

Maîtrise des aléas de la production in vitro et à grande échelle du pêcher- amandier GF-557

Ghorbel A., Chatibi A., Kchouk M.L., Zemni H.

X GREMPA Seminar

Zaragoza : CIHEAM
Cahiers Options Méditerranéennes; n. 33

1998
pages 139-150

Article available on line / Article disponible en ligne à l'adresse :

<http://om.ciheam.org/article.php?IDPDF=98606177>

To cite this article / Pour citer cet article

Ghorbel A., Chatibi A., Kchouk M.L., Zemni H. **Maîtrise des aléas de la production in vitro et à grande échelle du pêcher-amandier GF-557.** *X GREMPA Seminar* . Zaragoza : CIHEAM, 1998. p. 139-150 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 33)



<http://www.ciheam.org/>
<http://om.ciheam.org/>

Maîtrise des aléas de la production *in vitro* et à grande échelle du pêcher-amandier GF-557

A. Ghorbel, A. Chatibi, M.L. Kchouk et H. Zemni

Laboratoire de Biotechnologie Végétale, INRST,
BP 95, 2050 Hammam-Lif., Tunisie

RESUME - La compatibilité de l'hybride pêcher-amandier GF-557 avec les variétés peu exigeantes s'est avérée supérieure à celle du GF-677 pour lequel le risque de décollement existe. En outre, le porte-greffe GF-557 est recommandé pour l'Afrique du Nord en raison de sa résistance aux nématodes de type Méloïdogyne ainsi qu'à la chlorose ferrique. La nécessité de micropropagation massive du GF-557 s'est d'autant plus faite sentir en Tunisie que sa multiplication en Europe et aux Etats-Unis a été abandonnée au profit du GF-677. Depuis 1990, la culture *in vitro* du GF-557 à grande échelle a été entreprise au laboratoire et s'est heurtée à plusieurs obstacles, essentiellement au cours des phases de multiplication et d'acclimatation des vitroplants. Les difficultés majeures rencontrées sont dues à l'étiollement, à la vitrification et à la contamination en cours de propagation. Par contre, même si la préacclimatation n'est plus indispensable, il n'en demeure pas moins que le blocage des bourgeons apicaux et des racines, la pourriture grise du collet ainsi que la nature du substrat employé pour l'acclimatation des vitroplants, sont autant de facteurs limitants qui perturbent le calendrier de production industrielle du GF-557.

Mots-clés : Micropropagation, pêcher-amandier, GF-557.

SUMMARY - "Managing risk in *in vitro* and mass scale production of peach-almond GF-557". The compatibility of the hybrid peach-almond GF-557 with lower varieties proved to be better than that of the GF-677 for which the risk of separation exists. Moreover, the GF-557 is recommended for North Africa due to its resistance to nematodes, type *Meloidogyne*, and to iron chlorosis. The need of a large scale micropropagation of the GF-557 was evident in Tunisia as its propagation in Europe and USA had been abandoned for the benefit of the GF-677. Since 1990, the large scale *in vitro* culture of the GF-557 was undertaken in the laboratory and faced several obstacles, mainly during the stages of propagation and acclimatization of vitroplants. The major difficulties encountered were due to etiolation, vitrification and to contamination during propagation. On the contrary, even though preacclimatization was no more needed, limiting factors, such as the blockage of apical buds and roots, crown grey rot and the nature of the substrate used in acclimatization of vitroplants, disrupted the calendar for the industrial production of the GF-557.

Key words: Micropropagation, peach-almond, GF-557.

Introduction

Chez l'amandier, la multiplication végétative conforme par bouturage ligneux, semi-ligneux et herbacé, est problématique du fait essentiellement : (i) du faible pourcentage de réussite du bouturage, suite à la difficulté d'enracinement des boutures et (ii) d'une importante dissémination de maladies, d'origine fongique, bactérienne et surtout virale, par la diffusion de matériel contaminé. Ainsi, la multiplication végétative de clones, greffons ou porte-greffes, se trouve pratiquement abandonnée alors que les cultures de semis demeurent utilisées pour la production de porte-greffes (Kester *et al.*, 1986). En ce qui concerne les porte-greffes, le recours à d'autres espèces ou hybrides, notamment les hybrides pêcher-amandiers, permet d'avoir significativement de meilleurs résultats. Les principales caractéristiques recherchées chez les hybrides pêcher-amandier concernent leur capacité d'induire une grande vigueur de l'arbre, un système racinaire profond et bien ancré, une bonne résistance aux nématodes, ainsi qu'une tolérance au calcaire et si possible à d'autres sels. Mais l'avantage le plus important vient de leur grande résistance à la sécheresse, spécialement durant la récolte. De plus, l'utilisation de ces hybrides permet d'étendre la culture d'amandiers à des cultivars moins vigoureux et dans des sols peu profonds (Kester et Micke, 1992).

