

Contribution à la propagation in vitro du pommier pour la production de variétés "franc de Pied" / G. Féghaly ; sous la direction de Dr L. Chalak. — Extrait de : Annales de recherche scientifique. — N° 5 (2004), pp. 175-187.

Bibliographie. Figures. Tableaux.

I. Pomme — Variétés — Liban. II. Plantes — Micropropagation.

Chalak, L.

PER L1049 / FA193886P

CONTRIBUTION À LA PROPAGATION *IN VITRO* DU POMMIER POUR LA PRODUCTION DE VARIÉTÉS « FRANC DE PIED »

G. FEGHALY

*Université Saint-Esprit de Kaslik
Faculté de Sciences Agronomiques
B. P. 446 Jounieh, Liban*

Sous la direction de Dr L. CHALAK

*Institut de Recherches Agronomiques du Liban, Tal Amara
B. P. 287 Zahlé, Liban*

RÉSUMÉ

Ce travail consiste en une mise au point méthodologique des différentes phases de propagation in vitro de cinq nouvelles variétés de pommier Ace, Golden Supreme, Idared, Pinova et Top Red, et ceci pour la production conforme de "franc de pied".

Le matériel végétal de départ a été constitué de sections nodales prélevées sur des rameaux de l'année, du verger de Ainata.

L'initiation des cultures a été établie sur le milieu Murashige et Skoog dilué de moitié et additionné de BAP, bien qu'elle se soit heurtée à des problèmes d'oxydation des tissus. Les taux de reprise des explants relevés au bout de 35 j ont varié, selon les variétés, entre 16,5 et 40,8%, avec la régénération en moyenne de 1,03 à 1,58 nouvelles microboutures par explant.

Quant à la multiplication, elle a été conduite pendant six subcultures successives sur 8 milieux de culture différant par la balance hormonale. Ces milieux se sont tous révélés adéquats à la prolifération des microboutures, aboutissant à un coefficient de multiplication moyen compris en moyenne entre 2,5 et 3,5 microboutures par explant.

L'enracinement des microboutures a été expérimenté sur Ace, Golden Supreme, Pinova et Top Red, par 9 traitements différant les uns des autres essentiellement par le mode d'induction et la concentration en AIB. Le traitement ayant impliqué une première phase d'induction à l'obscurité pendant 2 h dans une solution fortement concentrée d'AIB, a conduit à un taux d'enracinement relativement élevé allant jusqu'à 100% chez Pinova et 69% chez Ace.

D'une façon générale et parmi les cinq variétés étudiées, la variété Pinova s'est montrée la plus réactive au cours des différentes étapes d'initiation des cultures, de multiplication et d'enracinement.

Ces résultats incitent à développer les méthodologies de la culture in vitro chez une gamme plus large de nouvelles variétés de pommier pour la production directe de plants racinés, afin de les expérimenter pour leur conduite sur leurs propres racines et leur productivité dans les conditions écogéographiques du Liban.

Mots clés : *Pommier, propagation in vitro, enracinement.*

ABSTRACT

This study consisted of a methodological clarification of the different stages of propagation in vitro for 5 new varieties of apple, Ace, Golden Supreme, Idared, Pinova and Top Red, in order to produce rooted plants.

The starter materiel was constituted from nodal sections taken from stems of current year from Ainata orchard.

In a first step, cultures were established on half diluted Murashige and Skoog medium and including BAP, although there was oxidation of phenolic compounds. Afer 35 days, the rate of survival of explants varied between 16.5% to 40.8% depending on varieties, with the regeneration of 1,03 to 1,58 new shoots per explant.

The multiplication stage was run during 6 successive subcultures on 8 cultural media, that differ in hormonal balance. These media were revealed adequate for shoot proliferation. The coefficient for multiplication ranged between 2,5 and 3,5 shoots per explant depending on varieties.

