

Problèmes liés à la production de porte-greffe d'arbres fruitiers par multiplication *in vitro*.

J.C. NAVATEL*

PROBLEMES LIES A LA PRODUCTION DE PORTE-GREFFE
D'ARBRES FRUITIERS PAR MULTIPLICATION *IN VITRO*

J.C. NAVATEL

Fruits, mai 1982, vol. 37, n° 5, p. 331-336

RESUME - Les techniques de multiplication végétative *in vitro* sont de plus en plus utilisées pour la production commerciale de porte-greffe. Cependant, un certain nombre de problèmes se posent qui peuvent placer cette méthode de production à la limite de la rentabilité.

Ces problèmes sont, soit techniques : plants «vitreux», importance et qualité de l'enracinement, soit économiques : prix de revient.

INTRODUCTION

Le nombre de laboratoires qui se montent actuellement pour la production industrielle de plants par multiplication végétative *in vitro* prouve que l'intérêt de cette technique n'est plus à démontrer. Le fraisier est actuellement l'exemple typique de l'importance que peuvent prendre ces méthodes dans un schéma de production de plants (en France, la totalité des pieds-mères des variétés certifiées est produite par multiplication *in vitro*).

En ce qui concerne les espèces fruitières, et notamment pour certains porte-greffe du pêcher (INRA GF 677, INRA GF 655.2, INRA GF 43, D 1869), du pommier (M 26, M 27), du cerisier (F 12.1), les techniques paraissent actuellement au point. Elles font déjà, de la part de certains laboratoires, l'objet d'une production industrielle. (En 1980, production de 80.000 plants de GF 677 par multiplication *in vitro*. Pour 1981, les prévisions sont supérieures à 200.000 plants).

Toutefois, un certain nombre de problèmes se posent qui rendent délicate l'utilisation de cette technique de multiplication.

PROBLEMES POSES PAR L'UTILISATION DE LA MULTIPLICATION *IN VITRO*

Bien qu'ils soient très liés entre eux et que tout problème technique aura une incidence économique, ils peuvent être classés en deux catégories :

- problèmes techniques,
- problèmes économiques.

Problèmes techniques.

Ils se rencontrent au cours des différents stades de la multiplication, soit pendant les phases de production *in vitro* proprement dites ; plants «vitreux», qualité de l'enracinement, soit lors de l'acclimatation des plants en serre.

* - Centre technique interprofessionnel des Fruits et Légumes
Service Amélioration de la Production - Centre de Balandran
30127 BELLEGARDE.

- Plants «vitreux» ou «vitrescents».

Ces termes sont ceux qui sont utilisés par la majorité des laboratoires pour désigner certains symptômes. Nous continuerons à les appeler ainsi bien qu'ils soient jugés inexacts.

Ce symptôme qui apparaît généralement pendant la phase de multiplication a été signalé par de nombreux laboratoires. Les plants prennent un aspect «vitreux». Les feuilles, de couleur vert foncé et luisantes, se recourbent, deviennent cassantes et translucides. L'importance des dégâts semble augmenter avec le nombre de cultures sur le milieu de prolifération, plus ou moins riche en cytokinine. Dans la majorité des cas, les plants présentant ces symptômes se bloquent et ne sont pratiquement plus utilisables pour la suite de la multiplication. On observe quelquefois un certain rétablissement du végétal lorsque celui-ci est placé sur un milieu sans auxine et sans cytokinine. Ce type d'accident a été observé sur le GF 677 mais également sur différents porte-greffe du cerisier et du pommier.

De nombreuses hypothèses ont été émises quant à l'origine de ces symptômes : milieu trop riche, toxicité de l'ion NH_4 , densité trop importante dans le bocal, production d'éthylène, mauvaise adaptation des bocaux de culture, toxicité par accumulation dans le végétal de certaines substances de croissance (cytokinine). Des travaux récents montrent que l'apparition de ce type de symptôme serait lié au potentiel hydrique du milieu (DEBERG et al. 1981), alors que d'autres auteurs confirment le rôle prépondérant que jouerait l'ion NH_4^+ , peut-être en corrélation avec d'autres éléments, dans l'apparition de ce phénomène (BEAUCHESNE, 1981).