Dès les années quarante, plusieurs hybrides amandier-pêcher furent obtenus en France (GF-677, GF-557, etc.) et aux Etats-Unis (Hansen 2168, Hansen 536, etc.). Le GF-677 est un hybride naturel introduit en 1939 à la Grande-Ferrade (CTIFL, 1973 ; INRA, 1988), alors que l'hybride "INRA Amandier x Pêcher GF-557" fut réalisé en 1945 à la Grande Ferrade en France entre un amandier de semis (*Prunus amygdalus* Batsch.) et le pêcher "Pavie Shalil" (*Prunus persica* L. Batsch.), originaire du Pakistan (CTIFL, 1973 ; Vidaud *et al.*, 1987), grâce auquel il a été possible d'introduire la résistance aux nématodes du genre Méloïdogyne, notamment celles qui sévissent en Tunisie : *M. incongnita*, *M. javanica* et *M. arenaria* (Gautier, 1982). Outre leurs résistances à la chlorose, qui se situe entre celle du pêcher et de l'amandier, les hybrides amandier x pêcher confèrent aux arbres une vigueur élevée et, dans le cas du GF-677, une très bonne résistance à la sécheresse (Crossa-Raynaud, 1966). Le GF-557 n'a pas eu le succès escompté en Europe, du fait de sa sensibilité à l'humidité et à l'asphyxie radulaire, et se trouve généralement recommandé pour les régions chaudes de l'Afrique du Nord (Gautier, 1982). Ce porte-greffe au port dressé possède une excellente aptitude au bouturage ligneux, bien supérieure à celle du GF-677 (Vidaud *et al.*, 1987).

En Tunisie, l'hybride pêcher-amandier GF-557 est employé pour la culture du pêcher et de l'amandier ; il présente une bonne compatibilité en pépinière, nécessite un greffage tardif et résiste aux nématodes de type méloïdogyne, à la chlorose et surtout à la sécheresse. La micropropagation *in vitro* d'hybrides pêcher-amandier sélectionnés, tels que le GF-557, représente ainsi, pour la Tunisie, une méthode de choix pour l'augmentation de la production nationale d'amandiers et de pêchers (Jraïdi et Belfelah, 1992), et surtout, l'extension de cette culture aux régions semi-arides du pays.

Diverses techniques *in vitro* de multiplication à grande échelle ont été mises au point pour le GF-677 (Zuccherelli, 1979 ; Navatel, 1980 ; Kyriakidou et Pontikis, 1983) mais peu de travaux se sont intéressés au GF-557. La maîtrise de la production *in vitro* à petite échelle puis à grande échelle du GF-557 a nécessité la mise au point de milieux d'initiation et d'enracinement (Ghorbel *et al.*, 1994). Actuellement, alors que la multiplication *in vitro* du GF-557 ou du GF-677 ne pose aucune difficulté en tubes, la micropropagation de ces hybrides dans des bocaux nous expose à des contraintes majeures liées essentiellement à la perte de nombreux vitroplants au cours des phases de multiplication et d'acclimatation. Dans cette étude, les étapes d'initiation et d'enracinement étant parfaitement maîtrisées (Ghorbel *et al.*, 1994), nous nous sommes intéressés aux phases de multiplication et d'acclimatation des pêcher-amandiers GF-557 dans le but de contourner les difficultés rencontrées au cours de leur production. Les améliorations apportées pourraient contribuer efficacement à rentabiliser cette technique et inciter les industriels à promouvoir cette culture.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

Le "pêcher-amandier GF-557" est un hybride réalisé à la Grande-Ferrade (France) en 1945 entre un amandier de semis (*Prunus amygdalus*) et le pêcher "Pavie Shalil" (*Prunus persica* Batsch L.) originaire du Pakistan. Il est inscrit sous l'appellation "INRA Amandier x Pêcher GF-557" (Vidaud *et al.*, 1987). Le plant de départ est un pied-mère pêcher-amandier GF-557 certifié conforme.

Désinfection

Des baguettes de ± 20 cm sont prélevées sur le pied-mère pendant le mois de Septembre, période où le GF-557 est physiologiquement dormant. Elles sont débarrassées de leurs feuilles et nettoyées à l'eau savonnée. Elles sont ensuite frottées à l'aide d'un coton imbibé d'alcool 70° puis de Mercryl Laurylé pur. Après morcellement, les fragments contenant 4 à 5 noeuds sont trempés dans une solution d'hypochlorite de sodium à 8° Chlore additionnée de Tween 20 à 0,1% pendant 15 minutes et sous agitation continue. Enfin, trois rinçages à l'eau stérile sont effectués pour enlever toute trace d'hypochlorite de sodium. Les méristèmes sont prélevés sous loupe binoculaire et ont une taille de 0,2 à 0,5 cm.

Milieux de culture et micropropagation

Initiation

Le milieu d'initiation (Table 1) est à base de MS (Murashige et Skoog, 1962) modifié comme suit : myo-inositol (50 mg l^{-1}), Fer-EDTA Koch-Light (40 mg l^{-1}), le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3) est réduit au quart ($412,5 \text{ mg l}^{-1}$). Les hormones utilisées sont la 6-Benzylaminopurine (BAP, $0,5 \text{ mg l}^{-1}$), l'Acide indolbutyrique (AIB, $0,5 \text{ mg l}^{-1}$) et le acide gibbérellique (GA_3 , $0,1 \text{ mg l}^{-1}$). La source de carbone utilisée est le Glucose à 2%, l'agar étant à 0,7%.

Les explants sont transférés tous les 21 jours sur milieu frais, 2 fois au minimum, en prenant soin d'éliminer, à chaque transfert, les excroissances calleuses.

Les petites pousses de 2,0 cm environ, obtenues à partir des apex, ayant 1 à 4 noeuds, sont transférées sur le milieu d'établissement de culture (Table 1) à base de MS, contenant du myo-inositol à 50 mg l^{-1} , du Fer-EDTA (Koch-Light) à 40 mg l^{-1} , de la BAP à $1,0 \text{ mg l}^{-1}$, du saccharose à 2% et de l'agar à 0,8%. Une subculture de 21 jours est effectuée sur ce milieu.

