

La multiplication de l'avocatier (*Persea americana* MILL. cv. Fuerte) par microbouturage *in vitro*.

S. SCHALL*

LA MULTIPLICATION DE L'AVOCATIER (*PERSEA AMERICANA* MILL. cv. FUERTE) PAR MICROBOUTURAGE *IN VITRO*.

S. SCHALL.

Fruits, Mars 1987, vol. 42, n° 3, p. 171-176.

RESUME - La multiplication *in vitro* de l'avocatier (cv Fuerte) a été conduite par mise en culture successive sur des milieux de débourement, prolifération, croissance et enracinement.

L'acclimatation des vitroplants en serre est assurée avec un rendement de 80 p. 100 environ.

Les problèmes essentiels proviennent de phénomènes d'oxydation phénolique qui peuvent être limités par des additifs différents suivant qu'ils concernent l'explant ou le milieu.

INTRODUCTION

La culture de l'avocatier dans le monde a connu une progression constante ces dernières années : la production d'avocats est passée de 965 000 tonnes en 1976 à 1 500 000 tonnes en 1983, et cette augmentation se poursuit. C'est sans doute dans les pays de la CEE que l'engouement pour ce fruit-légume s'est révélé de la façon la plus spectaculaire, puisque la consommation qui était de 2 000 tonnes en 1966 dépassait les 55 000 tonnes en 1982 (dont 80 p. 100 pour le seul marché français) et poursuit son ascension régulière.

Certains pays, tel l'Espagne, se sont lancés dans la culture de l'avocatier aux côtés de pays fournisseurs traditionnels de la CEE comme Israël et l'Afrique du Sud.

Dans ce contexte international plutôt satisfaisant dans l'ensemble, demeurent deux problèmes préoccupants. Le premier est lié à la présence d'un champignon parasite : le *Phytophthora cinarommi*, responsable de la pourriture des racines et des troncs, qui reste la maladie la plus grave à ce jour. Il est donc indispensable, parallèlement à l'étude de traitements chimiques par des fongicides appropriés, de

procéder à une sélection d'individus résistants ou tolérants. Des observations effectuées dans des vergers totalement ravagés par le parasite ont permis de détecter quelques individus apparemment bien portants. Il faut donc opérer une multiplication clonale à partir de ces individus pour pouvoir dans un premier temps réaliser les tests pathologiques de résistance ou de tolérance, puis si ceux-ci s'avèrent concluants, poursuivre la multiplication à grande échelle qui débouchera sur la production de clones utilisés comme porte-greffe dans les plantations.

Or, et c'est le second problème, la multiplication végétative de l'avocatier offre des résultats médiocres dans l'ensemble qui sont peu compatibles avec la production rapide de plants en grandes quantités. C'est pourquoi, ces dernières années, l'intérêt porté sur la multiplication *in vitro* de l'avocatier s'est accentué. On connaît maintenant la contribution de la culture *in vitro* à la multiplication d'espèces réputées difficiles à reproduire végétativement de façon traditionnelle.

HISTORIQUE

De nombreux travaux d'approche concernant la culture *in vitro* de tissus d'avocatier ont été effectués depuis les années cinquante, mais il faut attendre 1982 pour trouver les premiers résultats de travaux s'attachant plus particu-

* - Laboratoire du Gros Pin - Quartier de l'Almanarre 83400 HYERES (France).

lièrement au problème du microbouturage. NEL *et al.* (1982 a et b) réalisent le microbouturage de *Persea indica*, l'espèce sauvage dont dérive *Persea americana*. A partir de fragments de tige se développent en 5 semaines des pousses de 6 cm qui sont repiquées. L'enracinement réussit avec un rendement de 65 p. 100 en 7 semaines, le transfert en pot à 50 p. 100. Cependant, ils notent une diminution de vigueur des cultures au fil des repiquages.

Cette technique de multiplication transposée à l'avocatier (*Persea americana* cv Duke 7) par NEL et KOTZE (1983) et NEL *et al.* (1983) se solde par un échec : les explants n'offrent qu'un développement médiocre, puis brunissent et meurent.

A ce jour, les quelques résultats publiés n'ont fait que souligner la difficulté à réaliser la micropropagation de l'avocatier, et aucun travail portant sur l'ensemble des étapes de la technique (à savoir : multiplication, enracinement et transfert en pot) n'a abouti.

