

Le microgreffage latéral *in vitro* associé à la thermothérapie pour régénérer les cultivars fruitiers.

D. CORNAGGIA*

LE MICROGREFFAGE LATERAL *IN VITRO* ASSOCIE A LA THERMOTHERAPIE POUR REGENERER LES CULTIVARS FRUITIERS.

D. CORNAGGIA.

Fruits, Sep. 1986, vol. 41, n° 9, p. 557-561.

RESUME - Le microgreffage *in vitro* d'apex prélevés après thermothérapie, a été étudié en vue d'améliorer la rapidité de la régénération et le taux de guérison.

Les apex (0,5 - 1 mm) sont greffés soit en tête, soit de côté sur micro-boutures préalablement multipliées *in vitro*. Ces assemblages sont ensuite élevés *in vitro* pendant 5 à 6 semaines, sur un support nutritif, soit gélosé, soit liquide imbibé sur «moquette», favorisant l'émission de racines.

Le microgreffage latéral sur boutures en phase d'induction racinaire donne les meilleurs résultats pour les trois espèces étudiées : pommier - pêcher - cerisier. Le support «moquette» facilite la transplantation *in vivo*.

Cette technique prometteuse doit s'insérer peu à peu dans le programme de régénération des cultivars fruitiers entrepris par le CTIFL depuis près de 20 ans.

INTRODUCTION

La régénération des cultivars fruitiers atteints de maladies à virus ou à mycoplasmes, est réalisée par le CTIFL sur le Centre de Lanxadé depuis près de 20 ans par le procédé du traitement à air chaud ou thermothérapie, sur jeunes plants en pleine croissance. Toutes les maladies ou complexes sont éliminés, mais les rendements de la méthode sont irréguliers. Ils varient entre 10 et 100 p. 100 de guérison, essentiellement en fonction de :

- l'âge du plant traité. Un scion procure de meilleurs résultats qu'un plant écussonné.
- l'agent infectieux ou complexe viral et de la relation hôte - agent infectieux.

- la sensibilité à la chaleur des variétés.

Ainsi, cette technique peut s'avérer longue et coûteuse : préparation et entretien des plants, répétition des traitements, greffage et contrôle sanitaire d'un grand nombre de pointes apicales.

Devant le souhait des professionnels de disposer aussi rapidement que possible des «nouveau» assainies, l'amélioration de la régénération est devenue nécessaire.

Actuellement, le seul recours à la culture de méristèmes *in vitro* ne permet pas d'obtenir facilement des cultivars fruitiers sains avec un bon taux de réussite.

Il semble donc nécessaire de maintenir le traitement par la chaleur et de réduire la taille de la pointe apicale prélevée. La récupération d'un tel matériel n'étant plus possible par greffage *in vivo*, on doit faire appel au microgreffage *in vitro*.

* - C.T.I.F.L. - Centre technique interprofessionnel des Fruits et Légumes - Prignonieux - B.P. 21 - 24130 LA FORCE (France).

Le travail qui fait l'objet de cet exposé a consisté à élaborer une technique de microgreffage simple et rapide d'exécution, souple et adaptable à diverses espèces fruitières.

MATERIEL ET METHODE

Préparation des porte-greffe.

Ils proviennent d'une multiplication *in vitro* de microboutures, entretenues par des repiquages successifs sur milieu de culture neuf, toutes les trois semaines. Ce milieu comprend la solution minérale de LEPOIVRE additionnée des vitamines de WALKEY et des substances de croissance telles que Benzylaminopurine (BAP), acide β indolbutyrique (AIB), acide gibberellique (AG3). Le pH ajusté à 5,3-5,5, le saccharose et l'agar dilués, il est coulé dans les tubes (ϕ 25) et autoclavé à 110°C pendant 30 minutes.