Multiplication massive

Les meilleures pousses, vigoureuses et juvéniles, sont cultivées en alternance de 21 jours sur deux milieux M1 et M2 de multiplication (Table 1), et ce, afin d'éviter le phénomène d'accoutumance et de faire profiter les explants de substances minérales et organiques de nature et de concentrations variables. Ainsi, et en fonction du calendrier de production, 5 à 8 subcultures de 21 jours sont effectuées. Toutefois, si une phase d'élongation est prévue, il est préférable de faire en sorte que les pousses, après alternance des milieux M1 et M2, se retrouvent en milieu relativement pauvre en éléments minéraux (M1). La culture subséquente sur un milieu MS, plus riche, améliore la vigueur des pousses.

Elongation

Afin de préparer l'enracinement, les pousses sont isolées et repiquées sur le milieu d'élongation (Table 1) à base de MS où la balance hormonale est en faveur de l'AIB par rapport à la BAP ($0,6/0,4 \text{ mg l}^{-1}$). Cette phase, quoique facultative, permet d'obtenir des pousses vigoureuses.

Enracinement

L'induction des racines est effectuée à l'obscurité pendant 7 jours sur le milieu d'induction M3 (Table 1) contenant l'Acide α -naphthalèneacétique (ANA) à $0,5 \text{ mg l}^{-1}$. Les pousses montrant des boutons racinaires sont ensuite transférées sur le même milieu mais dépourvu d'hormones (milieu d'allongement racinaire M4, Table 1), et placées dans la chambre de culture avec une photopériode de 12 heures. Pendant cette phase, il est préférable de réduire la concentration en agar afin de faciliter ultérieurement le transfert des vitroplants en serre.

Acclimatation

Dans chaque compartiment de serre, les tables servant de support sont préalablement lavées à l'eau de javel, puis tout le compartiment est pulvérisé avec un mélange insecticide (Karaté-Biomate) et fongicide (Rovral à $1,5 \text{ g l}^{-1}$). Ainsi, durant toute la suite de l'acclimatation, aucun insecticide n'a été utilisé car aucune attaque d'insectes n'a été constatée. Un ombrage double est préparé sur le toit de la serre et au niveau des mini-tunnels.

Table 1. Culture *in vitro* du GF-557. Milieux utilisés et conditions de culture

Phase <i>in vitro</i>	GF-557	Hormones	
INITIATION			
Origine explants	Matériel dormant, apex méristématiques 0,2-0,5 cm		
Milieu de culture	MS* : myo-inositol 50 mg l ⁻¹ ; Fer : 40 mg l ⁻¹ ; NH ₄ NO ₃ (MS/4) ; Glucose..... 2,0% Agar..... 0,7%	BAP AIB GA ₃	0,5 mg l ⁻¹ 0,5 mg l ⁻¹ 0,1 mg l ⁻¹
Conditions de culture	2 subcultures (minimum) de 21 jours T : 25±2°C ; L : 12 W m ⁻² ; P : 12 h		
ETABLISSEMENT			
Origine explants	Pousses bien différenciées ≥2 cm ; 1-4 noeuds		
Milieu de culture	MS* : myo-inositol 50 mg l ⁻¹ ; Fer : 40 mg l ⁻¹ ; Saccharose 2,0% Agar..... 0,8%	BAP	1,0 mg l ⁻¹
Conditions de culture	1 subculture de 21 jours T : 25±2°C ; L : 12 W m ⁻² ; P : 12 h		
MULTIPLICATION			
Origine explants	Pousses vigoureuses		
Milieu de culture	Alternance de 2 milieux M1 et M2 : M1 M2 QL MS* NH ₄ NO ₃ - NaH ₂ PO ₄ - 90,0 mg l ⁻¹ BAP 0,6 mg l ⁻¹ 0,3 mg l ⁻¹ IBA 0,2 mg l ⁻¹ 0,1 mg l ⁻¹ Fer : 20 mg l ⁻¹ ; organiques : MS ; saccharose 3% ; agar : 0,8% ; pH : 5,6		
Conditions de culture	Transfert après 21 jours. 5-8 subcultures ; T : 25±2°C ; L : 12 W m ⁻² ; P : 12 h		
ELONGATION			
Origine explants	Préparation à l'enracinement, facultative Pousses isolées		
Milieu de culture	MS Saccharose 3,0% Agar..... 0,8% pH..... 5,6	BAP AIB	0,4 mg l ⁻¹ 0,6 mg l ⁻¹
Conditions de culture	1 subculture 21 jours		
ENRACINEMENT			
<i>Induction</i>			
Origine explants	Pousses ≥1,5 cm		
Milieu de culture (milieu M3)	MS* (NH ₄ NO ₃ : ¼ MS) Saccharose 3,0% Agar..... 0,7%	ANA	0,5 mg l ⁻¹
Conditions de culture	7 jours obscurité T : 25±2°C		
<i>Croissance racines</i>			
Origine explants	Pousses montrant des boutons racinaires		
Milieu de culture (milieu M4= M3 dépourvu d'hormones)	MS* (NH ₄ NO ₃ : ¼ MS) Saccharose 3,0% Agar..... 0,6%		
Conditions de culture	T : 25±2°C ; L : 12 W m ⁻² ; P : 12 h Transfert en serre contrôlées		

Quatre traitements fongicides ont été alternativement employés :

(i) Prévicur N (propamocarbe HCl). C'est un antipithiacées, il attaque plusieurs champignons du sol et notamment les *Pithium*, *Phytophthora* (agents de la pourriture du collet, de la fonte de semis). La concentration utilisée est de 1,5 cc l⁻¹.