The rooting of shoots was experimented on Ace, Golden Supreme, Pinova and Top Red, with 9 treatments different by induction stage and IBA concentration. The treatment, that implicated a first induction phase for 2 hours in the

dark and in a highly concentrated solution of IBA, has led to a relatively high rate of root formation reaching 100% with Pinova and 69% with Ace.

Generally, among the five studied varieties, Pinova has been the most reactive during initiation, multiplication and rooting stages.

These results incite to develop the methodology of in vitro culture for a wide number of new varieties of apple to produce directly rooted plants. Such material will be experimented for growing on its own roots and its productivity in the ecogeographical conditions of Lebanon.

Key Words: *apple, in vitro propagation, rooting.*

INTRODUCTION

Introduit dans les années 40 (Asly, 1996), le pommier a longtemps constitué l'une des principales cultures fruitières du pays où il s'accommode bien des conditions écogéographiques. En effet, différentes variétés peuvent y être cultivées à partir de 800 m d'altitude assurant ainsi une production de qualité et échelonnée dans le temps.

A ce jour, seuls deux groupes de variétés, Golden et Starking, ont été exploités selon les techniques traditionnelles et peu adaptées. Ceci limite le marché d'exportation d'une part, et le choix du consommateur libanais d'autre part et incite à importer de nouvelles pommes d'autres variétés produites en Europe ou aux Etats-Unis.

A l'échelle internationale et depuis une dizaine d'années, c'est plutôt le greffage sur des porte-greffes peu vigoureux, semi-nanisants qui est adopté. Plus récemment, les programmes de sélection de pommier menés dans les grands pays producteurs ont abouti à l'obtention de variétés hybrides qui possèdent une auto-régulation de leur fructification, notamment en culture sur leurs propres racines. Ces variétés sont produites *via* les techniques de culture *in vitro* qui devraient permettre une production rapide et de masse de matériel de qualité.

Dans le but d'améliorer le secteur du pommier au Liban, l'Institut de Recherches Agronomiques (Tal Amara) a démarré un programme de multiplication de nouvelles variétés de pommier venus de France par les techniques de culture de tissus. Ce travail a consisté en une mise au point méthodologique de la multiplication *in vitro* du pommier pour la production conforme de variétés racinées dites "franc de pied". Il s'agit d'adapter la technique de micropropaga-

tion pour les nouvelles variétés Ace, Golden Supreme, Idared, Pinova et Top Red à travers les différentes phases d'initiation, de multiplication, d'enracinement et d'acclimatation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

Le matériel de départ est constitué de rameaux de l'année prélevés en été (Juillet - Août) sur 5 variétés implantées dans le verger démonstratif de Inata et en cours de la 5^{ème} feuille: Ace, Golden Supreme, Idared, Pinova et Top Red. Ces rameaux ont subi un protocole de désinfection dans une solution de Clorox diluée à 20% pendant 10 min suivi de 3 rinçages à l'eau distillée stérile pendant 5, 10 et 15 min respectivement.

Initiation des cultures

Sous la hotte à flux laminaire, les explants préparés ont été mis en culture sur le milieu M1 basé sur la solution de Murashige et Skoog (1962) diluée de moitié et additionnée de 1 mg/l BAP. Les cultures ont été maintenues dans une chambre de culture conditionnée à une température comprise entre 23°C et 25°C et une photopériode de 16 h par jour, avec une intensité lumineuse de 4000 lux pourvue par des lampes blanches fluorescentes. Tout au long de cette phase, les explants contaminés par des bactéries ou des champignons ont été éliminés au fur et à mesure de leur apparition. Au bout de 35 j, le pourcentage de reprise des explants a été évalué.

