

Etude du Potential
D'enracinement
in vivo et in vitro de
l'Amandier
cultivé au Liban

مصلحة الأبحاث العلمية الزراعية

محطة تل العمارنة

1998

INTRODUCTION

L'amandier constitue l'une des principales cultures fruitières produites au Liban, d'autant plus que les conditions écogéographiques du pays lui sont particulièrement favorables, de part ses faibles exigences culturales. De plus, les fruits ou amandons, sont très appréciés par le libanais, et leur consommation s'étale sur 3 périodes de l'année, ce qui confère à cette culture un intérêt économique incontestable (Chalack, 1999).

La multiplication de l'amandier par les voies végétatives classiques (greffage, bouturage) est difficile et se heurte souvent à des problèmes phytosanitaires, surtout celui de l'invasion par des virus qui entraînent une diminution progressive de la vigueur des plants produits et une perte considérable du rendement (Kester et al., 1986 ; Chalack, 1999).

A l'échelle internationale ce problème est contourné grâce à la technique de culture *in vitro* des tissus, qui s'est avérée être un excellent outil pour la production du matériel indemne de virus (Savino et al., 1990).

Dans ce contexte, et dans le but d'améliorer la qualité des plants d'amandier produits au Liban, le présent travail constitue une mise au point technique de la propagation *in vitro* de 2 variétés, "Halwani" et "Demi-Khachabi".

Dans la première partie de ce manuscrit, seront exposées les principales caractéristiques de l'amandier, la place de la culture des tissus chez cette espèce, la situation de cette culture au Liban et les objectifs de ce travail.

La deuxième partie traitera les méthodes mises en oeuvre dans l'expérimentation, pour assurer les différentes étapes: établissement, multiplication, enracinement et acclimatation.

Enfin, les résultats de l'expérimentation seront analysés, en concluant aux conditions les plus favorables à la micropropagation de l'amandier.

MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal

Notre choix a porté sur 2 variétés d'amandier: Halwani double amandon (H2) et Demi-khachabi (B1), en raison de l'importance de leur aire de culture dans la Békaa.

2. Etablissement des cultures

2.1. Préparation du matériel végétal

Après suppression des feuilles, les rameaux sont fractionnés en portion de 6 cm environ.

La désinfection est faite de la manière suivante:

- rinçage à l'eau courante pendant 5 min;
- rinçage dans l'alcool 70% pendant 5 sec;
- incubation dans une solution chlorox (Cl 52.5 g/lit) diluée à de 20% pendant 5 min;
- 3 rinçages successifs à l'eau distillée stérile pendant 5 min, 10 min et 15 min respectivement, sous hotte à flux laminaire.

2.2. Mise en culture

Suite à la désinfection des rameaux, des fragments de 1 – 1,5 cm portant chacun un seul bourgeon axillaire sont mis en culture, sous hotte à flux laminaire, dans des tubes à essais (24 x 150 mm) contenant 10 ml de milieu de culture.

Pour la variété H2, 5 milieux de différenciation dénommés C1, C2, C3, C4 et C5 sont expérimentés. Ils ont possédé la même composition en saccharose, vitamines, substances organiques, et régulateurs de croissance, mais ont différé les uns des autres par la composition en macro-éléments (tableau 2). Ces différences ont porté sur la concentration totale en ions et plus particulièrement sur la teneur en azote (tableau 3). Pour la variété B1, seul le milieu C3 a été utilisé.

Après ajustement du pH à 5.7 – 5.8, puis addition d'agar-agar (8g/lit), les milieux sont stérilisés par autoclavage à une température de 118 °C pendant 20 min.

Les cultures sont maintenues dans un incubateur conditionné, à une température comprise entre 23 °C et 25 °C et une photopériode de 16 h par jour, avec une intensité de 4000 lux pourvue par des lampes blanches fluorescentes.

Le pourcentage de reprise des explants est évalué 4 semaines après la mise en culture.