(ii) Cryptonol (oxyquinoléine) à 100 cc/hl. Utilisé contre *Sclerotinia*, *Rhizoctonia*.

(iii) Ronilan (vinchlozoline) Utilisé contre les pourritures du collet du genre *Botrytis* et *Sclerotinia*, à une concentration de 1,0 à 1,5 g l⁻¹.

(iv) Sumisclex (procymidone) Utilisé à 0,5 à 1,0 g l⁻¹.

Les plantules obtenues *in vitro* passent directement, sans préacclimatation, à la serre d'acclimatation. Elles sont d'abord lavées et débarrassées de leur gélose, puis repiquées dans des pots individuels contenant 100% de tourbe (Greenworld). La tourbe est préalablement humidifiée avec le Prévicur N à la dose de 1,5 cc l⁻¹. Le même traitement fongicide est appliqué sur les racines, par trempage, et sur les feuilles, par pulvérisation, pour maintenir une humidité saturante, ce qui permet également d'irriguer les pots. L'opération de repiquage est effectuée entièrement sous tunnel, et les plantes demeurent hermétiquement protégées pendant 10 jours l'hiver, 5 à 6 jours au printemps. A ce stade, il est important d'éviter de couper les racines avant le repotage et l'usage de mini-serres est indispensable.

Par la suite, l'irrigation est effectuée tous les 5 jours. Entre deux irrigations : un léger binage des pots est souvent nécessaire pour éviter l'asphyxie due à l'arrosage. Au bout de quatre semaines, l'engrais foliaire Set peut être employé. Il est à base de Calcium, et est administré dans l'eau d'irrigation en même temps que le fongicide.

Après 1 mois, les plantes sont transférées vers un abri-serre où la température et l'humidité sont moins contrôlées. La durée de la phase d'acclimatation varie de 3 mois, en hiver, à un mois et demi au printemps.

Conditions de culture

Le pH des milieux de culture est ajusté à 5,6, par addition d'acide chlorhydrique HCl (1N) ou d'hydroxyde de potasse KOH (1N), avant autoclavage à 116°C pendant 24 minutes. Les bocaux de culture vides subissent un autoclavage de deux heures à 116°C. Après ensemencement sous la hotte à flux laminaire, à raison de 10 pousses (phase de multiplication) à 20 (phase d'enracinement) par bocal, les flacons sont placés dans la chambre de culture sous une intensité lumineuse de 15 W m⁻² (≈3 000 Lux) assurée par des tubes fluorescents. La photopériode est de 12 heures. La température est de 25±2°C.

Résultats et discussion

Etablissement de la culture

Le milieu d'initiation du GF-557, est un milieu à base de GA₃ à 0,1 mg l⁻¹, de BAP à 0,5 mg l⁻¹ et d'ANA à 0,5 mg l⁻¹. Le rapport auxinique est ainsi maintenu égal à 1, alors que l'acide gibbérellique est cinq fois moindre. La réduction du myo-inositol à 50 mg tient compte du fait que, dans les méristèmes, on a affaire à des cellules plutôt qu'à des organes. Ce milieu, dans nos conditions, a fait déjà ses preuves aussi bien avec le pistachier (Chatibi *et al.*, 1995) que l'artichaut (Bayouhd, 1995), ainsi que d'autres espèces fruitières et ornementales. L'utilisation d'apex méristématiques de 0,1 à 0,2 mm permet d'obtenir des plants sains indemnes de virus (Ghorbel *et al.*, 1994). Toutefois, cette phase est excessivement longue (deux mois) et nécessite au minimum deux subcultures, et un nombre très important de méristèmes en considérant le faible taux de croissance.

Une fois les méristèmes développés, deux subcultures de 21 jours sont nécessaires avant la multiplication. Dans le milieu d'établissement, le glucose est remplacé par le saccharose, alors que le GA_3 et l'AIB sont écartés. Seule la BAP à $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ est maintenue. Dans le cas d'initiation à partir de boutures, la concentration de BAP est doublée (Ghorbel *et al.*, 1994).

Durant ces deux phases, initiation et établissement des cultures, la concentration en Fer chélaté (Fe-EDTA) est doublée à 40 mg l^{-1} . Comme pour le GF-677 (Kyriakidou et Pontikis, 1983), cette augmentation est bénéfique pour le GF-557 qui s'est montré très sensible aux doses en Fer.

Multiplication

Au cours de cette phase, un certain nombre de problèmes peuvent surgir tels que la vitrification et le jaunissement des plants. Ces difficultés peuvent en grande partie être résolues par la culture alternée sur deux milieux M1 et M2, qui diffèrent quant à la concentration des éléments minéraux et des substances de croissance. Dans le milieu M2 (Table 1), la richesse en éléments minéraux du milieu de base MS est contrebalancée par des concentrations réduites en BAP ($0,3 \text{ mg l}^{-1}$) et en AIB ($0,1 \text{ mg l}^{-1}$). Dans le milieu M1, les éléments minéraux QL (Quoirin et Lepoivre, 1977) sont réduits alors que les concentrations hormonales sont doublées. Ainsi, l'alternance de quantités d'éléments minéraux, tantôt réduite, tantôt riche, est accompagnée d'une alternance inverse des quantités en hormones de croissance. Ce double "dénivellement", minéral et hormonal, empêche l'accoutumance des vitropousses au milieu de culture et favorise la croissance massive du GF-557 (Fig. 1). De plus, le verdissement des plants est maintenu.