Multiplication

Six semaines après l'initiation des cultures, les microboutures nouvellement développées ont été séparées des explants de départ et repiquées sur du milieu frais, constituant ainsi la première subculture. Les milieux utilisés sont tous constitués de la solution de base de Murashige et Skoog (1962) diluée de moitié, mais différant entre eux par la balance hormonale (Tab.1). L'opération de transfert ou subculture a été répétée tous les 35 j afin de disposer d'une quantité suffisante de microboutures destinées à l'enracinement. Au bout de chaque subculture, le coefficient de multiplication a été estimé comme suit:

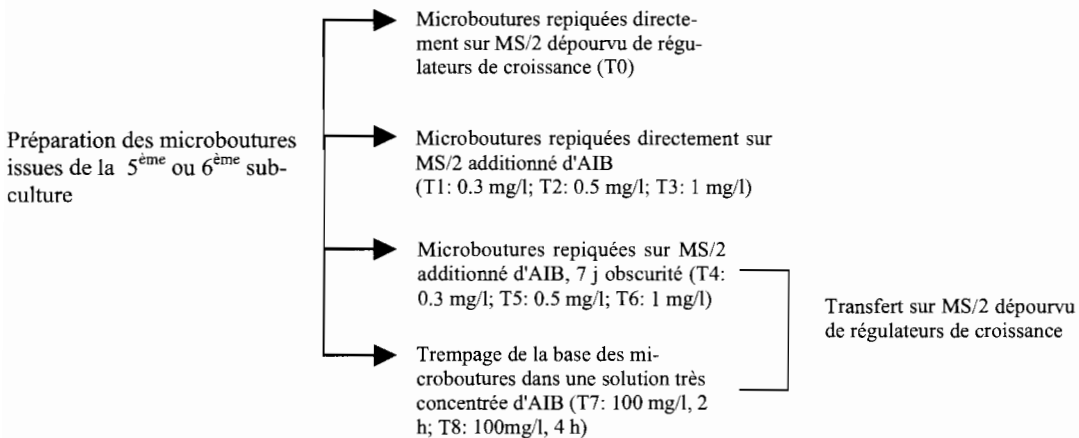
$$\text{Coefficient de multiplication} = \frac{\text{Nombre de nouvelles microboutures (1 à 2 bourgeons)}}{\text{Nombre initial des microboutures (32)}}$$

Tableau 1: Composition en régulateurs de croissance des différents milieux utilisés pour l'étape de multiplication des cultures de pommier.

Régulateurs de croissance	Milieux (mg/l)							
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8
BAP	1	1	1	1	2	2	2	2
Kinéatine	0	0	3	3	0	0	3	3
AIB	0	0,1	0	0,1	0	0,1	0	0,1

Enracinement

Neuf traitements ont été expérimentés sur des microboutures issues de la 5^{ème} et de la 6^{ème} subculture. Ces traitements ont différés les uns des autres essentiellement par le mode d'induction et la concentration en auxine (Fig. 1).



Les microboutures sont soumises à une photopériode de 16h/j, une intensité lumineuse de 3000 lux et une température de 26±2°C

Figure 1. Traitements d'enracinement appliqués chez les variétés de pommier.

Analyse des données

Les résultats correspondants aux trois phases d'initiation des cultures, de multiplication et d'enracinement sont présentés sous forme de moyenne \pm écart-type à l'aide du logiciel Excel. Les moyennes sont ensuite comparées par le test de "Duncan" au seuil de probabilité 0,05.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Etablissement des cultures

Dès la première semaine, les cultures initiées à partir de sections nodales se sont heurtées à un problème d'oxydation des composés phénoliques se traduisant par le brunissement des tissus aboutissant à la perte d'une quantité importante des explants allant jusqu'à 71% chez Ace. Par ailleurs, les infections du type bactérien et mycélien ont été mineures.

Les résultats ont été relativement faibles et ont varié d'une variété à l'autre. Ainsi Pinova a présenté le taux le plus élevé (40,8%) suivie par Idared (26,5%); tandis que Top Red a présenté le moins de reprise (16,5%) (Tab. 2). Parallèlement, le nombre moyen de nouvelles tiges régénérées par explant a été compris entre 1,03 dans le cas de Top Red et 1,58 pour Ace avec un effet variétal significatif en faveur de Ace (Tab. 2).