Tableau 1 : Composition des différents milieux de culture utilisés pour les phases d'établissement et de multiplication

Composants	Composition en mg/lit des milieux				
	C1	C2	C3	C4	C5
Composants minéraux					
Macro-éléments	MS (Murashige et Skoog, 1962)	MSM (Rodriguez et al., 1990)	LEPOIVRE (Quoirin et al., 1977)	WPM (Lloyd et McCown, 1981)	DKW (Driver et Kuniyuki, 1984)
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	880	-	96	147
KH ₂ PO ₄	170	170	-	170	258
KNO ₃	1900	1900	1800	-	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	740	-	370	740
NH ₄ NO ₃	1650	824	-	400	1416
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	-	-	1200	556	1960
K ₂ SO ₄	-	-	-	990	1560
Composition MS (Murashige et Skoog, 1962)					
Micro-éléments					
CoCL ₂ 6H ₂ O	0.025				
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025				
H ₃ BO ₃	6.2				
KI	0.83				
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3				
Na ₂ MnO ₄ 2H ₂ O	0.25				
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6				
Composition (Murashige et Skoog, 1962)					
Fer					
FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8				
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	37.3				
Vitamines					
Inositol	100				
Acide nicotinique	1				
Pyridoxine	1				
Thiamine	1				
Acide ascorbique	25				
Hormones					
BAP	1				
AIB	0.01				
Saccharose	30 000				

- le milieu ne contient pas l'élément en question

Tableau 2: Composition en méq/lit des macro-éléments (ions) des 5 milieux utilisés

Ions	Milieu	C1 MS (Murashige et Skoog. 1962)	C2 MSM (Rodriguez et al., 1990)	C3 LEPOIVRE (Quoirin et al., 1977)	C4 WPM (Lloyd et McCown. 1981)	C5 DKW (Driver et Kuniyuki. 1984)
NO ₃ ⁻		39.4	28.95	24.49	9.7	34.3
PO ₄ ³⁻		3.74	1.25		3.74	5.7
SO ₄ ²⁻		3	6.01		14.36	23.9
Cl ⁻		5.98	11.9	-	1.3	1.99
K ⁺		20.04	20.05	37.64	12.6	19.8
Ca ²⁺		5.98	11.9	10.16	6.01	18.6
Mg ²⁺		3	5.9		3	6
NH ₄ ⁺		20.61	10.3	4.99	4.99	17.7
H ⁺		2.49	2.5	39.67	2.49	3.8
Total N		60.01	39.25	29.48	14.69	52
NH ₄ ⁺ / N		0.34	0.28	0.16	0.33	0.34
Total I ⁺		52.12	50.65	113.19	29.09	65.89
N / Total I ⁺		0.57	0.77	0.13	0.25	0.39
PO ₄ ³⁻ / Total I ⁺		0.035	0.02	0.262	0.064	0.043
K ⁺ / Total I ⁺		0.19	0.39	0.16	0.21	0.15
Concentration		95.75	98.76	156.67	44.01	103.73
Totale en ions (mM)						

- le milieu ne contient pas l'élément en question.

3. Multiplication

Un mois après la mise en culture, les plantules développées à partir des nœuds sont séparées de l'explant de départ et transplantées sur le même milieu utilisé pour l'établissement de la culture.

Toutes les 3 à 4 semaines, les rosettes de tiges ainsi formées sont séparées et repiquées sur un milieu frais (subculture).

Au bout de chaque subculture le coefficient de multiplication est estimé selon la formule:

Nombre de pousses obtenues en fin de subculture

Nombre de pousses initiales

une pousse étant constituée de 2 à 3 nœuds et située soit sur l'axe de la plantule, soit en position latérale.

4. Elongation

En vue de l'élongation des entre-nœuds, les microplantules issus de la 4^{ème} subculture sont repiquées sur un milieu contenant les macro-éléments LP et additionné d'une faible concentration de BAP (0,2 mg/lit) et de GA3 (0,2 mg/lit).