Fig. 1. Multiplication à grande échelle du GF-557 sur le milieu de culture M1 et/ou M2.

La réduction de substances minérales, et notamment en macroéléments, a été également utilisée chez le GF-677 (Kyriakidou et Pontikis, 1983 ; Navatel, 1980), Table 2. Toutefois, dans nos conditions de culture, le taux de multiplication du GF-557 est limité à 3, car au-delà de ce seuil, et à l'inverse du GF-677, où le taux de multiplication peut aller jusqu'à 10, la croissance du GF-557 est plutôt axillaire, ce qui affecte sensiblement la vigueur des plants.

Au cours de cette phase, la vitrification des pousses est assez courante (Fig. 2). Plusieurs hypothèses tentent d'expliquer ce phénomène et certains auteurs se sont penchés sur les moyens de prévention (Navatel, 1982) sans toutefois qu'il y ait réellement une "recette" standard. Il faut cependant maîtriser l'excès en eau dans le milieu de culture soit par l'augmentation de la quantité d'agar dans le milieu, soit par l'utilisation de milieux en "inclinaison" dans les bocaux de culture. La réduction de la densité de plants dans les bocaux pourrait également être une alternative positive.

Table 2. Milieux de culture *in vitro* des hybrides pêcheur-amandier GF-677 et GF-557

	MS			Zuccherelli (1979) GF-677			Navatel (1980) GF-677			Ghorbel et al. (1994) GF-557						
	Etabl.	Prolif.	Elong.	Racines Induc.	Etabl.	Prolif.	Racines Induc.	Etabl.	Prolif.	Racines Induc.	Init.	Etabl.	Prolif.	Elong.	Racines Induc.	Croiss.
Macroéléments																
NH ₄ NO ₃	MS	MS	MS	MS	MS	1 000	1 000	1 000	1 000	MS/4	MS	QL	MS/4	MS/4	M3	M4
KNO ₃	MS	MS	MS	MS	MS	1 000	1 000	1 000	1 000	MS	MS	400	MS	MS/4	MS	MS
CaCl ₂	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	1 800	MS	MS	MS	MS
MgSO ₄	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	3 600	MS	MS	MS	MS
KH ₂ PO ₄	MS	MS	MS	MS	MS	260	260	260	260	MS	MS	2 700	MS	MS	MS	MS
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	MS	MS	MS	MS	MS	165	165	165	165	MS	MS	200	MS	MS	MS	MS
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O						65	65	65	65	90,00	90,00					
KCl																
Microéléments																
KI	MS	MS	MS	MS	MS	0,01	MS	MS	MS	MS	MS	0,01	MS	MS	MS	MS
H ₃ BO ₃	MS	MS	MS	MS	MS	1,0	MS	MS	MS	MS	MS	1,0	MS	MS	MS	MS
MnSO ₄ H ₂ O	MS	MS	MS	MS	MS	10,0	5,7	5,7	5,7	MS	MS	10,0	MS	MS	MS	MS
ZnSO ₄ 7H ₂ O	MS	MS	MS	MS	MS	1,0	5,54	5,54	5,54	MS	MS	1,0	MS	MS	MS	MS
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	MS	MS	MS	MS	MS	0,37	0,37	0,37	0,37	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
CuSO ₄ 5H ₂ O	MS	MS	MS	MS	MS	3,0	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
CoCl ₂ 6H ₂ O	MS	MS	MS	MS	MS	0,03	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
AlCl ₃						0,03										
NiCl ₂ 6H ₂ O						0,03										
FeCl ₃ 6H ₂ O						1,0										
Fe-EDTA	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	2xMS	2xMS	MS	MS	MS	MS	MS
Myo-inositol	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	50,00	50,00	MS	MS	MS	MS	MS
Vitamines	MS	MS	MS	MS	MS	MS	Walkey (1972)			MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS
BAP	0,7	0,7	0,1	0,1	0,06	0,5	0,2	0,2	0,5	1,0	1,0	0,6	0,3	0,4		
AIB					1,0	0,2	0,2	0,2	0,5			0,2	0,1	0,6		
GA ₃	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2			0,1							
ANA	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1										0,5	
Saccharose	3%	3%	3%	3%	3%	2%	3%	3%	2%	2%	2%	3%	3%	3%	3%	3%
Glucose										2%	2%					

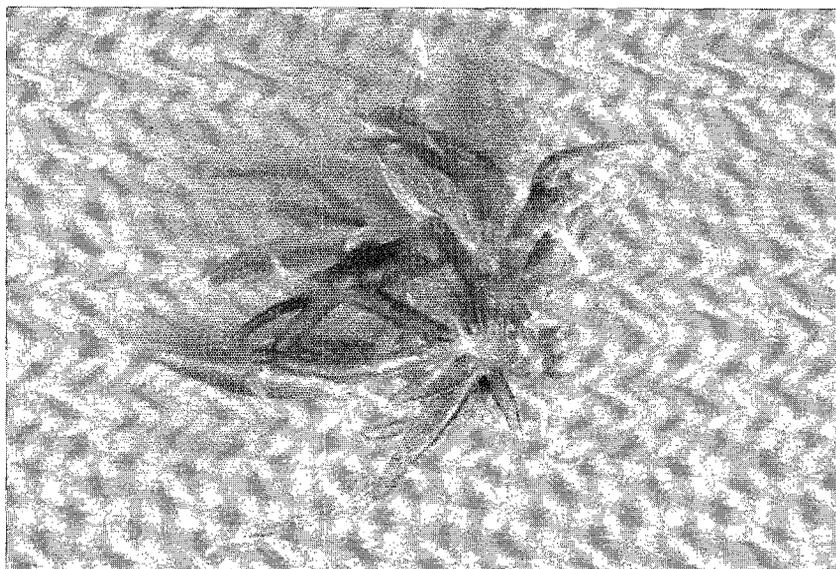


Fig. 2. Vitropousses vitrifiées de GF-557 pendant la phase de multiplication.