D'autres observations ont été faites par différents auteurs sur des techniques permettant sinon d'éliminer du moins de réduire la gravité de ces symptômes. ZUCCHERELLI (1979) montre que l'adjonction de pectine alimentaire au milieu de culture réduirait l'importance des plants «vitreux». DRUART (1980) signale que le passage du matériel végétal en chambre froide à plus ou moins 2°C pendant un mois environ limiterait l'apparition de tels symptômes.

Toutefois, ces résultats ne permettent pas d'expliquer en totalité ce phénomène, probablement très complexe du fait du nombre de facteurs pouvant interférer entre eux.

Les recherches doivent donc se poursuivre car, cela conditionne, pour un laboratoire qui doit produire, le maximum de plants, le nombre de multiplications que l'on peut effectuer et donc la périodicité du renouvellement des souches. Tant que ce problème ne sera pas complètement résolu, il sera difficile de planifier correctement une production de plants.

- Qualité de l'enracinement.

L'enracinement *in vitro* est sans doute la phase la plus difficile à maîtriser, car il faut considérer non seulement le pourcentage de plants racinés, mais également la qualité de l'enracinement obtenu, qui va conditionner en partie la

réussite au cours de la phase d'adaptation en serre.

Ces résultats dépendent entre autre de la richesse des milieux de culture en éléments minéraux et en auxines, mais également de la phase précédant la phase d'enracinement. Il est possible par l'utilisation de certaines techniques d'améliorer le pourcentage et la qualité de l'enracinement, soit par le passage par une phase d'allongement, soit par un séjour limité des plantules sur le milieu contenant l'auxine.

Passage par une phase d'allongement.

Dans certains cas, il est possible de passer directement du milieu de multiplication au milieu d'enracinement : GF 677 LV 30 par exemple. Cela devient pratiquement impossible avec d'autres porte-greffe tels que GF 655.2, GF 1380. On doit alors passer par un stade intermédiaire : l'allongement (ZUCCHERELLI, 1979 ; DRUART, 1980).

Le merisier F 12-1, porte-greffe du cerisier donne, pendant la phase de multiplication, des touffes de plantules assez petites et hétérogènes qu'il est difficile de manipuler et de raciner.

Le passage des touffes sur un milieu de culture sans auxine ni cytokinine pendant 2 à 3 semaines va permettre d'obtenir des plantules plus homogènes qui seront plus réactives au stimulus auxinique de l'enracinement. C'est ce qui ressort du tableau 1 qui montre l'importance de la phase d'allongement : augmentation de près de 30 p. 100 du rendement en plantules racinées mais également meilleure qualité de l'enracinement et meilleure homogénéité des microboutures qui permettent d'obtenir une meilleure reprise en serre.

Séjour limité des plantules sur le milieu contenant l'auxine.

Plusieurs auteurs ont signalé cette technique pour améliorer la qualité de l'enracinement chez certains porte-greffe (D.J. JAMES et I.J. THURON, 1979 ; I. SNIR et A. EREZ, 1980). Elle consiste à placer les microboutures pendant une durée de 4 à 8 jours sur le milieu contenant l'auxine puis de les transférer sur le même milieu sans auxine. Cela permettrait, après que l'induction racinaire ait eu lieu en présence de l'auxine, de supprimer l'effet plus ou moins inhibiteur sur l'allongement des racines de cette même auxine.

L'utilisation de cette technique n'augmente pas d'une façon importante le pourcentage de plants racinés mais améliore la qualité de l'enracinement (suppression de cal), ce qui permet d'obtenir en serre une meilleure reprise.

Les observations effectuées montrent que, dans l'ensemble, lorsque le système racinaire obtenu est bien développé avec un nombre de racines suffisant (4-5 par bouture), la reprise se trouve améliorée de 15 à 50 p. 100 selon les espèces.

- Acclimatation des plantes en serre.