Les plantules porte-greffe sont élevées dans une chambre climatisée à une température de 22-24°C avec une photopériode de 16 heures. Multipliées d'abord en touffes, elles sont ensuite individualisées dès qu'elles atteignent 2 à 4 cm, puis placées sur le même milieu nutritif liquide, sans agar, avec une seule substance de croissance, l'AIB. Le maintien de leur base à l'obscurité totale pendant 8-10 jours, va induire l'enracinement. Elles seront greffées avant qu'apparaissent les racines.

Nous avons utilisé les porte-greffe suivants : amandier x pêcher GF 677, merisier F 12-1, *Pyronia veitchii*.

Prélèvement des greffons.

Les pointes apicales des rameaux qui se sont développées au cours de la thermothérapie - 20 à 40 jours à 35-36°C - sont identifiées, coupées à 2-3 cm de longueur et effeuillées. Elles sont ensuite stérilisées pendant 10 à 15 minutes dans une solution contenant pour 100 cc d'eau stérile, 3 cc d'eau de Javel commerciale et quelques gouttes d'un mouillant (le Tween 20), enfin rincées 2 à 3 fois à l'eau stérile.

Placées sous loupe binoculaire, elles sont disséquées aseptiquement afin d'exciser à chacune un explant de 0,5 à 1 mm de longueur appelé apex, comprenant le dôme méristématique et deux à trois ébauches foliaires. Il servira de greffon.

Les prélèvements ont concerné trois espèces : pommier, pêcher, cerisier - 2 variétés par espèce.

Réalisation du microgreffage.

Une fois prélevé, l'apex greffon est gardé momentanément dans une goutte d'antioxydant stérile, le DIECA à 2 g/litre, alors qu'une plantule porte-greffe est amenée à ses côtés. Celle-ci sera, soit décapitée, soit entaillée latéra-

lement et superficiellement sur une longueur de 1 à 2 mm, à mi-hauteur. Toujours sous loupe binoculaire, le greffage proprement dit se réalise par pose du greffon sur la partie sommitale du porte-greffe - greffage en tête - ou sur l'entaille latérale - greffage latéral -, à l'aide d'une pince et d'une lame de rasoir emmanchée.

Elevage *in vitro* et sevrage *in vivo*.

L'assemblage ainsi réalisé est repiqué à l'aide d'une pince sur le même milieu nutritif que pour la multiplication, mais sans cytokinine ni auxine. Ce milieu se présente soit gélosé, soit imbibé par un substrat synthétique à base de fibres de polypropylène, dénommé moquette. Les conditions d'élevage sont identiques à celles utilisées pour la production de porte-greffe.

Dans le cas du microgreffage latéral, les plantules sont rabattues deux semaines plus tard.

Après 5 à 6 semaines, la transplantation en serre des plants greffés et enracinés est réalisable. Les plants sur milieu gélosé sont repiqués en jiffy pot dans un mélange - 2/3 floratorf, 1/3 vermiculite -, avant d'être repotés un mois plus tard dans un terreau riche. Les plants élevés sur moquette sont repiqués directement dans ce terreau. Les uns et les autres sont sevrés sous châssis en serre à une température de 20-22°C et une hygrométrie de 70 à 80 p. 100 pendant 2 à 3 semaines.

RESULTATS

Les différents essais réalisés depuis 2 ans avaient essentiellement pour but de mettre au point une bonne technique de microgreffage, avant de s'intéresser au taux de guérison. Pour cette raison, nous avons surtout comparé les méthodes de greffage et analysé les facteurs favorables ou défavorables à la reprise.

La plantule porte-greffe.

La micropropagation lui confère les avantages propres à cette technique, à savoir :

- production rapide et continue à moindre frais. Les greffages après thermothérapie se succèdent souvent tous les 15 jours et demandent la préparation régulière de jeunes porte-greffe.

- souplesse d'utilisation. Les plantules sélectionnées pour le greffage mais non utilisées, peuvent être stockées quelques semaines à quelques mois (réfrigérateur).

- qualité sanitaire assurée. Si le matériel de départ est bien choisi sain, il ne peut être contaminé.