Tableau 2: Taux de survie des sections nodales et nombre moyen de nouvelles tiges par explant, estimés 35 jours après la mise en culture des 5 variétés de pommier (moyenne \pm écart-type). Les résultats sont obtenus sur le milieu M1 avec 8 répétitions de 32 explants chacune.

Génotype	Nb. d'explants mis en culture	Pourcentage d'explants			Nb. moyen de nouvelles tiges par explant	
		perdus par bactéries	perdus par champignons	perdus par oxydation		
Ace	166	6,2	0,5	71,3	22,0	1,58 \pm 0,33 a*
Golden Supreme	374	11,9	3,3	65,3	19,6	1,07 \pm 0,1 c
Idared	223	6,5	0,8	66,2	26,5	1,11 \pm 0,2 bc
Pinova	173	7,6	1,3	50,3	40,8	1,25 \pm 0,2 b
Top Red	801	8,3	5,7	69,5	16,5	1,03 \pm 0,08 c

*Les valeurs suivies de lettres différentes sont significativement différentes au seuil de probabilité de 0.05 (Test de Duncan).

2. Multiplication

Dès la première subculture, une infection de type bactérien s'est manifestée sous forme de voile dans les cultures des variétés Golden Supreme, Idared et Top Red. Ces infections ont fini par causer la perte des microboutures atteintes. Ce type d'infection a persisté pendant les subcultures suivantes et a entraîné une baisse importante du nombre de microboutures en culture, allant jusqu'à la disparition totale des microboutures de la variété Idared sur le milieu M4.

Quoi qu'il en soit, les effets du génotype, du milieu de culture et de la subculture ont été évalués au niveau des microboutures ayant échappé au problème précité.

D'après les résultats obtenus sur les huit milieux pendant six subcultures successives, l'effet variétal a été significatif en faveur de Pinova qui a présenté le coefficient de multiplication le plus important, soit en moyenne 4 tiges par explant (Fig. 2). Les quatre variétés Ace, Golden Supreme, Idared et Top Red se sont comportées d'une façon relativement similaire, avec un coefficient de multiplication compris entre 2,5 et 3,5. Ces résultats ne sont pas très loin de ceux obtenus par Martin et *al.* (1983) qui ont abouti à un coefficient de multiplication de 4 et 5 chez les variétés Golden delicious et Jonathan.

Le milieu de culture n'a pas influencé de manière significative le coefficient de multiplication, malgré les différences au niveau de la composition hormonale des milieux étudiés (Tab. 1, Fig. 3). Ce résultat s'ajoute aux résultats obtenus par Zimmerman (1986) et Harbage et *al.* (1993, 1996) qui ont appliqué des milieux différant de par leur composition hormonale chez une large gamme variétale avec succès.

Concernant l'effet des subcultures successives, une hausse significative a été notée entre la 1^{ère} subculture et les autres. Les résultats étant comparables d'une subculture à l'autre avec des coefficients de multiplication variant entre 1,72 et 3,61, indépendamment de la variété et du milieu de culture (Fig. 4).

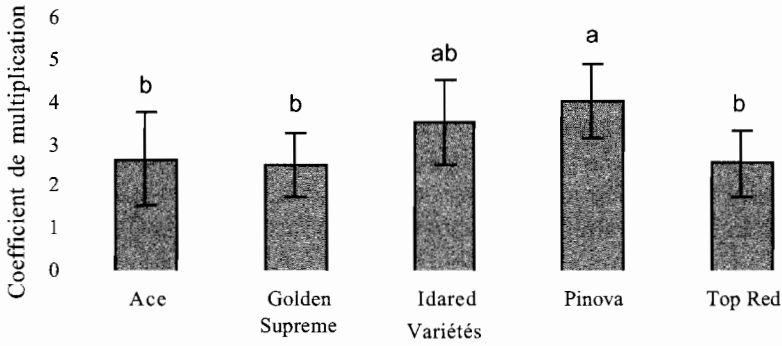


Figure 2. Effet de la variété sur le coefficient de multiplication. (Les données obtenues au cours de 6 subcultures et sur les 8 milieux sont confondues).