En ce qui concerne les pratiques culturales au cours de la multiplication, il est important également d'éclater les souches à chaque repiquage et de maintenir la même technique de découpage tout au long de la prolifération. La taille et les coupes des vitropousses doivent aussi être surveillées afin de sauvegarder leur qualité.

Enfin, si l'on prévoit une phase d'élongation, il est préférable de s'arranger pour qu'à la fin de la phase de multiplication les plants soient sur milieu pauvre en éléments minéraux (milieu M1 à base de QL). Ainsi, au cours de la phase d'élongation, on pourra fournir un milieu MS bien fourni qui maintiendra la vigueur des pousses et les préparera à l'enracinement. Cette étape favorise l'allongement du bourgeon terminal aux dépens des axillaires. Bien que souvent indispensable, la phase d'élongation pourrait toutefois s'avérer coûteuse, à moins que l'on évite d'éclater les souches au moment du dernier passage.

Enracinement

A l'inverse du GF-677 (Kyriakidou et Pontikis, 1983 ; Zuccherelli, 1979 ; Navatel, 1980), Table 2, l'enracinement du GF-557 nécessite une phase d'induction d'une semaine à l'obscurité en présence d'ANA à $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, car, pour le GF-557, l'utilisation de l'AIB ne donne pas de bons pourcentages d'enracinement, comme suggéré par Kester *et al.* (1986) pour l'amandier et les hybrides pêche-amandier. Le meilleur pourcentage d'enracinement obtenu, en utilisant de l'AIB comme auxine dans le milieu de culture, ne dépasse pas 60%, alors que, dans les mêmes conditions l'ANA donne 96% (Ghorbel *et al.*, 1994), Fig. 3. Par ailleurs, lorsque la concentration en ANA est égale à $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, et en dépit du fait que le pourcentage d'enracinement avoisine les 100%, que ce soit à la lumière ou à l'obscurité, l'apparition de racines demeure plus rapide à l'obscurité. En outre, lorsque la phase d'enracinement se déroule en lumière continue, les racines sont courtes, très épaisses et présentent des signes d'oxydation. De même, la diminution de la lumière permet d'éviter le jaunissement des pousses suite au dégagement d'éthylène après blessure. Cependant, il faut noter que la qualité des pousses peut être légèrement affectée à l'obscurité en raison de leur étiolement, toutefois cette manifestation est réversible dès le passage à la lumière.

L'auxine est donc plus active lorsque les plantules séjournent pendant 7 jours à l'obscurité. Le passage ensuite sur milieu M4 dépourvu d'hormones élimine toute rétroinhibition par les auxines (Mosella *et al.*, 1980 ; Rugini et Verma, 1982 ; Gaspar, 1988). Cette étape d'enracinement, était fondamentale pour la suite de nos travaux concernant la reprise en terre des vitroplants, car, l'obtention d'un système racinaire développé pourrait lever toute ambiguïté quant à la reprise des plants en serre d'acclimatation.

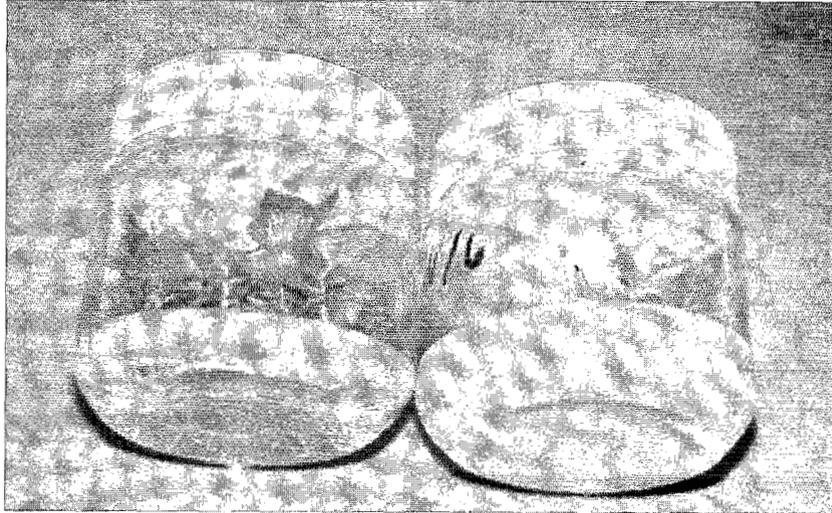


Fig. 3. Enracinement du GF-557 sur milieux de culture contenant l'ANA à $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (à gauche) et l'AIB à $0,6 \text{ mg l}^{-1}$ (à droite).

Il est important de signaler, qu'au cours de l'enracinement, des problèmes de contamination bactérienne peuvent surgir (Fig. 4) et réduire de ce fait le nombre de plants racinés.