5. Enracinement

Sept traitements ont été expérimentés chez la variété H2 en se basant sur le milieu contenant les macro-éléments LP (Quoirin et *al.*, 1977) dilués de moitié et les micro-éléments MS (Murashige et Skoog, 1962) également dilués de moitié (tableau 5). Pour chaque traitement, un nombre minimum de 32 plantules a été testé. Pour la variété B1, seul le traitement T3 a été appliqué.

Traitement témoin T0

Les plantules sont repiquées sur le milieu E0 gélosé dépourvu d'hormone et placées directement dans les conditions de la salle de culture sous une photopériode de 16h/j.

Traitement T1

Les plantules sont directement repiquées sur le milieu E1 gélosé additionné d'AIA (0,5 mg/lit). Elles sont ensuite placées à l'obscurité pendant 6j avant d'être mises sous la photopériode de 16 h/j.

Traitement T2

Les plantules ont été traitées comme précédemment, mais sur le milieu E2 gélosé contenant de l'AIB (0,5 mg/lit) au lieu de l'AIA.

Traitement T3

Les plantules ont subi une première étape d'induction à l'obscurité pendant 4 h sur un milieu E3 liquide additionné d'AIA (100 mg/lit). Elles sont ensuite transférées sur le milieu E0 et placées à l'obscurité totale pendant 6 j avant d'être mises sous la photopériode de 16 h/j.

Traitement T4

Les plantules ont été traitées comme dans T3, mais sur le milieu E4 gélosé contenant de l'AIB (100 mg/lit) au lieu de l'AIA.

Traitement T5

Les plantules ont subi une première étape d'induction à l'obscurité pendant 20 j sur le milieu E5 gélosé additionné d'AIA (6 mg/lit). Elles sont ensuite transférées sur le milieu E0 et placées sous la photopériode de 16 h/j.

Traitement T6

Les plantules ont été traitées comme dans T5, mais sur le milieu E6 gélosé contenant de l'AIB (6 mg/lit) au lieu de l'AIA.

Tableau 3: Composition des différents milieux utilisés pour les traitements d'enracinement.

Composants	Composition en mg/lit des milieux						
	E0	E1	E2	E3	E4	E5	E6
Macro-éléments	Composition LP (Quoirin et al., 1977) diluée de moitié						
CaCl ₂ 2H ₂ O				-			
KH ₂ PO ₄				135			
KNO ₃				900			
MgSO ₄ 7H ₂ O				180			
NH ₄ NO ₃				200			
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O				600			
K ₂ SO ₄				-			
Micro-éléments	Composition MS (Murashige et Skoog, 1962) diluée de moitié						
CoCl ₂ 6H ₂ O				0.0125			
CuSO ₄ 5H ₂ O				0.0125			
H ₃ BO ₃				3.1			
KI				0.415			
MnSO ₄ 4H ₂ O				11.15			
Na ₂ MnO ₄ 2H ₂ O				0.125			
ZnSO ₄ 7H ₂ O				4.3			
Fer	Composition MS (Murashige et Skoog, 1962) diluée de moitié						
FeSO ₄ 7H ₂ O				13.9			
Na ₂ EDTA 2H ₂ O				18.65			
Vitamines							
Inositol	100	100	100	-	-	100	100
Acide nicotinique	1	1	1	-	-	1	1
Pyridoxine	1	1	1	-	-	1	1
Thiamine	1	1	1	-	-	1	1
Acide ascorbique	25	25	25	-	-	25	25
Hormones							
AIA	-	1	-	100	-	6	-
AIB	-	-	1	-	100	-	6
Autres							
Saccharose	30000	30000	30000	30000	30000	30000	30000
Agar	8000	8000	8000	-	-	8000	8000

- le milieu ne contient pas l'élément en question.

6. Acclimatation

Lorsque les racines atteignent 2.5 cm de longueur, les plantules sont préparées pour le transfert en bac d'acclimatation. Elles sont alors débarrassées de l'agar, puis plongées dans une solution fongique Captan (1 g/lit). Ensuite elles sont repiquées dans des petits pots contenant un mélange de terreau et de perlite (2/3, 1/3).

