

Propagation in vitro de l'amandier (*Prunus amygdalus* Batsch) / L. Chalak et W. Chamoun. — Extrait de : Annales de recherche scientifique. — N° 3 (2001), pp. 93-101.

Bibliographie. Figures.

I. Amandier — Liban. II. Multiplication végétative — Liban.

Chamoun, W.

PER L1049 / FA125713P

PROPAGATION *IN VITRO* DE L'AMANDIER (*Prunus amygdalus* Batsch)

L. CHALAK¹, et W. CHAMOUN²

¹ Institut de Recherches
Agronomiques du Liban,
Unité de culture de tissus, Tal Amara

² Université Saint-Esprit Kaslik, Faculté
des Sciences Agronomiques

RÉSUMÉ

*Dans le but de produire des plants d'amandier de qualité via la culture **in vitro**, ce travail a consisté en une mise au point technique des différentes phases de micropropagation chez 2 variétés locales d'amandier, Halwani (H2) et Demi-Khachabi (B1).*

Des cultures ont été établies à partir de nœuds prélevés sur des rameaux de l'année sur 5 milieux différents par la composition en macro-éléments et contenant tous BAP (1mg/l) et AIB (0.01mg/l). L'enracinement des plantules a été expérimenté par 7 traitements se distinguant les uns des autres par le mode d'induction et le type d'auxine utilisée.

*Les taux de reprise, estimés un mois après la mise en culture, ont été de 43% et 81% chez H2 et B1 respectivement. La multiplication des plantules a été favorisée par le milieu contenant les macro-éléments de Lepoivre (QL), avec toutefois un coefficient de multiplication ne dépassant pas 3 au bout de la 2^{ème} subculture. Seuls les 2 traitements et comprenant une phase d'induction à l'obscurité sous l'action de l'AIA ou l'AIB, suivie du transfert des plantules sur le milieu QL dépourvu d'hormones, ont permis l'enracinement des plantules avec un taux dépassant 90% pour les 2 variétés. Ces résultats incitent à développer les techniques de culture **in vitro** chez l'amandier pour la production directe de plants racinés de différentes variétés locales sans passer par le greffage.*

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 par 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 (Chalak, 1999).

La culture est essentiellement localisée dans les zones situées à partir de 300 m à 1500 m d'altitude (Talhok et *al.*, 2000). Cependant, la production locale d'amandier estimée à 9 % des productions fruitières libanaises est loin de satisfaire les besoins de la consommation locale, avec l'importation en moyenne de 11 570 t/an d'amandes décortiquées. Actuellement, le Nord du Liban occupe la première place suivi par la Békaa et le Mont-Liban (Ministère de l'Agriculture Libanais, 1997).

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 ; Chalak, 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 locales.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal mis en culture

Notre choix a porté sur 2 variétés d'amandier très répandues dans la Békaa:

- Halwani double amandon (H2) : à floraison tardive (début mars), coque tendre, forme oblongue de l'amande et elliptique de l'amandon.
- Demi-khachabi (B1) : à floraison tardive (à partir de 15 mars), coque demi-tendre, amande cordiforme et amandon effilé aux 2 extrémités.

2. Etablissement des cultures à partir de nœuds

Des rameaux de l'année sont récoltés à la fin du mois de mars, sur des arbres en bon état sanitaire (ne présentant pas de symptômes de virose). Suite à la désinfection des rameaux par une solution de chlorox (Cl 52.5 g/l) diluée à 20%, des fragments de 1 – 1,5 cm portant chacun un seul bourgeon axillaire sont mis en culture 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 ont été expérimentés, contenant tous la même composition en saccharose, vitamines, substances organiques, et régulateurs de croissance. Ces milieux ont différencié les uns des autres par la composition en macro-éléments, selon les formules de MS (Murashige et Skoog, 1962), MSM (Rodriguez et al., 1990), QL (Quoirin et Lepoivre, 1977), WPM (Lloyd et McCown, 1981), DKW (Driver et Kuniyuki, 1984). Ces différences ont porté sur la concentration totale en ions et plus particulièrement sur la teneur en azote, potassium, magnésium et phosphore. 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/l), 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.

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. Cette opération de subculture est répétée tous les mois.

Le coefficient de multiplication est estimé au bout de chaque subculture par la formule:
$$\frac{\text{nombre de pousses obtenues en fin de subculture.}}{\text{nombre de pousses initiales}}$$

4. Enracinement

Sept traitements ont été expérimentés chez la variété H2 en se basant sur le milieu contenant les macro-éléments QL (Quoirin et Lepoivre, 1977) dilués de moitié et les micro-éléments MS (Murashige et Skoog, 1962) également dilués de moitié. 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 ont été repiquées sur le milieu gélosé dépourvu d'hormone et placées directement dans les conditions de la salle de culture sous une photopériode de 16h/j.

