

## POTENTIEL D'ENRACINEMENT *IN VIVO* ET *IN VITRO* DE VARIÉTÉS LIBANAISES D'AMANDIER (*PRUNUS DULCIS* MILLER)

L. Chalak, A. Elbitar, A. Chehadé, W. Chamoun

Département de Biotechnologie Végétale, Institut de Recherches Agronomiques, B.P. 287,  
Zahlé, Liban  
lamischalak@hotmail.com

(Received 8 March 2002    Accepted 3 April 2003)

### RESUME

*Cette étude a consisté à évaluer l'aptitude à l'enracinement de 3 variétés libanaises d'amandier (Prunus dulcis Miller), Firki, Halwani et Demi-khachabi. Deux protocoles ont été comparés: le premier réalisé en serre sur des rameaux lignifiés et semi-lignifiés et sous l'action de concentrations croissantes d'acide 3-indolylbutyrique; le second effectué sur des microboutures préalablement multipliées in vitro, sous l'action de 7 traitements différant par le type et la concentration de l'auxine ainsi que par le mode d'induction. Les résultats obtenus en serre ont révélé l'inefficacité des traitements de l'acide 3-indolylbutyrique chez les 3 variétés, quelle que soit la concentration utilisée. Dans les conditions in vitro, l'enracinement des microboutures a été réussi chez les 3 variétés, avec des taux dépassant 90%, après une phase d'induction à l'obscurité pendant 4 h sous l'action de l'acide indole acétique ou de l'acide 3-indolylbutyrique, suivie du transfert des microboutures sur le milieu de Murashige et Skoog dépourvu de régulateurs de croissance. Les microboutures ainsi enracinées ont été acclimatées en serre avec un taux de reprise moyen de 60%.*

**Mots clés:** amandier, variétés libanaises, bouturage, *in vivo*, *in vitro*, auxine

### ABSTRACT

*This study consisted of evaluating the rooting potential of 3 local varieties of almond (Prunus dulcis Miller), Firki, Halwani and Demi-khachabi. Two procedures were tested: the first one was conducted on lignified and semi-lignified material under the greenhouse conditions, with 4 increasing concentrations of indolylbutyric acid; the second one was carried out on micro-cuttings that were previously subcultured in vitro, with 7 treatments differing by induction mode and auxin type and concentration. Results showed that, for in vivo induction, all indolylbutyric acid treatments were inefficient in inducing*

*rhizogenesis for the 3 varieties. On the other hand, in in vitro conditions, high rooting responses (90%) were only obtained 4 hours after incubation in darkness on liquid half-strength MS basal medium additoned by either indoleacetic acid or indolylbutyric acid, followed by a subsequent 30 days of culture on solid half-strength Murashige and Skoog basal medium. Acclimatization of in vitro rooted cuttings was achieved in the greenhouse with a survival rate of 60%.*

**Keywords:** almond, Lebanese varieties, rooting, *in vivo*, *in vitro*, auxin

## INTRODUCTION

Durant des siècles, l'amandier (*Prunus dulcis* Miller) a été cultivé par semis. Ce mode de multiplication, couplé à l'action de sélections, à la fois naturelle et humaine, a conduit à une assez large variabilité génétique du fait de l'allogamie générale de l'espèce (Oukabli *et al.*, 2001). Avec l'évolution des techniques de multiplication, les variétés d'amandier ont été ensuite multipliées par greffage sur des sujets francs issus de semis d'amandier ou de pêcher et, plus tard, sur des porte-greffes clonaux de prunier ou de pêcher x amandier (Grasselly et Crossa Raynaud, 1980). Cette deuxième modalité permet d'assurer la conformité génétique du matériel de multiplication mais représente une contrainte pour une production en masse, et ne permet pas d'évaluer le développement des variétés d'amandier plantées directement sur leurs propres racines. Quant au bouturage, il a été réussi uniquement chez un nombre limité de porte-greffes clonaux et très peu de travaux ont fait état de l'efficacité de cette technique chez les variétés d'amandier.

Les techniques de culture de tissus peuvent contourner ces difficultés pour la production en masse de plants uniformes (Augé *et al.*, 1989; Werbrouck et Debergh, 1994). En effet, la micropropagation ou microbouturage connaît un essor exceptionnel auprès des professionnels du monde végétal et, pour de nombreuses espèces, on peut considérer qu'elle est au point au stade industriel (Rowe, 1986). Chez l'amandier, un nombre limité de génotypes ont, jusque-là, fait l'objet d'essai de microbouturage, mais les résultats n'ont pas été encourageants, le problème majeur étant lié à la difficulté d'enracinement des vitroplantules (Tabachnik et Kester, 1977; Rugini et Verma, 1983).