L'acclimatation des plants en serre représente également

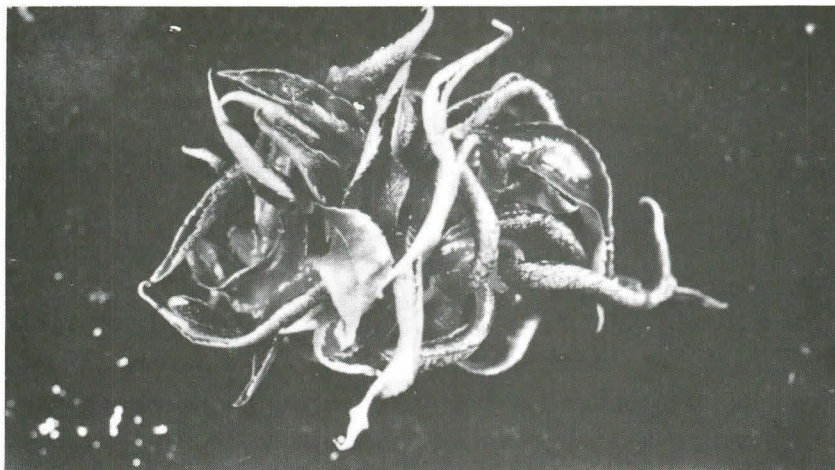


Figure 1 - Plants vitreux sur porte-greffe du pêcher.

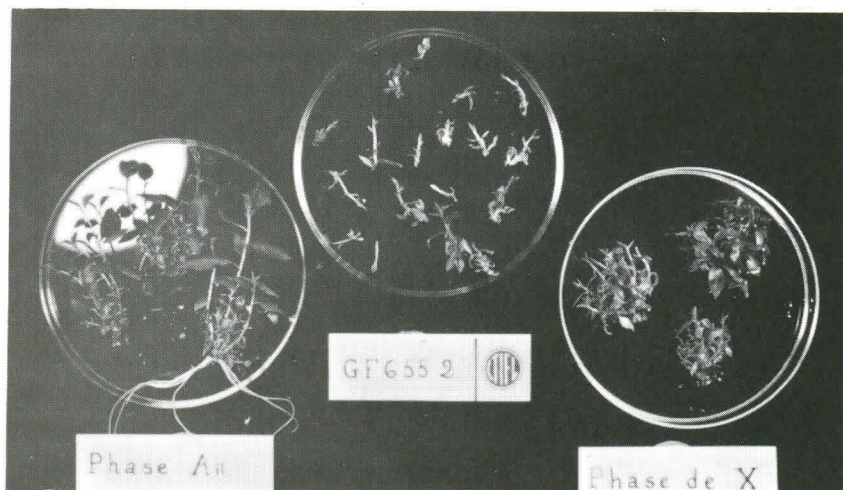


Figure 2 - Aspect de touffes en fin de phase de multiplication à droite, d'allongement à gauche. Au centre, taille des plantules obtenues après éclatement d'une touffe en fin de multiplication.



Figure 3 - Enracinement obtenu avec le clone M du Paradis jaune de Metz. A droite, maintien sur un milieu avec 1 mg/l d'A.I.B. A gauche, passage pendant 5 jours sur le milieu avec 1 mg/l d'A.I.B. puis transfert sur un milieu sans auxine.

une phase délicate à maîtriser, un certain nombre d'accidents pouvant survenir tels que mauvaise reprise au repiquage et blocage des plants racinés.

Reprise au repiquage.

Les jeunes plants, à la sortie des bocaux, sont très fragiles. Ils doivent être placés à l'étouffée avec une hygrométrie voisine de la saturation, à une température moyenne de

TABLEAU 1 - Incidence de la phase d'allongement sur l'enracinement *in vitro* du F 12.1 (essai effectué sur une série de 200 plants par traitement, culture en bocaux de 500 ml).