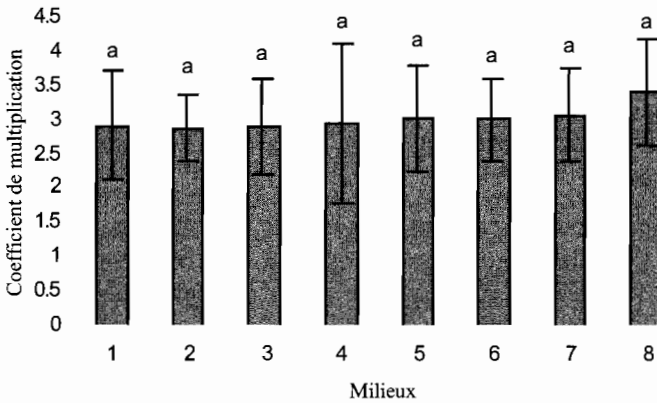


Figure 3. Effet du milieu sur le coefficient de multiplication (les données obtenues sur les 5 variétés et les 6 subcultures sont confondues).

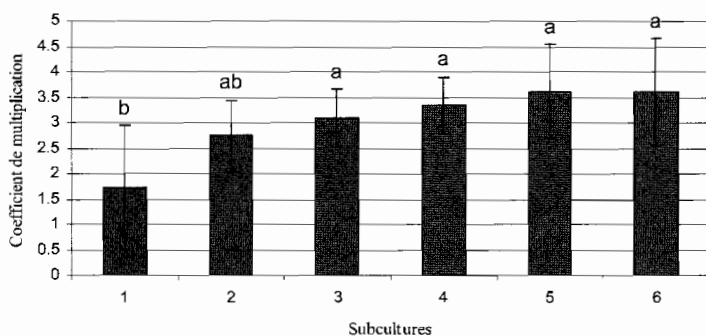


Figure 4. Effet de la subculture sur le coefficient de multiplication (les données obtenues pour les 5 variétés et sur les 8 milieux sont confondues).

3. Enracinement

Dès les premiers jours d'induction racinaire, des symptômes de dépérissement ont commencé à apparaître au niveau du feuillage pour toutes les variétés considérées, quel que soit le traitement d'enracinement, y compris le témoin.

Les premières racines sont apparues au bout de 10 jours. Un mois après la mise en place de l'essai, le pourcentage d'enracinement, le nombre moyen de racines par microbouture et la longueur moyenne ont été estimés (Tab. 3).

Les taux d'enracinement ont varié selon les traitements entre 0 à 100%. Au total, sur 896 microboutures traitées (sans les témoins), 124 ont été racinées.

L'effet variétal a été hautement significatif en faveur de Pinova avec des taux d'enracinement variant, selon les traitements, entre 18 et 100%. En seconde place vient Ace avec des taux variant en moyenne entre 3,1 et 68,8%, suivie par Top Red avec 0 et 33,4%. Golden Supreme s'est montrée particulièrement récalcitrante aux différents traitements avec des taux variant entre 0 et 6,3%.

L'effet du traitement a été hautement significatif en faveur de T7 et T8 ayant impliqué une première étape d'induction à l'obscurité dans une solution très concentrée d'AIB pendant 2h et 4h respectivement. Il faut noter la supériorité du traitement T7 avec 2h d'induction seulement et qui a conduit à des taux d'enracinement particulièrement élevés allant jusqu'à 100% chez Pinova et 68,8% chez Ace. Par contre, ce même traitement a conduit à un résultat nul chez Top Red, ce qui pourrait être dû à l'effet variétal. Par comparaison aux autres

traitements, T7 et T8 ont permis l'obtention d'un nombre élevé de racines variant entre 5,4 et 8,9 mais plus courtes par rapport à celles des autres traitements (Tab. 3).