L'objectif de ce travail a été d'étudier le potentiel d'enracinement de 3 variétés libanaises d'amandier, par bouturage classique en serre ainsi que dans des conditions de culture *in vitro*.

## MATERIEL ET METHODES

### Matériel végétal

Le matériel végétal a été constitué de 3 variétés d'amandier Firki, Halwani et Demi-khachabi, très cultivées dans la plaine de la Békaa. Pour les essais d'enracinement *in vivo* (en

serre), des rameaux lignifiés et semi-lignifiés ont été prélevés dans des vergers de la Békaa, sur des arbres âgés d'une vingtaine d'années, sains en apparence et présentant un développement végétatif normal. Pour l'enracinement *in vitro*, l'expérimentation a été conduite sur des microboutures préalablement micropropagées sur le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962), pendant 7 subcultures successives.

### **Bouturage *in vivo***

Deux essais ont été réalisés dans les serres de l'Institut de Recherches Agronomiques à Tyr, dans des conditions contrôlées de température ( $26 \pm 3^\circ\text{C}$ ) et d'humidité (70%, mist system) et sous la photopériode normale de la saison: (i) le premier à la mi-février avec des rameaux lignifiés et (ii) le second à la mi-août avec des rameaux semi-lignifiés.

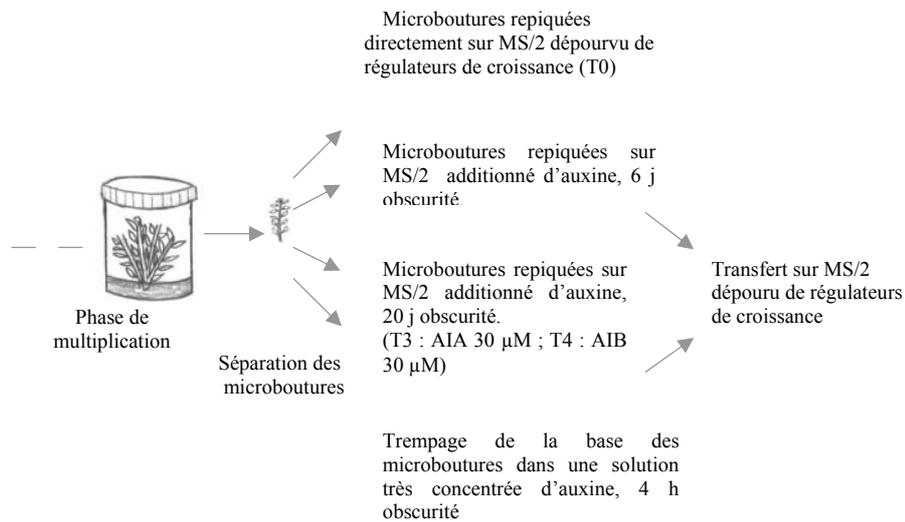
Les rameaux ont été fractionnés en portions ou boutures de 20 cm environ chacune. Les boutures ont été ensuite trempées dans une solution fongicide (methyl 2-benzimidazole carbamate,  $10 \text{ g.l}^{-1}$ ), puis mises à sécher à l'air libre pendant 5 min. Elles ont été ensuite traitées à leur base pendant 5 sec dans une solution d'AIB (acide 3-indolylbutyrique). Pour chacun des deux essais, 4 traitements différant par la concentration en AIB, (0, 5, 15 et 25 mM) ont été utilisés. Les boutures ont été ensuite repiquées dans un bac situé à 1 m du sol et contenant un mélange de terreau et de perlite (1/1), selon des tracés  $15 \times 10 \text{ cm}$ .

Les deux essais ont été conduits selon un dispositif expérimental complètement aléatoire, avec 3 répétitions (de 10 boutures chacune) par variété et par traitement. Au bout de 2 mois, les boutures ont été retirées du substrat et examinées pour le développement du cal et l'enracinement.

### **Bouturage *in vitro***

Enracinement *in vitro*. Des microboutures issues de la 7<sup>ème</sup> subculture ont été transférées sur le milieu de base de Murashige et Skoog dont les macro- et les micro-éléments sont réduits de moitié (MS/2) et contenant du saccharose (11 M). Après ajustement du pH à 5,7, le milieu a été additionné d'agar ( $7 \text{ g.l}^{-1}$ ) puis stérilisé par autoclavage à  $120^\circ\text{C}$  pendant 20 min. Sept traitements d'enracinement ont été expérimentés (Fig. 1), différant les uns des autres par le mode d'induction, le type d'auxine (AIB et AIA (acide indoleacétique) et la concentration de celle-ci (0, 5, 30 et  $500 \mu\text{M}$ ). Trente deux microboutures ont été préparées pour chaque traitement.