Auxines utilisées (1) en mg/l	Avec ou sans allongement	p. 100 plants racinés	Observations	p. 100 reprise en serre
A I B : 0,2	S.A. (2)	66,6	3-4 racines longues, absence de cal. Taille des plantules hétérogène.	29,2
A I B : 0,2	A.A. (2)	95,4	4-5 racines, absence de cal. Taille des plantules homogène.	80,4
A I B : 1	S.A.	91,6	6-8 racines très épaisses, courtes, cassantes, présence de cal important. Taille des plantules hétérogène. Repiquage en serre difficile.	50,2
A I B : 1	A.A.	89,4	6-8 racines, pas de cal. Taille des plantules homogène.	

(1) - Milieu de culture utilisé : macro et microéléments proposés par G. NEMETH lors de la table ronde sur les multiplications *in vitro* Gembloux, 6-8 juin 1978.

(2) - S.A. : sans phase d'allongement A.A. : avec phase d'allongement.

TABLEAU 2 - Incidence sur la qualité de l'enracinement d'un clone de Paradis jaune de Metz (clone M) par passage sur un milieu avec auxine, puis transfert sur un milieu sans auxine. (essai effectué sur une série de 100 plants par traitement).

Auxines utilisées en mg/l	traitements	p. 100 plants racines	observations	p. 100 reprise en serre
I B A : 1 I.B.A. : 1	S.A. A.A.	73 84	racines très courtes, présence de cal.	56,8
I B A : 1	5 jours puis transfert sur milieu sans auxine	74		
			racines blanches, longues, fines (4-7 par plantule, absence de cal).	70,2

TABLEAU 3 - Influence du substrat sur la reprise en serre d'un clone de Paradis jaune de Metz (clone M). (essai effectué sur 330 plants par traitement).

Mélanges 50-50	pH	Conductivité en mS/cm	Reprise en p. 100	Observations
Tourbe Tuf volcanique (1)	6,7	0,6	39,9	mélange trop compact.
Tourbe vermiculite	5,2	1,1	65,4	mélange bien aéré, un peu trop de vermiculite, tendance au dessèchement.
Tourbe Galex (2)	7,3	0,8	49,6	mélange bien aéré mais blocage probable de certains éléments par le Galex.

(1) - couche se situant au-dessus de la Pouzzolane dans les carrières

(2) - Laitier de hauts fourneaux.

TABLEAU 4 - Incidence du passage par une phase d'allongement sur l'augmentation des heures de main-d'oeuvre.

	sans phase d'allongement		avec phase d'allongement		Incidence en p. 100 de la phase d'allongement sur la main-d'oeuvre
	temps passé	nbre de plants/h	temps passé	nbre de plants/h	
GF 655.2 8.650 plants produits	114 h	75,8	148 h	58,4	plus 29,8
F 12.1 3.500 plants produits	37 h	61,4	80 h	43,7	plus 40,3

20-22°. La nature du substrat utilisé est également très importante pour l'obtention d'un pourcentage de reprise élevé.

En fonction de ces résultats, on s'oriente actuellement vers l'utilisation d'un mélange tourbe-vermiculite-pouzzolane dans les proportions de 50-30-20 de façon à avoir un substrat un peu plus filtrant.

Blocage des plants.

Après la reprise, on peut observer dans certains cas, des plants dont la croissance s'arrête et qui paraissent entrer en dormance. Ce blocage peut intervenir très tôt après la sortie des plants en serre, ou un peu plus tard en cours de végétation. Dans le premier cas, les plantes restent en rosette et présentent en général un bourgeon terminal gonflé. Il arrive quelquefois qu'un bourgeon situé en-dessous du bourgeon terminal parte en végétation. Il est alors à tendance fortement plagiotrope.

L'origine du blocage n'est pas parfaitement défini. Les pourcentages de plants présentant ce type d'accident sont très variables selon les séries. Ils ont été dans nos essais de 14 p. 100 pour Damas 1869, de 20 p. 100 pour de l'aman-dier-pêcher GF 677 et de près de 80 p. 100 pour une série de Saint Julien GF 655.2.

Problèmes économiques.

En plus des difficultés rencontrées par le laboratoire pour respecter le calendrier de production, les problèmes économiques découlent, en partie, des points énoncés ci-dessus.

