait intéressant de s'assurer de la fiabilité et de la reproductibilité de la méthode pour envisager une propagation en masse, voire industrielle (PETIARD, 1983). L'étude de la variabilité dans la réponse du matériel végétal serait à envisager afin d'homogénéiser la taille et l'allongement des boutures issues de la culture *in vitro* et, en particulier, au niveau des microboutures enracinées directement. Les conditions de la rhizogenèse adventive *in vitro* sans phase callogène doivent être approfondies dans la suite des expériences.

Dans l'avenir d'autres voies de recherche pourraient être étudiées :

— Méthode de conservation de longue durée en maintenant intactes les propriétés du matériel, ralentissement de la croissance par stabilisation à faible température (0° à 5 °C) ou arrêt total du développement par cryoconservation.

— Régénération de plantes chez lesquelles pourrait s'exprimer la variabilité à partir de tissus non différenciés entretenus et stables depuis plusieurs années, dépourvus de Δ^9 -THC et/ou CBD (BRAUT-BOUCHER & PETIARD, 1981) ou ayant subi un nombre limité de repiquages. On évitera les souches entretenues en présence d'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique qui peut provoquer la polyploidie et l'augmentation des teneurs en Δ^9 -THC des plantes (DEPASQUALE *et al.*, 1979).

— Mise en culture de fragments d'organes ou tissus tels que les poils ou les cellules des assises épidermiques afin d'induire la néoformation de méristèmes (TRAN THANH VAN, 1980).

A ce jour nous disposons d'une méthode fiable et pratique répondant aux objectifs fixés. Il reste cependant à améliorer certains points de la méthodologie portant notamment sur l'homogénéité végétal et l'optimisation du rendement, la rhizogenèse adventive

in vitro, enfin l'adaptation en champ ; ceci fera l'objet de travaux ultérieurs.

Reçu le 5 juillet 1985.
Accepté le 30 janvier 1986.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement M. J. P. MATHIEU et la Fédération Nationale des Producteurs de Chanvre (F.N.P.C.) qui nous ont fourni les plantes nécessaires à cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arnoux M., Castiaux J., Mathieu G.**, 1969. Sur l'amélioration de la productivité en fibres chez le chanvre (*Cannabis sativa* L.). *Ann. Amélior. Plantes*, 19 (4), 405-418.
- Bigot C.**, 1980. Multiplication végétative *in vitro* par néoformation de bourgeons et d'embryons somatiques, 135-151. In : « *Multiplication végétative des plantes supérieures* ». Gauthier-Villars ed., Paris, 277 p.
- Bigot C.**, 1981. Multiplication végétative *in vitro* de *Begonia* × *himalis* (Rieger & Schwabenhand). I. Méthodologie. II. Conformité des plantes élevées en serre. *Agronomie*, 1 (6), 433-447.
- Braut-Boucher F.**, 1978. *Etude écophysio-logique du Cannabis sativa L. cultivé au Phytotron. Mise en évidence d'un type chimique nouveau chez un chanvre originaire d'Afrique du Sud*. Thèse Doct. d'Etat, Pharmacie, Université Paris VI, 145 p.
- Braut-Boucher F., Petiard V.**, 1981. Sur la mise en culture *in vitro* de tissus de différents types chimiques du *Cannabis sativa* L. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, sér. III, 292, 833-838.
- Bredemann G., Garber K., Huhuke W., Von Sengbusch R.**, 1961. Die Züchtung von monözischen und diözischen Faserertragreichen Hanfsorten (Fibrimon und Fibridia). *Z. Pflanzenz.*, 46 (3), 235-245.
- Chouard P., Tran Thanh Van M.**, 1964. Vernalisation, sans réfrigération, par les facteurs trophiques de la vigueur, grand luminosité et niveau élevé de la nutrition minérale chez le *Geum urbanum* L. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, 259, 4783-4786.
- Depasquale A., Tumino G., Ragusa S., Moshanas D.**, 1979. Influence of colchicine treatment on the production of cannabinoids in female inflorescences of *Cannabis sativa* L. *Farmaco Ed. Sci.*, 34 (10), 841-853.
- Dumanois C., Godin E., Bigot C.**, 1984. Multiplication végétative *in vitro* de *Gardenia jasminoides* Ellis. *J. Plant Physiol.*, 116, 389-407.
- Fisse J., Boucher F., Cosson L., Paris M.**, 1981. Etude *in vitro* des capacités organogénétiques des tissus du *Cannabis sativa* L. Effet des différentes substances de croissance. *Pl. Méd. et Phyto.*, 15 (4), 217-223.
- Fournier G.**, 1981. Les chimiotypes du chanvre (*Cannabis sativa* L.). Intérêt pour un programme de sélection. *Agronomie*, 1 (8), 679-688.
- Fournier G., Mathieu J. P., Paris M.**, 1983. Distinction analytique des chanvres *Cannabis sativa* L., Cannabinacées. Méthode vernalisée de prélèvement et de traitement des échantillons. *Ann. Falsif. Expert Chim. toxicol.*, 76 (819), 263-277.
- Gautheret R. J.**, 1977. *La culture des tissus et des cellules des végétaux. Résultats généraux et réalisations pratiques. Travaux dédiés à la mémoire de G. Morel*. Masson éd., Paris, 261 p.
- Murashige T., Skoog F.**, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.*, 15, 173-197.
- Paris M.**, 1971. Quelques aspects de la recherche en France sur le Cannabis : culture, extraction, analyse. *Comm. 31^e Congr. int. Sci. pharm.*, Washington, 7-12 décembre.
- Paris M., Boucher F., Cosson L.**, 1975. The constituents of *Cannabis sativa* pollen. *Econ. Bot.*, 29, 245-253.
- Petiard V.**, 1983. Organisation d'un laboratoire de biotechnologie végétale. *Biofutur*, 17, 13-16.
- Preneux C., Braut-Boucher F., Tran Thanh Van K.**, 1985. Expression *in vitro* de la variabilité au niveau de la différenciation morphogénétique et des capacités biosynthétiques d'explants de *Cannabis sativa* L. placés dans différentes conditions d'environnement. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, Actualités botaniques, 132, 3.
- Sutter E., Langhans R. W.**, 1981. Abnormalities in *Chrysanthemum* regenerated from long term cultures. *Ann. Bot.*, 48, 559-568.
- Tran Thanh Van K.**, 1980. Control of morphogenesis by inherent and exogenous by applied factor in thin cells layers. *Int. Rev. Cytol.*, suppl. IIA, 7, 175-194.
- Vine S. J., Jones O. P.**, 1969. The culture of shoot tips of hop (*Humulus lupulus* L.) to eliminate viruses. *J. Hort. Sci.*, 44, 281-284.
- Yusufov A. G., Khachumova S. S.**, 1975. Ability of isolated leaves to regenerate in a sterile culture. *Bot. Zh.*, 60 (1), 95-113 (en russe).