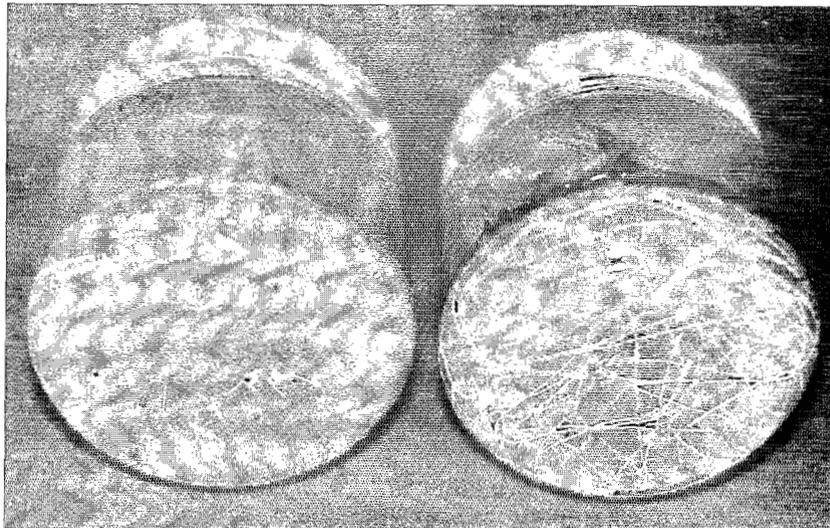


Fig. 4. Qualité de l'enracinement du GF-557 sur milieu de culture riche en ANA ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$) en absence (à droite) et en présence (à gauche) de bactéries exogènes.

Acclimatation

C'est l'étape la plus délicate, car les meilleures souches sorties du laboratoire peuvent subir d'énormes dégâts au cours de l'acclimatation, et, il s'avère que, même en partant de souches prêtes à la multiplication, il est possible de réussir parfaitement la culture *in vitro*, mais de tout perdre à l'acclimatation. En règle générale, les pertes les plus sensibles ont été remarquées en serre, deux à trois semaines après transfert des plantules sur substrat. Elles commencent d'abord par flétrir puis se nécrosent, laissant des signes indicateurs de la pourriture du collet et des lésions sur la tige.

Ainsi, nos efforts se sont-ils concentrés sur les traitements antiparasitaires plutôt que de passer par une phase de préacclimatation à l'extérieur des chambres de culture, telle que préconisée antérieurement (Ghorbel *et al.*, 1994), et qui, de ce fait, n'est plus nécessaire (Fig. 5). Les quatre traitements cités ci-dessus sont utilisés continuellement de manière alternée afin d'éliminer toute possibilité de croissance fongique. Par ailleurs, les traitements insecticides de l'enceinte d'acclimatation sont effectués préalablement avant toute entrée des pots en serre.

L'autre problème majeur de l'acclimatation demeure le blocage de la croissance des plants en serre. Dans nos conditions, la solution à ce problème est tributaire des conditions qui y règnent. Il est particulièrement important : (i) de maintenir la température ambiante à $20\pm 2^{\circ}\text{C}$; (ii) de maintenir une humidité saturante par l'usage de mini-tunnels ; (iii) d'utiliser un substrat de qualité et (iv) d'éviter l'acclimatation durant les mois chauds de l'année.

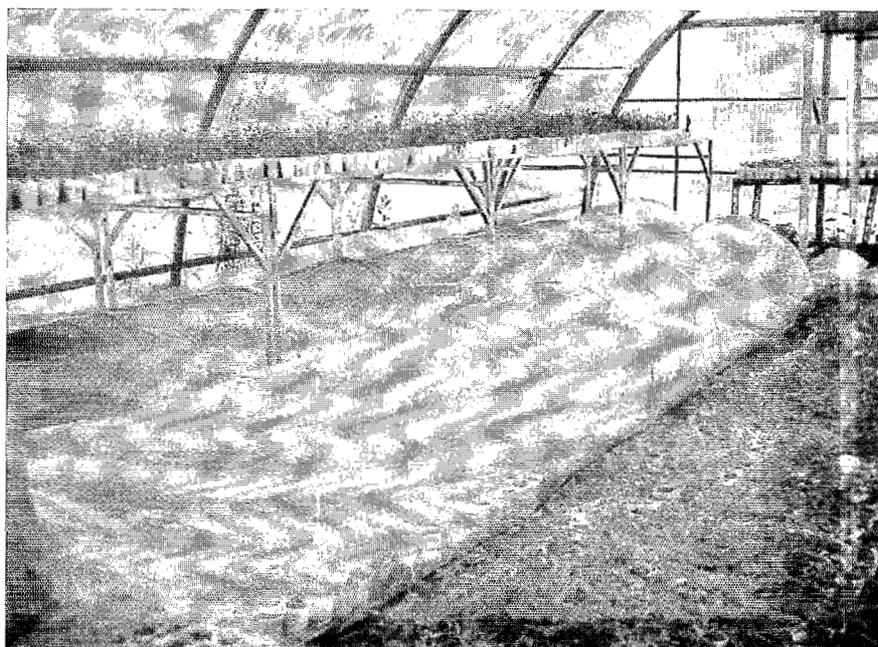


Fig. 5. Acclimatation du GF-557 en serre contrôlée. La réussite des étapes de sevrage (mini-tunnel) et d'endurcissement exige un suivi draconien.