Pour éviter le dessèchement des plantules au cours de l'acclimatation, l'humidité est baissée progressivement en déplaçant le couvercle jusqu'à ce qu'elles s'adaptent à l'ambiance normale. Ce dernier est définitivement retiré au bout de 10 jours.

Tout au long de cette étape, des traitements phytosanitaires sont appliqués régulièrement pour éviter les attaques parasitaires et cryptogamiques.

Aussi, des apports réguliers d'engrais minéraux sont assurés pour maintenir la croissance des plantules.

7. Analyse statistique

L'analyse statistique de l'expérimentation est réalisée sur le logiciel Excel – test « ANNOVA ». Une analyse de variance est effectuée, pour étudier le coefficient de multiplication, l'effet des facteurs génotypes, milieux et nombre de subcultures.

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Etablissement des cultures à partir des nœuds

La mise en culture des nœuds effectuée chez les 2 variétés H2 et B1, après désinfection avec 20% de Chlorox pendant 5 min. se sont heurtées à 2 types de problèmes : les oxydations et les infections bactériennes et mycéliennes, entraînant la mort des explants atteints.

La variété H2 a présenté un taux de contamination de 56.9%. En revanche, c'est la variété B1 qui a présenté le taux de survie le plus important soit 81.47% (tableau 4), donnant des plantules parfaitement développées (figure 1).

Les plantules infectées ont été éliminées et seules les plantules non infectées ont été gardées pour assurer les repiquages successifs. Il est important de noter que le débourrement des nœuds a été obtenu sur l'ensemble des milieux testés.

Tableau 4: Pourcentage de survie des nœuds des 2 variétés H2 et B1 après désinfection, estimé un mois après la mise en culture.

Variété/ milieu (x)	Nombre de bourgeons mis en culture	Pourcentage de bourgeons			
		tués par oxydation	tués par champignon	tués par bactéries	survivants
H2/milieux C1,C2,C3,C4 et C5 confondus	200	8.50	48.4	0.00	
B1 / C3	62	0.88	15.0	2.65	



Figure 1 : Débourrement d'un nœud chez la variété B1, 4 semaines après la mise en culture

2. Multiplication

2.1 Maintien en survie

Dès la deuxième subculture sur les milieux C1, C2, C4 et C5 les plantules de la variété H2 ont commencé à présenter des symptômes de jaunissement généralisé. Seules les plantules cultivées sur le milieu C3 ont continué à se développer normalement. Pour cela, seul le milieu C3 a été utilisé pour les subcultures successives des plantules de la variété B1.

Cet effet du milieu serait dû au contenu en macro-éléments. Ainsi le milieu C3 contenant la composition LP (tableau 2) s'est distingué des 4 autres par sa richesse en PO_4^{3-} et sa faible teneur en SO_4^{2-} et Mg^{2+} (figure 2).

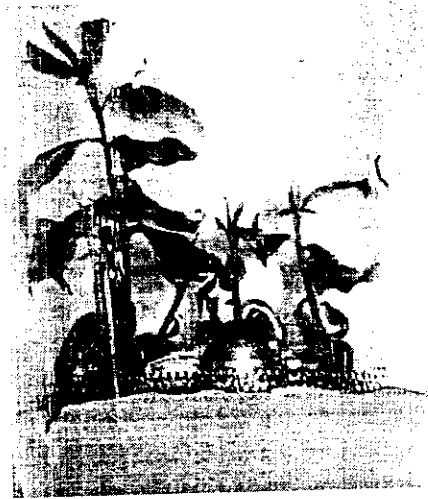


Figure 2: Plantules de la variété H2 en cours de multiplication

Tableau 5: Evolution du coefficient de multiplication des plantules des 2 variétés d'amandier H2 et B1 en fonction du nombre de subculture (durée d'une subculture = 1 mois).