L'aptitude à l'enracinement serait donc directement dépendante de la variété et du traitement à la fois. La récalcitrance de certaines variétés à l'enracinement a déjà été décrite chez le pommier (Zimmerman, 1984) ainsi que chez d'autres espèces ligneuses.

Bien que leur efficacité ait été prouvée pour l'enracinement d'un grand nombre de variétés de pommier (Welande, 1983., Williams *et al.*, 1985., Zimmerman et Fordham, 1985), les traitements T1, T2, T3, T4, T5 et T6 se sont révélés peu efficaces dans cette étude. Ceci confirme, une fois de plus, la « corrélation » étroite entre la variété d'une part et le traitement d'autre part (Tab. 3).

Tableau 3: Effet de neuf traitements d'enracinement chez les variétés Ace, Golden Supreme, Pinova, Top red, à raison de trente deux microboutures par traitement (moyenne \pm écart-type).

Variétés	Traitements*	Pourcentage de microboutures enracinées	Nb. moyen de racines par microboutures	Longueur moyenne des racines
Ace	T0	0 d**	-	-
	T1	0 d	-	-
	T2	3.1 \pm 8.8 d	1.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
	T3	0 d	-	-
	T4	9.4 \pm 12.9 cd	1.3 \pm 0.5	5.7 \pm 1.3
	T5	9.4 \pm 12.9 cd	1.3 \pm 0.5	4.4 \pm 1.1
	T6	15.6 \pm 12.9 c	2.0 \pm 0.7	3.2 \pm 0.5
	T7	68.8 \pm 11.5 a	5.4 \pm 3.6	1.3 \pm 0.6
	T8	43.8 \pm 15.8 b	6.8 \pm 4.9	0.9 \pm 0.2
Golden Supreme	T0	0 a	-	-
	T1	0 a	-	-
	T2	0 a	-	-
	T3	0 a	-	-

	T4	3.1 ± 8.8 a	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0
	T5	0 a	-	-
	T6	0 a	-	-
	T7	6.3 ± 11.5 a	1.0 ± 0.0	4.3 ± 0.3
	T8	4.2 ± 10.2 a	1.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
Pinova	T0	0 e	-	-
	T1	34.3 ± 18.6 cd	2.2 ± 2.28	1.5 ± 0.6
	T2	40.6 ± 18.6 c	2.3 ± 1.60	1.1 ± 0.3
	T3	28.1 ± 16 cd	1.7 ± 0.83	0.8 ± 0.2
	T4	21.9 ± 8.8 d	2.7 ± 1.06	5.6 ± 2.3
	T5	18.8 ± 17.6 d	2.8 ± 1.94	4.7 ± 2.7
	T6	34.3 ± 12.9 cd	2.2 ± 1.16	6.1 ± 2.7
	T7	100 ± 0.0 a	5.7 ± 2.88	3.0 ± 0.7
	T8	71.8 ± 20.8 b	5.4 ± 3.27	2.9 ± 0.7
Top Red	T0	0 c	-	-
	T1	0 c	-	-
	T2	18.8 ± 12.5 b	2.0 ± 1.0	0.8 ± 0.2
	T3	0 c	-	-
	T4	4.1 ± 10.2 c	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
	T5	0 c	-	-
	T6	0 c	-	-
	T7	0 c	-	-
	T8	33.4 ± 12.9 a	8.9 ± 3.9	3.2 ± 0.7