Traitements T1 – T2

Les plantules ont été directement repiquées sur le milieu gélosé additionné de 0,5 mg/l d'AIA pour T1 et d'AIB pour T2. Elles ont été ensuite placées à l'obscurité pendant 6j avant d'être mises sous la photopériode de 16 h/j.

Traitements T3 – T4

Les plantules ont subi une première étape d'induction à l'obscurité pendant 4 h sur un milieu liquide additionné de 100 mg/l d'AIA pour T3 et d'AIB pour T4. Elles ont été ensuite transférées sur le même milieu gélosé mais dépourvu d'hormones et placées à l'obscurité totale pendant 6 j avant d'être mises sous la photopériode de 16 h/j.

Traitements T5 – T6

Les plantules ont subi une première étape d'induction à l'obscurité pendant 20 j sur le milieu gélosé additionné de 6 mg/l d'AIA pour T5 et d'AIB pour T6 et transférées ensuite sur le même milieu gélosé mais dépourvu d'hormone sous la photopériode de 16 h/j.

Les résultats ont été statistiquement analysés suivant le programme SAS (Statistical Analyse System).

RÉSULTATS 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, s'est rapidement heurtée (à partir de 24h après la mise en culture) à des oxydations et des infections bactériennes et mycéliennes, entraînant la mort des explants atteints (Tableau 1). C'est la variété B1 qui a présenté le taux de survie le plus important soit 81.47 donnant des plantules parfaitement développées.

Par ailleurs, le débourrement des nœuds a été obtenu sur l'ensemble des milieux testés avec des taux relativement comparables.

Tab. 1: Pourcentage de survie des nœuds des variétés H2 et B1 après désinfection, estimé un mois après la mise en culture.

Variété	Nombre de bourgeons mis en culture	Pourcentage de bourgeons			
		tués par oxydation	tués par champignon	tués par bactéries	survivants
H2	200	8.50	48.4	0.00	43.10
B1	62	0.88	15.0	2.65	81.47

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 QL s'est distingué des 4 autres par sa concentration totale élevée en ions (156 μmol) et plus particulièrement en PO_4^{3-} (0.26 méq/l).

Le coefficient de multiplication des plantules régénérées a été examiné tout le long de 4 subcultures. Pour La variété H2, le coefficient de multiplication n'a pas été significativement différent d'un milieu à l'autre (Figure 1). 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 (Figure 2).

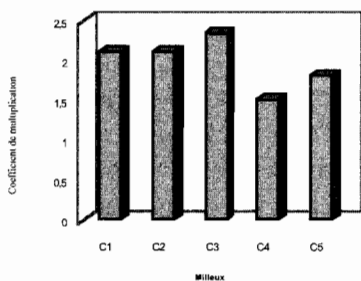


Fig. 1: Effet du milieu sur le coefficient de multiplication durant les 4 subcultures, chez la variété H2

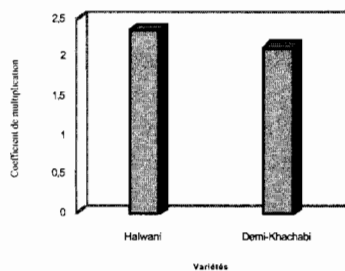


Fig. 2: Effet de la variété sur le coefficient de multiplication sur le milieu C3, les 4 subcultures confondues

L'effet de la subculture a été significatif entre le génotype H2 et B1 aux taux de 0.05 %. 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 3).

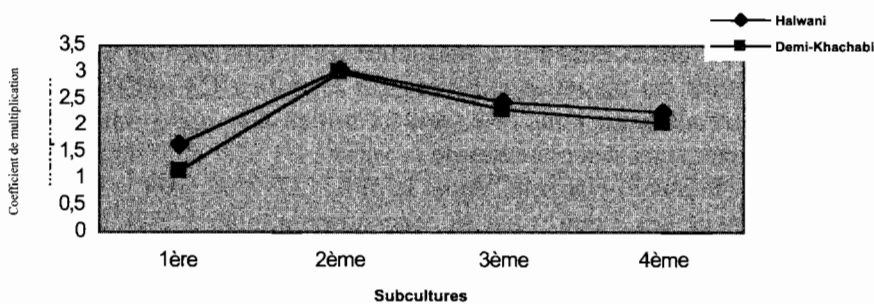


Fig. 3: Effet de la subculture sur l'évolution du coefficient de multiplication obtenu chez les 2 variétés, sur le milieu C3

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.

3. Enracinement

L'effet du traitement chez la variété H2 a été hautement significatif au taux de 0.01 % en faveur de T3 et de T4. En effet, ces 2 traitements ont favorisé le développement racinaire dès le 8ème jour (figure 4). 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 par la suite 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.