Subcultures	Variétés	Milieux	Ni	Nf	Nf / Ni
1 ^{ère}	H2	C1	32	67	2.09
		C2	32	61	1.90
		C3	32	53	1.65
		C4	32	49	1.53
		C5	32	67	2.09
	B1	C3	32	37	1.15
2 ^{ème}	H2	C1	32	85	2.65
		C2	32	84	2.62
		C3	32	97	3.03
		C4	32	46	1.43
		C5	32	63	1.96
	B1	C3	32	96	3.00
3 ^{ème}	H2	C1	32	72	2.25
		C2	32	75	2.34
		C3	32	78	2.43
		C4	32	66	2.06
		C5	32	68	2.12
	B1	C3	32	73	2.28
4 ^{ème}	H2	C1	32	47	1.46
		C2	32	51	1.59
		C3	32	72	2.25
		C4	32	34	1.06
		C5	32	37	1.15
	B1	C3	32	66	2.06

Ni : nombre de pousses initiales utilisées en début de subculture.

Nf : nombre de pousses obtenues en fin de subculture.

Nf / Ni : Coefficient de multiplication (nombre de pousses finales / nombre de pousses initiales).

2.2. Coefficient de multiplication

Le coefficient de multiplication des plantules régénérées a été examiné tout le long de 4 subcultures pour les 2 variétés H2 et B1 (tableau 5).

Pour la variété H2, le coefficient de multiplication n'a pas été significativement différent d'un milieu à l'autre, (F observée $<$ F critique) (tableau 6, figure 3). Toutefois, l'examen attentif et régulier des cultures a révélé un meilleur état végétatif des plantules sur le milieu C3, tandis que les plantules cultivées sur les autres milieux ont continué à dépérir.

L'effet de la variété n'a pas été significatif, H2 et B1 s'étant comportés d'une façon relativement similaire sur le milieu C3 pendant les différentes subcultures (F observée $<$ F critique) (tableau 7, figure 4).

L'effet de la subculture a été significatif chez les 2 géotypes (F observée $>$ F critique) (tableau 8). En effet, le coefficient de multiplication a augmenté en passant de la première à la deuxième subculture avant de baisser progressivement par la suite (figure 5).

Toutefois, le coefficient de multiplication obtenu dans cette étude a été relativement faible ne dépassant pas 3 dans le meilleur des cas. Ce résultat n'est pas comparable à celui précédemment obtenu chez la variété Ferragnès par Rugini et Verma (1982), qui ont rapporté un coefficient de 6 pendant 24 subcultures successives. Cette différence pourrait être due à un effet variétale.

Tableau 6: Analyse de variance (ANNOVA) du coefficient de multiplication à un seul facteur, celui du milieu chez la variété H2, les 4 subcultures confondues.

Source de variation	Degré de liberté	Somme des carrés des écarts	Carré moyen	F observée	F critique
Facteur milieu	4	1.59	0.39	1.72 NS	3.05
Résiduelle	15	3.47	0.23		
Total	19	5.06			

Coefficient de variation = 15.65%

NS, la différence entre les 5 milieux est non significative au seuil de probabilité 0.05