Les qualités requises d'une bonne plantule pour le microgreffage sont les suivantes :

- longueur suffisante - 2 à 4 cm - mais non filiforme avec peu d'yeux latéraux pour faciliter la greffe.
- la bonne aptitude à raciner rapidement suite au pré-traitement de la base à l'obscurité,

Le choix des porte-greffe a été influencé par les considérations suivantes :

- sujets déjà connus pour leur bon comportement à la micropropagation,
- adaptation à un, voire deux milieux de culture (solutions minérales) afin de faciliter la préparation,
- utilisation de cultivars susceptibles de servir aussi comme indicateurs de viroses et mycoplasmoses et déjà multipliés dans ce but (exemple : *Pyronia veitchii* pour détecter le Spy decline et le Vein yellow, merisier F 12-1 sensible au Rubbery wood), afin de rentabiliser au mieux leur production.

L'apex greffon.

Le traitement à air chaud à 36°C, non seulement limite la progression des agents infectieux vers les pointes apicales en croissance, mais encore permet à celles-ci un bon allongement facilitant le dépiautage des ébauches foliaires, d'où une approche facile et un prélèvement rapide de l'apex. De plus, l'enceinte de thérapie étant à l'abri des contaminations extérieures, une désinfection douce du matériel prélevé suffit pour éliminer les bactéries et les champignons.

La taille du prélèvement, supérieure à celle d'un méristème, contribue à une meilleure survie de l'apex et favorise sans doute la soudure avec le porte-greffe. Cependant, il ne doit pas dépasser le millimètre pour espérer un très bon taux de guérison.

Le microgreffage.

Les résultats du microgreffage en tête sur la plantule décapitée ont été très médiocres (< 5 p. 100), malgré les nombreuses tentatives entreprises et quel que soit le type de porte-greffe et de variété. Souhaitant une manipulation toujours simple, nous n'avons pas essayé le pré-traitement de l'apex, permettant de modifier «l'état physiologique de l'organe isolé», préconisé par R. JONARD, J. HUGARD et coll., 1983.

La microgreffe latérale inspirée de l'écussonnage à oeil poussant pour l'obtention d'un scion fruitier dans l'année (chip - budding) a été mise en oeuvre sans grande difficulté. Outre le bon taux de reprise (> 50 p. 100) cette technique offre les avantages suivants :

- rapidité d'exécution et pose facile de l'apex greffon,
- pas de formation de cal au point de greffe par afflux de sève,
- pas d'effet de stress au greffage causé par la décapitation,
- pas de départ anticipé des bourgeons latéraux du porte-greffe.

La seule exsudation de la coupe permet le maintien de l'apex en position verticale, protégé des oxydations par la goutte de DIECA (figure 1).

L'élevage *in vitro* - le sevrage *in vivo*.

Pendant les 5 à 6 semaines d'élevage en tube des plantules microgreffées (figure 2) on constate que :

- l'émission rapide des racines - 8-10 jours - favorise la reprise de l'apex, et ceci quelle que soit la nature du support nutritif.
- le rabattage de la plantule, nécessaire pour déclencher le développement de l'apex, n'entraîne pas obligatoirement le départ des yeux latéraux. Parfois nécessaire, leur suppression s'effectue aisément à l'aide d'un scalpel.
- le type de porte-greffe utilisé et le cultivar fruitier greffé ne semblent pas intervenir dans la reprise et la rapidité de développement de l'apex. Toutefois, l'affinité du pommier sur *Pyronia veitchii* est moyenne et la croissance un peu lente.

La transplantation en serre s'effectue sans aucun problème - reprise proche de 100 p. 100 - lorsque les plants greffés sont enracinés sur moquette (figure 3). Son exécution est facile et le développement des plants est plus rapide (moins d'effet de stress sur le système racinaire). Le repiquage des plants élevés sur gélose est plus délicat. La croissance est retardée et la reprise plus aléatoire.