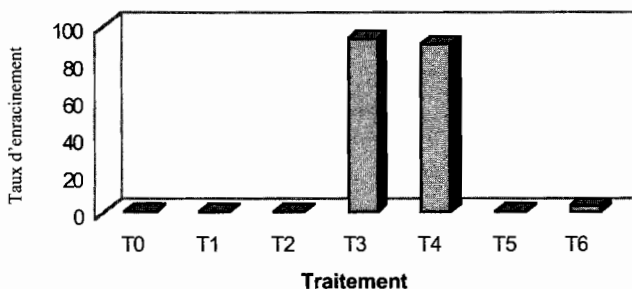


Figure 4: Effet du traitement sur le taux d'enracinement chez la variété H2.

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. De tels traitements n'ont pas été rapportés auparavant pour l'enracinement des variétés d'amandier, qui présentent généralement une récalcitrance à l'enracinement (Hammerschlag, 1981; Rugini et Verma, 1982).

Toutefois, certains travaux ont décrit l'enracinement de la variété Ferragnès grâce à l'addition au milieu de culture de NAA ou AIB (1 mg/lit) avec un taux ne dépassant pas 55 % (Rugini et Verma, 1982). Ce taux reste nettement plus faible que celui obtenu dans cette étude.

CONCLUSION

Cette étude portant sur les différentes phases de propagation *in vitro* de l'amandier, a fait état pour la première fois chez des variétés libanaises, de l'enracinement avec des taux particulièrement élevés. Au total 230 plantules racinées ont été obtenues et 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.

Toutefois, pour développer la technique de propagation *in vitro* de l'amandier, il serait recommandable d'optimiser le coefficient de multiplication en étudiant l'effet de plusieurs balances hormonales. Par ailleurs la gamme de génotypes introduits *in vitro* pourrait être élargie vers d'autres variétés locales et étrangères (à floraison tardive pouvant échapper au gel d'hiver).

Enfin, la mise au point technique de la propagation *in vitro* de l'amandier serait d'un double intérêt. D'un point de vue économique, elle devrait assurer la production locale de plants d'amandier avec un prix de revient plus réduit que celui des plants importés et une qualité plus fiable et par conséquent une meilleure productivité. D'un point de vue écologique, elle devrait permettre de préserver et de propager les variétés locales, tout en exploitant particulièrement les terrains pauvres riches en calcaire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHALAK, L., 1999. Rapport annuel, unité de culture des tissus. 46 pp.
- DRIVER J.A. & KUNIYUKI A., 1984. *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock. Hortscience 19: 507-509 pp.
- HAMMERSCHLAG F., 1981. *In vitro* propagation of Myrobolan plum (*Prunus cerasifera*). HortScience, 16. 283.
- KESTER D.E., LIU L., FENTON C.A.L. and DURZARD D.J., 1986. Almond (*Prunus dulcis* (Miller) WEBB D.A.), dans "Biotechnology in Agriculture and Forestry". Volume 1: Trees I. Ed. by Y.P.S. BAJAJ. 414-430 PP.
- LLOYD G. and McCOWN B., 1981. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Int. Plant Prop. Soc. Proc 30: 421-427.
- MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE LIBANAISE, 1997. Les statistiques agricoles pour l'an 1997.
- MURASHIGE T. and SKOOG F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-497.
- QUOIRIN M., et LEPOIVRE P., 1977. Un premier bilan de 10 années de recherches sur les cultures des méristèmes et la multiplication *in vitro* de fruitiers ligneux. Extrait du compte rendu des recherches 1976-1977 et rapports de synthèse. Station des cultures fruitières et maraîchères. Centre de Recherche Agronomiques de Gembloux (Belgique): 93-116.
- RODRIGUEZ R., REY M., CUOZZO L. & ANCORA G., 1991. *In vitro* propagation of Caper (*Capparis spinosa* L.). Cell. Dev. Biol. 26: 531-536
- RUGINI E. et VERMA DC., 1982. Micropropagation and cell suspensions of a difficult to propagate almond (*Prunus amygdalus* Batsch) cultivar dans "Plant tissue culture", FUJIWARA A., 1982. Maruzen (Tokyo), 741-742 pp.
- SAVINO, V., DI TERLIZZI, B., DIAGIARO, M. et MUROLO, O., 1990. Certificazione delle drupacee in Puglia. Dans : La sharka in Puglia, diagnosi e lotta : un caso concerto di intervento. 131-145 pp.
- TALHOUK S., LUBANI R., BAALBAKI R., ZURAYK R., ALKHATIB A., PARMAKSIZIAN L. & JARADAT A.A., 2000. Phenotypic diversity and morphological characterization of *Amygdalus* L. species in Lebanon. Genetic Resources and Crop Evolution 47: 93-104.