Les cultures ont été placées dans des conditions contrôlées de température ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ), de photopériode (16 h/j) et d'intensité lumineuse (3000 lux). Le taux d'enracinement a été relevé au bout de 15 jours.



Les cultures sont soumises à une photopériode de 16 h/j, une intensité lumineuse de 3000 lux et une température de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$ .

**Figure 1. Traitements d'enracinement appliqués chez 3 variétés d'amandier.**

*Acclimatation en serre.* Les microboutures enracinées ont été débarrassées de la gélose par rinçage à l'eau courante puis trempées pendant quelques sec dans une solution fongicide (methyl 2-benzimidazole carbamate,  $10 \text{ g.l}^{-1}$ ). Elles ont été ensuite repiquées dans un bac situé à 1 m du sol contenant un substrat constitué d'un mélange de terreau, tourbe et perlite (1:1:1), selon des tracés 15 x 10 cm. Pendant les 15 premiers jours, une humidité relativement élevée (70%, mist system) a été maintenue afin d'éviter le dessèchement des microboutures; elle a été abaissée progressivement par la suite pour leur permettre de s'adapter aux conditions extérieures. La température en serre n'était pas parfaitement contrôlée et a varié entre 27 et 32°C.

L'essai d'acclimatation a été conduit sur seulement 63 microboutures ayant échappé à des problèmes de contaminations bactériennes survenant brusquement dans les cultures (données non présentées). Un dispositif expérimental complètement aléatoire a été utilisé, avec 3 répétitions par variété (de 5 à 9 microboutures chacune).

Au bout de 60 j, le nombre de boutures ayant survécu au transfert en serre et ayant développé au moins 2 nouvelles feuilles a été relevé.

#### **Analyse des données**

Les différences entre les traitements ont été évaluées selon le test de Duncan (General Linear Models Procedure, SAS Institute, Cary, N.C.).

## **RESULTATS**

### **Bouturage *in vivo***

Dès la deuxième semaine, le débourrement des bourgeons a débuté sur la totalité des boutures des 2 essais, conduisant progressivement au développement de nouvelles pousses. Au bout de 2 mois, un cal cicatriciel de couleur blanche (environ 1 x 1 cm) a été observé à la base d'un nombre limité de boutures (Tableau 1), aussi bien dans le cas des témoins non traités que dans le cas des traitements à l'AIB. Les 3 variétés ont pratiquement présenté des comportements similaires. Sur les 720 boutures traitées en février et en août, aucune bouture n'a pu émettre des racines et ceci quel que soit le traitement (Tableau 1).

**TABLEAU 1**

### **Bouturage *in vivo* de 3 Variétés Libanaises d'Amandier**

Effet du traitement en serre de boutures semi-lignifiées (SL) et lignifiées (L) avec 4 concentrations d'AIB (30 boutures par traitement). Pourcentages de boutures ayant développé de cals et de racines.

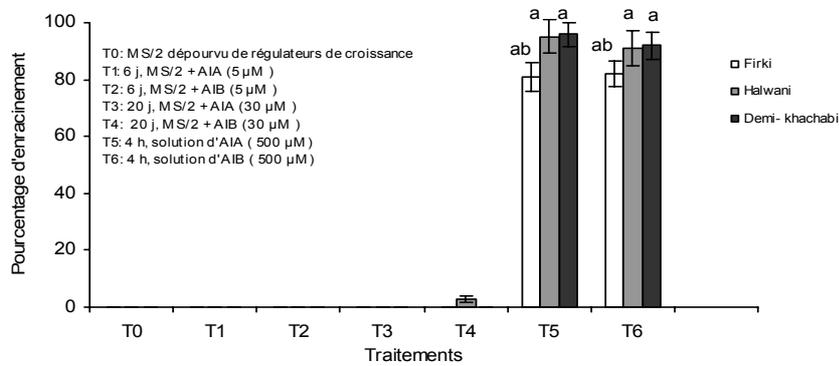
AIB $\mu$ M	Firki			Halwani				Demi-khachabi				
	Cals		Racines	Cals		Racines		Cals		Racines		
	SL	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	
0	5	8	0	0	4	8	0	0	6	3	0	0
5000	5	3	0	0	6	8	0	0	8	7	0	0
15000	4	1	0	0	5	5	0	0	4	9	0	0
25000	1	2	0	0	3	6	0	0	5	4	0	0