Guérison du matériel obtenu.

Les viroses combattues ont été :

- pour le pêcher, le Necrotic ring spot virus (NRSV),
- pour le cerisier, le NRSV et le Prune dwarf virus (PDV)
- pour le pommier, le Spy decline - Stem pitting virus.

La vérification de l'état sanitaire des jeunes plants greffés, par tests sérologiques - ELISA - ou tests biologiques - indexage en serre - a confirmé leur régénération. Cependant, nous estimons que le taux de guérison et donc l'intérêt réel de cette technique ne pourra être jugé qu'après



Figure 1 - Microgreffage latéral d'un apex cerisier sur merisier F 12-1.

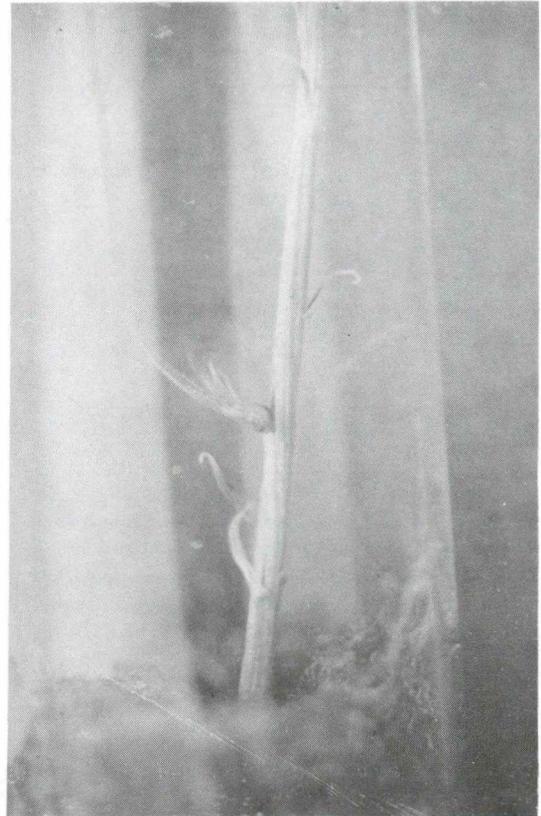


Figure 2 - Microgreffe latérale *in vitro* âgée de 3 semaines sur support moquette. Apex pêcher sur amandier x pêcher GF 677.

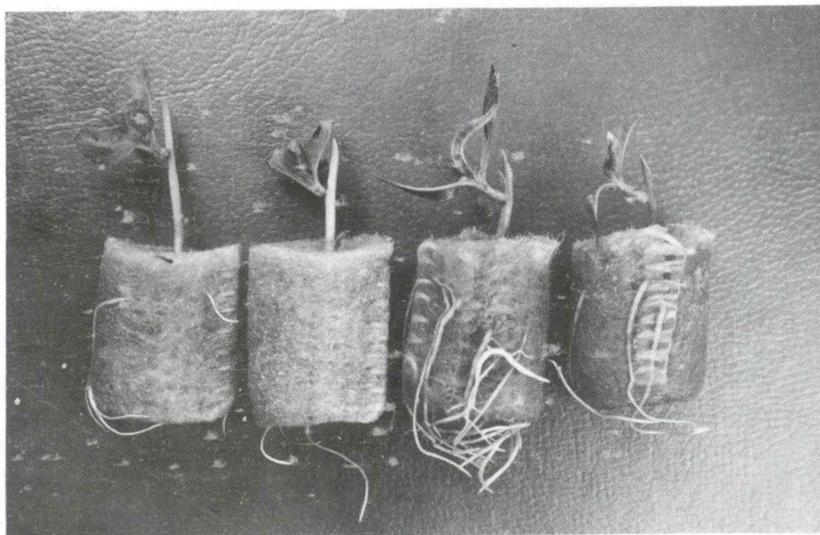


Figure 3 - Sevrage de plants microgreffés - pommier et pêcher âgés de 5 semaines.

quelques années d'utilisation, car de nombreux facteurs ont pu influencer une bonne réussite provisoire.