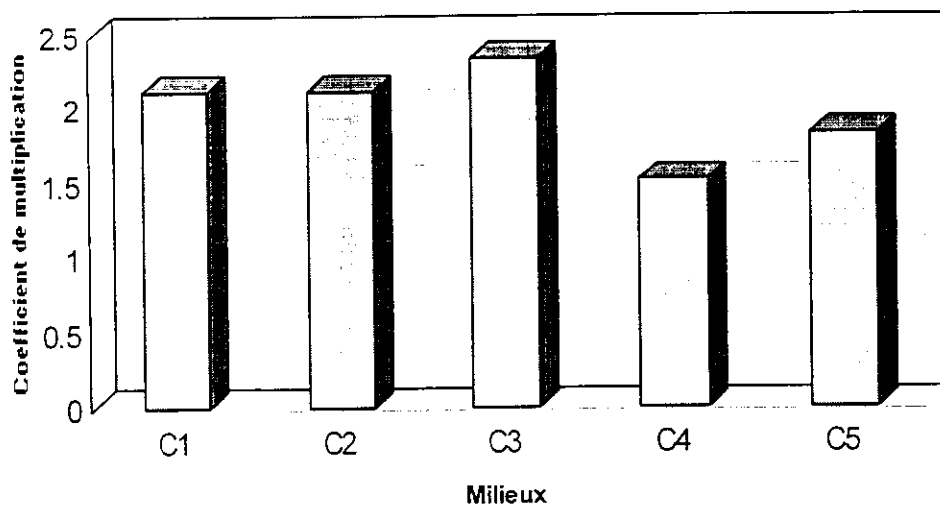


Figure 3: Effet du milieu sur le coefficient de multiplication durant les 4 subcultures, chez la variété H2.

Tableau 7: Analyse de variance (ANNOVA) du coefficient de multiplication à un seul facteur, celui de la variété sur le milieu C3, les 4 subcultures confondues.

Source de variation	Degré de liberté	Somme des carrés des écarts	Carré moyen	F observée	F critique
Facteur variété	1	0.09	0.09	0.20 NS	5.98
Résiduelle	6	2.71	0.45		
Total	7	2.80			

Coefficient de variation = 6.72%

NS. la différence entre les 2 variétés est non significative au seuil de probabilité 0.05

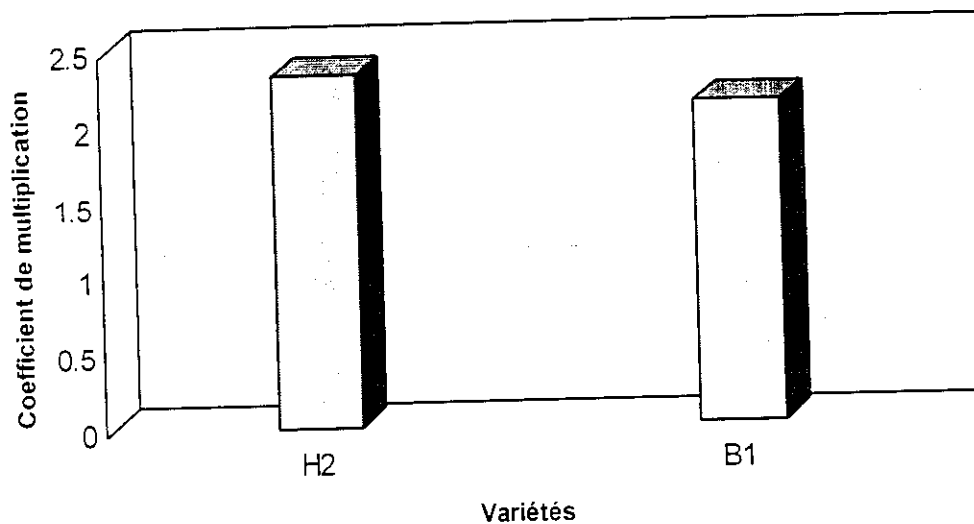


Figure 4: Effet de la variété sur le coefficient de multiplication sur le milieu C3, les 4 subcultures confondues

Tableau 8: Analyse de variance (ANNOVA) du coefficient de multiplication à un seul facteur, celui de la subculture, sur le milieu C3, les 2 variétés confondues.

Source de variation	Degré de liberté	Somme des carrés des écarts	Carré moyen	F observée	F critique
Facteur subculture	3	0.81	2.67	28.94 ***	3.09
Résiduelle	20	1.48	0.09		
Total	23	9.85			