- * T0 : Microboutures repiquées directement sur MS/2, dépourvu de régulateurs de croissance.
 T1 : Microboutures repiquées directement sur MS/2, additionné de 0.3 mg/l AIB.
 T2 : Microboutures repiquées directement sur MS/2, additionné de 0.5 mg/l AIB.
 T3 : Microboutures repiquées directement sur MS/2, additionné de 1 mg/l AIB.
 T4 : Microboutures repiquées sur MS/2, additionné de 0.3 mg/l AIB, 7 j à l'obscurité.
 T5 : Microboutures repiquées sur MS/2, additionné de 0.5 mg/l AIB, 7 j à l'obscurité.
 T6 : Microboutures repiquées sur MS/2, additionné de 1 mg/l AIB, 7 j à l'obscurité.
 T7 : Trempage de la base des microboutures dans une solution contenant 100mg/l AIB, pendant 2 h.
 T8 : Trempage de la base des microboutures dans une solution contenant 100mg/l AIB, pendant 4 h

** Pour chacune des variétés, les valeurs suivies de lettres différents dans une même colonne sont significativement différentes au seuil de probabilité de 0.05 (Test de Duncan).

CONCLUSION

Cette étude a porté sur les différentes phases de propagation *in vitro* de cinq nouvelles variétés de pommier Ace, Golden Supreme, Idared, Pinova et Top Red, dans l'objectif de produire localement des variétés « franc de pied ». Elle a permis de conclure les points suivants:

- La première phase d'initiation des cultures a pu être établie malgré les problèmes de mortalité des explants dûs à l'oxydation des composés phénoliques présents dans le milieu.
- Le milieu de culture MS additionné de différentes compositions hormonales s'est avéré adéquat pour la prolifération des cinq variétés étudiées.
- L'enracinement des microboutures a été optimisé à 100% chez la variété Pinova par le traitement impliquant une étape d'induction à l'obscurité dans une solution très concentrée en AIB (100 mg/l) pendant 2h.
- D'une façon générale, la variété Pinova s'est montrée plus réactive que les autres au cours des différentes étapes d'initiation des cultures, de multiplication et d'enracinement.

A l'issue de cette étude, un nouveau traitement auxinique jamais décrit auparavant est proposé pour l'enracinement de variétés de pommier. Ce traitement doit être testé pour une large gamme de variétés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASLY, O., 1996. Les vergers de pommier, hier et aujourd'hui. *Agrotica*, (14) : 12-14.
- HARBAGE, J.F., STIMART, D.P. et EVERT, R.F., 1993. Anatomy of adventitious root formation microcuttings of *Malus domestica* 'Gala'. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, (118) : 680-688.
- HARBAGE, J.F. et STIMART, D.P. 1996. Effect of pH and 1H-indole-3-butyric acid (IBA) on rooting in apple microcuttings. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, 121(6) : 1049-1053.
- MARTIN, C., CARRE, M. et VERNON, R., 1983. La multiplication végétative in vitro des végétaux ligneux cultivés: cas des arbres fruitiers et discussion générale. *Agronomie* (3) : 303-306.
- MURASHIGE, T. et SKOOG, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, (15) : 473-497.
- WELANDER, M., 1983. In vitro rooting of the apple rootstock M.26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiology plant*, (58) : 231-238.
- WILLIAMS, R-H., TAJI, A-M. et BOLTON, J-A., 1985. Specificity of interaction among auxins, light, and pH in rooting of Australian woody species *in vitro*. *HortScience*, (20) : 1052-1053.
- ZIMMERMAN, R.H. 1984. Apple. *In* : Handbook of plant cell culture. SHARP, W.R., EVANS, D.A., AMMIRATO, P.V. and YAMADA, Y.(eds.). Vol. 2, Crop species. *Macmillan, New York*. pp.369-395.
- ZIMMERMAN, R.H. 1986. Propagation of fruit, nut, and vegetable crops overview. *In* : Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. LAWSON, R.H. (eds.). *Martinus Nijhoff, Dordrecht, the Netherlands*, pp. 183-200.
- ZIMMERMAN, R.H. et FORDHAM, J.M., 1985. Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. *Journal of American Society of Horticultural Sciences*, (110) : 34-38.