CONCLUSION

La technique du microgreffage latéral *in vitro* sur boutures en cours d'enracinement permet de réduire sensiblement la taille des prélèvements après thérapie et de ce fait doit augmenter le taux de guérison, particulièrement pour les virus résistant à la chaleur.

Un second aspect de l'amélioration de la régénération peut maintenant être abordé : la réduction de la durée du

traitement ou plutôt la diminution du temps de préparation des plants à traiter.

Les jeunes greffes récemment écussonnées sont assez sensibles à la chaleur. Jusqu'à présent, pour assurer une certaine efficacité de la thérapie, elles ne pouvaient être traitées à 36°C qu'après quelques mois de développement, donc à une période végétative peu favorable. Le prélèvement de micro-apex devrait permettre d'abaisser légèrement la température et autoriser un traitement plus précoce, au printemps. Les jeunes plants régénérés pourront alors se développer, être contrôlés et multipliés avant le repos végétatif. Dans le meilleur des cas, on peut gagner une année.

BIBLIOGRAPHIE

ALKIEFF (J.) et VILLEMUR (P.). 1978.

Greffage *in vitro* d'apex sur des plantules décapitées de pommier. *C.R. Acad. Sc. Paris*, D-1115, 1118.

CORNAGGIA (D.). 1985.

Régénération des arbres fruitiers par thérapie. *Infos CTIFL* (n° 10), 9-17.

DEOGRACIAS (J.M.). 1985.

Communications personnelles. *Laboratoire de Biologie cellulaire, Talence.*

JONARD (R.), HUGARD (J.), MACHEIX (J.J.), MARTINEZ (J.), MOSELLA-CHANCEL (L.), POESSEL (J.L.) et VILLEMUR (P.). 1983.

In vitro micrografting and its applications to fruit science. *Sc. Hort.*, (20), 147-159.

MOSELLA-CHANCEL (L.). 1979.

L'utilisation de l'apex caulinaire comme moyen d'élimination de deux types de viroses chez le pêcher. *Thèse Montpellier*, 215 p.

MURASHIGE (T.), BITTERS (W.P.), RANGAN (T.S.), NAVAR (E.M.), ROISTACHER (C.N.) et HOLLIDAY (D.B.). 1972.

A technic of shoot apex grafting and its utilisation towards recovering virus - free Citrus clone. *Hort. Sc.*, 7 (2), 118-119.

NAVATEL (J.C.). 1984-1985.

Communications personnelles. *CTIFL Centre de Balandran, Bellegarde.*

La base FAIREC..... du nouveau !

FAIREC  Fruits Agro-Industrie Régions Chaudes

La base de données de l'INSTITUT DE RECHERCHES SUR LES FRUITS ET AGRUMES (IRFA) est à nouveau interrogeable depuis août 1986 ; SUNIST a été retenu comme serveur pour sa commercialisation.

FAIREC

- Une base documentaire couvrant tous les aspects des cultures fruitières tropicales et subtropicales ; botanique, génétique, phytotechnie, protection de la plante, transformation des fruits, consommation et marchés.
- Des informations de natures scientifique, technologique et économique.
- Des références d'ouvrages, de périodiques, de congrès et de brevets.
- Un acquis de plus de 45 000 références recueillies depuis 1970.
- Une mise à jour mensuelle.

FAIREC

Quel public ? Des chercheurs, des concepteurs et réalisateurs de projets, des décideurs en matière de réalisation d'agro-industries et toutes personnes concernées par une information continue dans le domaine des fruits tropicaux.

Pour en savoir plus sur les conditions d'utilisation :

- IRFA 6, rue du Général Clergerie
75116 PARIS

- SUNIST Chemin St Hubert
B.P. 112 L'Isle d'Abeau
38303 BOURGOIN-JALLIEU Cédex