### **Bouturage *in vitro***

Enracinement *in vitro*. L'effet du traitement a été hautement significatif (Fig. 2), en faveur des traitements impliquant une première étape d'induction racinaire par trempage de la base des microboutures pendant 4h dans une solution très concentrée d'AIA ou d'AIB (500  $\mu$ M) avant de les transférer sur le milieu MS/2 gélosé et dépourvu de régulateurs de croissance, sous la photopériode de 16h/j. Les 3 variétés se sont comportées d'une façon

similaire et les premières racines ont commencé à apparaître dès le 8ème jour. Le taux d'enracinement, calculé au bout de 15 jours, a été relativement important variant entre 80 et 97% (Fig. 2 et 3).

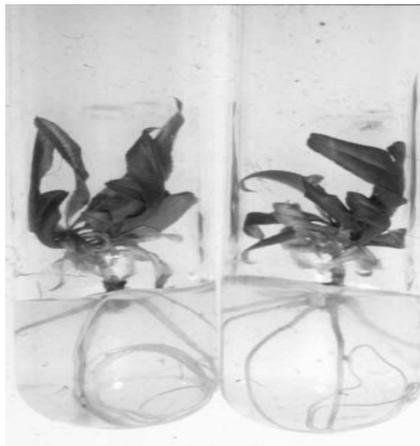
Pour les autres traitements, seul le trempage des microboutures dans une solution d'AIB (30  $\mu\text{M}$ ) pendant 20j à l'obscurité suivi de leur transfert sur MS/2 dépourvu de régulateurs de croissance a permis l'enracinement des microboutures mais avec un taux très faible ne dépassant pas 3% et ceci uniquement chez la variété Halwani. Par ailleurs, aucune plantule témoin non traitée à l'auxine n'a pu être enracinée.



**Figure 2. Effet du traitement auxinique sur le pourcentage d'enracinement de 3 variétés d'amandier.**

**Figure 2. Effet du traitement auxinique sur le pourcentage d'enracinement de 3 variétés d'amandier.**

Les histogrammes surmontés de lettres différentes correspondent à des valeurs significativement différentes au seuil de probabilité 0,05 (Test de Duncan).



**Figure 3. Exemple de microboutures racinées de la variété Halwani.**

Enracinement obtenu sur le milieu MS/2 dépourvu de régulateurs de croissance, 15 j après l'étape d'induction pendant 4h dans une solution d'AIB (500  $\mu$ M).

*Acclimatation en serre.* Dès la première semaine, environ 40% des microboutures racinées transférées en serre ont commencé à présenter un dépérissement généralisé et ceci chez les 3 variétés. La majorité des microboutures n'ayant pas survécu à ce transfert étaient de taille relativement courte, inférieure à 2,5 cm. Au bout de deux mois, le taux de reprise correspondant aux microboutures ayant présenté un bon développement végétatif a été de 60% (Tab. 2).

TABLEAU 2

**Acclimatation en Serre des Microboutures Racinées  
Résultats de Survie Relevés au Bout de 2 Mois pour 3 Variétés Libanaises d'Amandier**

Variété	Nombre de microboutures transférées en serre	Pourcentage de survie
Firki	26	69,2 a*
Halwani	22	54,5 bc
Demi-khachabi	15	53,3 bc

\* Les valeurs suivies de lettres identiques ne sont pas significativement différentes au seuil de probabilité 0,05 (Test de Duncan).

**DISCUSSION ET CONCLUSIONS**

Cette étude a permis de mettre en évidence une différence au niveau de l'aptitude au bouturage de 3 variétés libanaises d'amandier, selon les conditions *in vivo* et *in vitro* de l'induction. En serre, l'application de traitement auxinique est restée sans effet, confirmant la récalcitrance générale des variétés de cette espèce au bouturage ligneux et semi-ligneux (Grasselly et Crossa Raynaud, 1980). En revanche, dans les conditions *in vitro*, l'enracinement de ces mêmes variétés a été parfaitement réussi sous certaines conditions. Des travaux antérieurs réalisés chez d'autres espèces ligneuses ont montré que le potentiel d'enracinement n'est pas toujours dépendant d'un *stimulus* exogène d'auxine seulement, il serait également en corrélation directe avec la teneur endogène d'AIA présente à la base des boutures (Foret *et al.*, 1986; Haissig, 1986; Alvarez *et al.*, 1989). Les équilibres hormonaux endogènes du matériel utilisé pour le bouturage auraient varié selon qu'il s'agisse de rameaux prélevés au champ ou de microboutures multipliées *in vitro* pendant plusieurs subcultures et qui seraient probablement plus riches en AIA (Caboni *et al.*, 1997).