Conclusions

La micropropagation du GF-557, entamée depuis 1990 (Ghorbel *et al.*, 1994), nous a permis de mettre au point certains milieux de culture *in vitro*, notamment pour les phases d'intitiation et d'enracinement. Toutefois, le respect d'un calendrier de production impose des contraintes supplémentaires et il est notamment impératif, en Tunisie, de ne pas dépasser le mois de Mars, pour la livraison des vitroplants, afin de permettre aux pépiniéristes de greffer dans l'année. Ainsi, aux problèmes de culture *in vitro* proprement dits, les obligations industrielles nous ont amenés à réviser la technique de culture *in vitro* du GF-557. Il nous est apparu que les phases de multiplication et d'acclimatation peuvent être très sensiblement améliorées. En effet, la pratique de l'alternance, aussi bien de milieux de multiplication appropriés au cours de la phase de prolifération intense, et en particulier le doublement de la concentration en oligoéléments, ainsi que l'alternance des traitements antifongiques au cours de l'acclimatation, permettent de résoudre la majeure partie des problèmes rencontrés (vitrification, jaunissement des pousses, nécroses, etc.). De plus, une surveillance stricte des pratiques de laboratoires (taillages, coupes des vitropousses) contribuent indubitablement, non seulement à l'obtention de pousses vigoureuses, mais surtout à résorber les coûts de production puisqu'il est possible de stocker des vitroplants de GF-557 à 0°C pendant 6 à 8 mois.

Références

- Bayoudh, C. (1995). *Morphogenèse in vitro de l'artichaut (Cynara scolymus L.)*. Mémoire de DEA, Université de Tunis II, p. 100.
- Chatibi, A., Kchouk, M.L., Ben Abdallah, F., Zemni, H. et Ghorbel, A. (1995). Rooting improvement of *Pistacia vera* L. cv. Mateur by *in vitro* culture of apices and cuttings. *Acta Horticulturae*, 419 : 213-219.
- Crossa-Raynaud, P. (1966). *Les réactions des variétés de pêches aux différentes conditions du milieu écologique*. Congrès du Pêcher, Vérone, Italie, 20-24 juillet 1965. Document Technique No. 18, sept. 1966, INRA, Tunisie.
- CTIFL. (1973). *Porte-greffes des espèces Pêcher, Prunier, Abricotier, Cerisier, Amandier, Poirier, Pommier*. CTIFL-Documents No. 37, pp. 1-6.
- Gaspar, T. (1988). Aspects physiologiques de l'organogenèse *in vitro*. Dans : *Culture de cellules, tissus et organes végétaux*. Presses Polytechn., Romandes, Suisse.
- Gautier, M. (1982). Le pêcher et sa culture (1^{ère} partie). *Arboriculture Fruitière* No. 340, pp. 49-58.
- Ghorbel, A., Chatibi, A., Mliki, A., Kchouk, M.L. et Zemni, H. (1994). Propagation *in vitro* du pêcher-amandier GF-557. Dans : *Quel Avenir pour l'Amélioration des Plantes?* Aupelf-Uref (eds). pp. 263-274.
- INRA. (1988). Inra amandier x pêcher GF-677 : porte-greffe de plusieurs espèces d'arbres fruitiers à noyau. *Arboriculture Fruitière*, No. 407, juin 1988.
- Jraidi, B. et Belfelah, Z. (1992). Technique de bouturage ligneux des hybrides pêcher x amandier. Dans : *Agriculture. Amélioration Génétique de Deux Espèces de Fruits Secs Méditerranéens : l'Amandier et le Pistachier*, VIII^e Colloque GREMPA, Nîmes, France, 26-27 juin 1990, Grasselly, C. (ed.). pp. 255-258.
- Kester, D.E., Liu, L., Fenton, C.A.L. et Durzan, D.J. (1986). Almond [*Prunus dulcis* (Miller) D.A. Webb]. Dans : *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol 1. Trees I*. Bajaj, Y.P.S. (ed.). pp. 414-430.
- Kester, D.E. et Micke, W.C. (1992). Almond rootstock research in California. Dans : *Amélioration Génétique de Deux Espèces de Fruits Secs Méditerranéens : l'Amandier et le Pistachier*, VIII^e Colloque GREMPA, Nîmes, France, 26-27 juin 1990, Grasselly, C. (ed.). pp. 251-254.
- Kyriakidou, R. et Pontikis, C.A. (1983). Propagation of peach-almond hybrid GF-677 *in vitro*. *Plant Propag.*, 29 : 13-14.
- Mosella, C.L., Macheix, J.J. et Jonard, R. (1980). Les conditions du microbouturage *in vitro* du pêcher (*Prunus persica* Batsch.) : Influences combinées des substances de croissance et de divers composés phénoliques. *Physiol. Vég.*, 18 : 597-608.
- Murashige, T. et Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.*, 15 : 473-497.
- Navatel, J.C. (1980). *Production de l'amandier-pêcher INRA GF-677, porte-greffe du pêcher, par multiplication in vitro*. CTIFL Service Amélioration de la Production, 491 : 1-9.
- Navatel, J.C. (1982). Problèmes liés à la production de porte-greffes d'arbres fruitiers par multiplication *in vitro*. *Fruits*, 37(5) : 331-336.
- Quoirin, M. et Lepoivre, P. (1977). Etude des milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, 78 : 437-442.

- Rugini, E. et Verma, D.C. (1982). Micropropagation and cell suspensions of a difficult to propagate almond (*Prunus amygdalus* Batsch.) cultivar. Dans : *Plant Tissue Culture*. Fujiwara, A. (ed.). Maruzen, Tokyo, pp. 741-742.
- Vidaud, J., Jacoutet, I. et Thiveno, J. (1987). Le pêcher : Références et techniques. CTIFL, pp. 445.
- Walkey, D.G.A. (1972). Production of apple plantlets from axillary bud meristems. *Can. J. Plant Sci.*, 52 : 1085-1087.
- Zuccherelli, G. (1979). Moltiplicazione *in vitro* dei portainnesti clonali da pesco. *Frutticoltura*, 41 : 15-20.