Coefficient de variation = 29.5%

***, la différence entre les 4 subcultures est hautement significative au seuil de probabilité 0.001

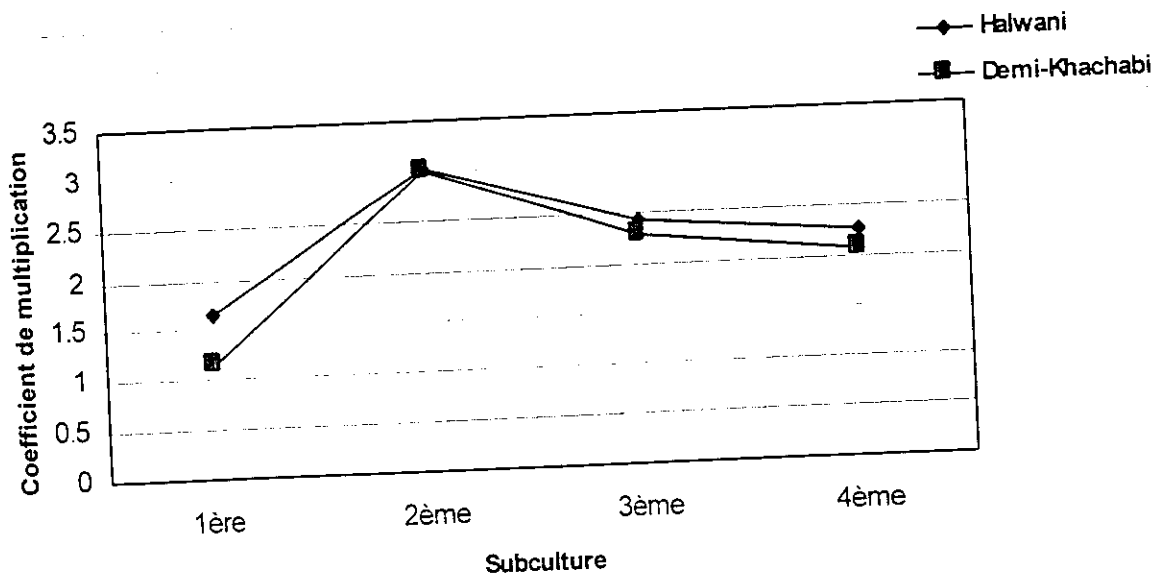


Figure 5: Effet de la subculture sur l'évolution du coefficient de multiplication obtenu pour chacune des 2 variétés, sur le milieu C3.

3. Elongation

Un effet variétal significatif a été constaté au cours de cette étape. Alors que les plantules de la variété H2 ont présenté des symptômes de nécrose d'apex et de jaunissement du feuillage, les plantules de la variété B1 ont présenté un meilleur développement. Cet effet variétal constaté en faveur de B1 serait dû à des différences au niveau des réserves endogènes tels que les nutriments, les régulateurs de croissance et les composés phénoliques pouvant interférer avec la régénération des tissus (Zryd, 1988).

4. Enracinement

L'effet du traitement chez la variété H2 a été hautement significatif, en faveur de T3 et de T4. En effet, ces 2 traitements ont favorisé le développement racinaire dès le 8ème jour (figure 6). Le taux d'enracinement calculé au bout de 15 jours a été relativement important dépassant 90% pour les 2 traitements, indépendamment du type d'auxine. L'efficacité du traitement T3 a pu être confirmée chez la variété B1 avec un taux d'enracinement de 96%.

Pour les autres traitements, seul T6 a permis l'enracinement des plantules mais avec un taux très faible ne dépassant pas 3%.

Par ailleurs, aucune plantule témoin non traitée à l'auxine n'a pu être enracinée.

Ces résultats démontrent la nécessité d'une phase d'induction à l'obscurité sous l'action de l'auxine avant le transfert sur le milieu LP dépourvu d'hormones, pour l'enracinement des plantules d'amandier. De tels traitements n'ont pas été rapportés auparavant pour l'enracinement des variétés d'amandier, qui présentent généralement une récalcitrance à l'enracinement.

Toutefois, certains travaux ont décrit l'enracinement de la variété Ferragnès grâce à l'addition au milieu de culture, de NAA ou AIB à 1 mg/lit mais avec un taux ne dépassant pas 55 % (Rugini et Verma, 1982).