D'autre part, dans les conditions *in vitro*, le potentiel d'enracinement a été fortement lié au type de traitement (Fig. 2). En effet, seuls les chocs auxiniques appliqués pendant de courtes durées ont pu induire le développement du système racinaire. Les traitements impliquant l'incorporation de l'auxine dans le milieu de culture et rapportés dans des études antérieures pour l'enracinement des variétés occidentales d'amandier (Rugini et Verma, 1983; Caboni *et al.*, 1997) n'ont pas été favorables à l'enracinement des variétés

libanaises utilisées dans cette étude. L'aptitude à l'enracinement serait donc une caractéristique variétale, comme l'ont déjà démontré Alvarez *et al.* (1989) chez des porte-greffes de pommier, Feucht et Dausend (1976) chez des porte-greffes de cerisier et Caboni *et al.* (1997) chez des porte-greffes d'amandier.

Concernant l'acclimatation en serre des microboutures racinées, les taux de survie obtenus dans cette étude sont relativement encourageants. Toutefois, cette étape devrait être optimisée ultérieurement en étudiant les facteurs pouvant améliorer la reprise des microboutures au transfert en serre.

Enfin, le protocole d'enracinement *in vitro* mis au point au cours de cette étude et succédant à l'étape de multiplication préalablement maîtrisée chez l'amandier (résultats non présentés) sera étendu à une gamme plus large de variétés locales, dans une optique à plus long terme, d'intégrer ces techniques dans les programmes de production de masse de plants certifiés et de préservation des ressources génétiques libanaises d'amandier.

#### REMERCIEMENTS

Les auteurs adressent leurs remerciements au Conseil National de la Recherche Scientifique du Liban pour avoir contribué au financement de cette étude.

#### REFERENCES

- Alvarez, R., Nissen, S.J. & Sutter, E.G. 1989. Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured *in vitro* and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid. *Plant Physiol.*, 89: 439-443.
- Augé, R., Beauchesne, G., Boccon-Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Jalouzet, R., Minier, R., Morand, J., Reynoird, J.P., Strullu, D.G. & Vidalie, H. 1989. *La culture in vitro et ses applications horticoles*. Ed Tec & Doc-Lavoisier Paris, 225 pp.
- Caboni, E., Lauri, P., Tonelli, M.G., Lacovacci, P. & Damiano, C. 1997. Biochemical and molecular factors affecting *in vitro* rooting ability in almond. In: *Biology of Root Formation and Development*, Plenum Press, N.Y.: 117-124.
- Feucht, W., & Dausend, B. 1976. Root induction *in vitro* of easy-to-root *Prunus pseudocerasus* and difficult-to-root *Prunus avium*. *Scientia Hort.*, 4: 49-54.
- Foret, Y., Maldiney, R., Sotta, B. & Miginiac E. 1986. Rhizogenesis and auxin and abscissic acid levels in free clones of different aged *Serquoia sempervirens* (Endl.) trees. *CR Acad. Sci.*, Paris, 303: 135.
- Grasselly, C. & Crossa-Raynaud, P. 1980. *L'amandier*. Ed Maisonneuve-Larose Paris, 446 pp.
- Haissig, B.E. 1986. *Metabolic process in adventitious rooting of cuttings*. In: *New root formation in plants and cuttings*. Ed M.B. Jackson, Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht, p. 191.
- Murashige, T., & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Oukabli, A., Lansari, A., Loudiyi, W. & Abousalim, A. 2001. Effets endogamiques sur la germination et la croissance de semis du cultivar autocompatible Tuono (*Prunus dulcis*). *Fruits*, 56: 197-204.

- Rowe, J.W. 1986. *New techniques in plant tissue culture. In: Tissue culture as a plant production system for horticultural crops.* Eds R.H. Zimmerman, R.J. Griesbach, F.A. Hammerschlag and R.H. Lawson. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht: 35-45.
- Rugini, E. & Verma, D.C. 1983. Micropropagation of difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus*) cultivar. *Plant Sci. Lett.*, 28: 273-281.
- Tabachnik, L. & Kester D.E. 1977. Shoot cultures for almond and almond-peach hybrid clones *in vitro*. *Hortscience*, 12: 545-547.
- Werbrouck, S.P.O. & Debergh, P.C. 1994. Micropropagation. In: *Plant cell culture. A practical approach.* Eds R.A. Dixon and R.A. Gonzales, Oxford University Press N.Y.:127-135.