En effet, il ne faut pas perdre de vue que, dans le cadre d'une production commerciale, l'impératif numéro un est de produire le maximum de plants au prix de revient le plus faible. Or, dans ce système de production, la main-d'oeuvre représente une part très importante du prix de revient (près de 70 p. 100 pour un plant de fraisier). Toute manipulation supplémentaire telle que le passage par une phase d'allongement par exemple, même si elle apporte une amélioration, va augmenter le prix de revient du plant. La technique de

production de plants par multiplication *in vitro* peut de ce fait atteindre la limite de la rentabilité pour certains porte-greffe par rapport aux techniques classiques de production.

Pour essayer de chiffrer l'incidence du passage par une phase d'allongement sur le prix du plant, un essai de production de plants a été fait avec deux porte-greffe, GF 655.2 et F. 12.1 avec enregistrement des temps de travaux.

Pour chaque phase, les temps de travaux comprennent le temps passé pour la préparation des milieux, le temps passé pour le repiquage des plants dans les bocalux et pour le tri des plants, le conditionnement en barquettes de 1.000 plants. On a pris comme hypothèse que dans les deux cas (avec ou sans allongement), les pourcentages de plants racinés obtenus étaient identiques.

Dans le cas de GF 655.2, le passage par une phase d'allongement (qui est pratiquement obligatoire pour ce porte-greffe), augmente de 29,8 p. 100 le temps de main-d'oeuvre. Pour le F 12.1, l'augmentation est de 40,3 p. 100.

Il est nécessaire de voir maintenant si l'augmentation du prix du plant que l'on enregistre est compensé par l'amélioration de la reprise en serre (essai actuellement en cours).

CONCLUSIONS

Les techniques de multiplication *in vitro*, lorsqu'elles sont parfaitement maîtrisées, offrent de grandes possibilités pour la production de plants, tant par la rapidité de la multiplication que par la qualité du matériel obtenu. Toutefois, ces techniques très intéressantes du point de vue économique pour certains porte-greffe difficiles à produire (taux de multiplication trop faible, bouturage difficile), peuvent, dans certains cas, devenir limite du point de vue compétitivité avec les techniques classiques de multiplication.

Enfin, il faut attendre les résultats des essais qui sont actuellement en place pour mieux connaître le comportement en verger du matériel ainsi multiplié.

BIBLIOGRAPHIE

- BEAUCHESNE (G.). 1981.
Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique.
CR Acad. Agric., tome 67, n° 16, 1389-1397.
- BOXUS (P.) et QUOIRIN (M.). 1974.
La culture de méristèmes apicaux de quelques espèces de *Prunus*.
Bulletin Soc. roy. Bot. Belgique, Tome 107, fascicule 1.
- CARRE (M.), MARTIN, TANGUY (J.), MUSSILLON (P.) et MARTIN (C.). 1979.
La culture de méristèmes et la multiplication végétative *in vitro* au service de la pépinière.
Bulletin des Petits fruits, n° 14, 54-59.
- DEBERGH (P.), HARBAOUI (Y.) et LEMEUR (R.). 1981.
Mass propagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*): evaluation of different hypotheses to overcome vitrification with special reference to water potential.
Physiol. Plant, 53, 181-187.
- DRUART (P.). 1980.
La micropropagation des nouveaux sujets porte-greffe nanifiants chez le cerisier.
Symposium sur la culture du cerisier, Gembloux.
- NAVATEL (J.C.). 1980.
L'utilisation des cultures *in vitro* pour la multiplication de quelques espèces légumières et fruitières.
Académie d'Agriculture de France, C.R., 681-696. tome 66.
- IONA SNIR et AMNON EREZ. 1980.
In vitro propagation of malling Merton apple Rootstocks.
Hortscience, 15 (5), 597-598.
- ZUCCHERELLI (G.). 1979.
Moltiplicazione *in vitro* dei portainnesti clonali del pesco.
Frutticoltura, vol. XLI, n° 2, 15-20.