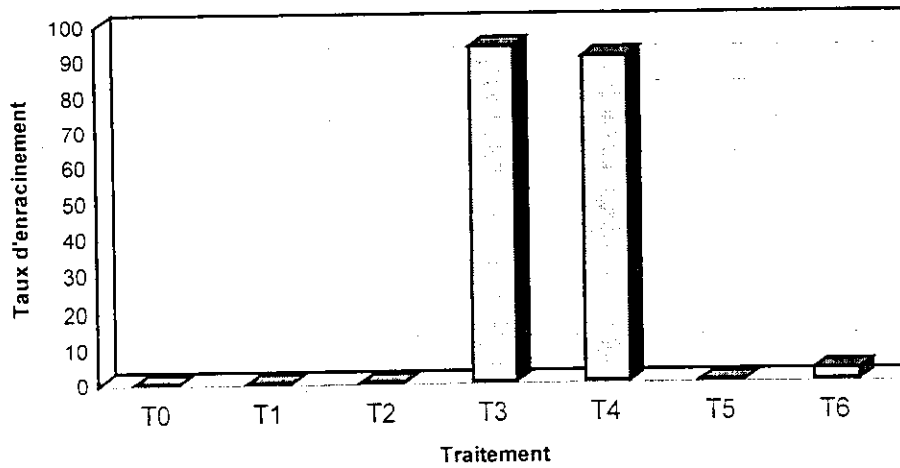


Figure 6: Effet du traitement sur le taux d'enracinement chez la variété H2.



Figure 7: Plantules enracinées de la variété B1 (traitement T3)

5. Acclimatation

Les plantules des 2 variétés H2 et B1 enracinées au cours de cette étude sont actuellement en cours d'acclimatation en serre (figure 7). Les résultats n'ont pas encore été collectés



Figure 8: Plantule de la variété H2 en cours d'acclimatation en serre

CONCLUSION

Cette étude portant sur les différentes phases de propagation *in vitro* des 2 variétés d'amandier Halwani et Demi-Khachabi, a permis de conclure aux points techniques suivants :

- La désinfection des explants de départ avec 20% d'hypochlorite de sodium durant 5 min a conduit à un taux de survie relativement correct, mais qui pourrait être amélioré en y associant un traitement fongique.
- Le milieu de culture contenant les macro-éléments de Lepoivre s'est avéré le plus favorable à la prolifération de l'amandier.
- Le passage par une phase d'élongation n'a pas permis d'améliorer la longueur de plantules traitées.
- L'enracinement des plantules a été rendu possible après passage par une phase d'induction à l'obscurité sous l'action d'AIA OU d'AIB, suivi du transfert des plantules sur le milieu LP dépourvu d'hormones.

Toutefois, pour développer la technique de propagation *in vitro* de l'amandier, il serait recommandable de :

- Reprendre le travail, en partant non seulement de noeuds mais aussi de méristèmes, suivi d'un contrôle sanitaire des plantules sorties *ex vitro* (indexage - test Elisa) en vue de s'assurer de l'obtention de plantules indemnes de virus.
- Optimiser le coefficient de multiplication en étudiant l'effet de plusieurs balances hormonales.

- La technique d'enracinement mise au point dans cette étude chez 2 variétés locales peut être adaptée chez d'autres variétés dans l'objectif de produire des plants sur leurs propres racines sans passer par le greffage.
- Elargir la gamme de génotypes en introduisant *in vitro* non seulement des variétés locales mais également des porte-greffes et même des variétés étrangères à floraison tardive (pouvant échapper au gel d'hiver).

Enfin, ce travail a conduit à l'obtention de 230 plantules racinées des 2 variétés Halwani et Demi-Khachabi. Elles sont actuellement en cours d'acclimatation afin d'établir des têtes de clones pour la production, à plus long terme, de plants d'amandier de qualité.

الجمهورية اللبنانية
مكتب وزير الدولة لشؤون التنمية الإدارية
مركز مشاريع ودراسات القطاع العام

République Libanaise
Bureau du Ministre d'Etat pour la Réforme Administrative
Centre des Projets et des Etudes sur le Secteur Public
(C.P.E.S.P.)