MATERIEL ET METHODE

Matériel végétal.

Les explants sont prélevés sur de jeunes arbres greffés du cultivar Fuerte âgés de 2 à 4 ans, plantés en verger à Hyères (Var - France) ainsi que sur des plants issus de semis âgés de 1 à 3 ans, élevés sous serre à la température minimum de 18°C en hiver. Tous les explants sont prélevés sur des rameaux de l'année.

Désinfection.

La désinfection du matériel végétal se réalise de la manière suivante :

- 3 rinçages à l'eau + 3 gouttes de mouillant (Tween 20)
- 1 rinçage à l'alcool à 90° pendant 3 minutes
- 1 rinçage à l'eau
- désinfection à l'hypochlorite de calcium à 9 p. 100 + 3 gouttes de Tween 20 pendant 20 minutes
- 4 rinçages de 10 minutes à l'eau distillée stérile.

Milieux de culture.

A la suite d'essais préliminaires, nous avons retenu comme milieu de base un milieu de culture inspiré de celui utilisé par NEL *et al.* (1983) pour la culture *in vitro* de *P. indica*. La composition de ce milieu est la suivante :

- macroéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962) dilués de moitié.
- microéléments de MURASHIGE et SKOOG (1962)
- mélange vitaminique de MOREL (1948)
- fer EDTA 25 mg/l
- Na H₂ PO₄ 170 mg/l
- Myo inositol 100 mg/l
- saccharose 30 g/l

Les composés ajoutés à ce milieu de base seront précisés dans la suite. Les milieux de culture sont solidifiés par de l'agar agar à 7 g/l et leur pH ajusté à 5,8 avant auto-

clavage.

Conditions de culture.

Les cultures sont réalisées dans des tubes de verre de dimensions 150 x 25, 200 x 25, 200 x 30, ainsi que dans des flacons de 125 ou 250 ml et dans des bocaux de 500 ml à raison d'un explant par contenant.

Elles sont placées dans des chambres de culture où la température est réglée à 27° ± 1°C, à la lumière (photopériode de 16 heures).

Les repiquages ont lieu à une fréquence de 6 à 8 semaines.

PROTOCOLE DE CULTURE

Après de nombreux travaux préliminaires, nous avons retenu la méthode de culture qui consiste à placer un bourgeon axillaire sur un milieu de culture pour déclencher sa prolifération et obtenir ainsi une souche porteuse de plusieurs bourgeons ou tiges, puis de favoriser la croissance d'au moins une de ces tiges et de provoquer son enracinement en prévision de son acclimatation en conditions non aseptiques. La souche est repiquée sur un milieu neuf pour permettre la croissance d'une tige suivante et ainsi de suite. Il est possible quelquefois de recouper cette souche en deux (Figure 1).

RESULTATS

Prolifération.

D'après nos observations, il semble préférable, lorsque les bourgeons sont prélevés sur des rameaux en croissance ralentie ou en phase de repos, de les placer d'abord sur un milieu de débourement, constitué du milieu de base renfermant de la BAP (Benzyl amino purine) à 1 ou 2 mg/l. On a alors un taux de débourement de l'ordre de 80 p. 100 en 30 jours (contre 40 à 50 p. 100 sans BAP), délai au bout duquel on obtient des pousses de 2 cm.

Lorsque les rameaux sont en pleine croissance, on peut placer les bourgeons directement sur le milieu de prolifération.

Des trempages dans de fortes concentrations en cytokinines (BAP 25,50 et 100 mg/l) pendant 1, 3 ou 5 jours suivis de repiquages sur un milieu sans hormone n'ont pas favorisé la prolifération escomptée.

Par contre, la BAP utilisée à 5 ou 10 mg/l dans le milieu de culture a provoqué un fort bourgeonnement. Quand la BAP est ajoutée à la concentration de 10 mg/l le bourgeonnement est trop important, la végétation trop exubérante et les cultures sont vitreuses et de mauvaise qualité. Par contre, une concentration de 5 mg/l de BAP donne des souches moins ramifiées, de meilleure qualité et permet une assez bonne croissance (Photo 1).

Cependant, si on maintient les souches sur ce milieu

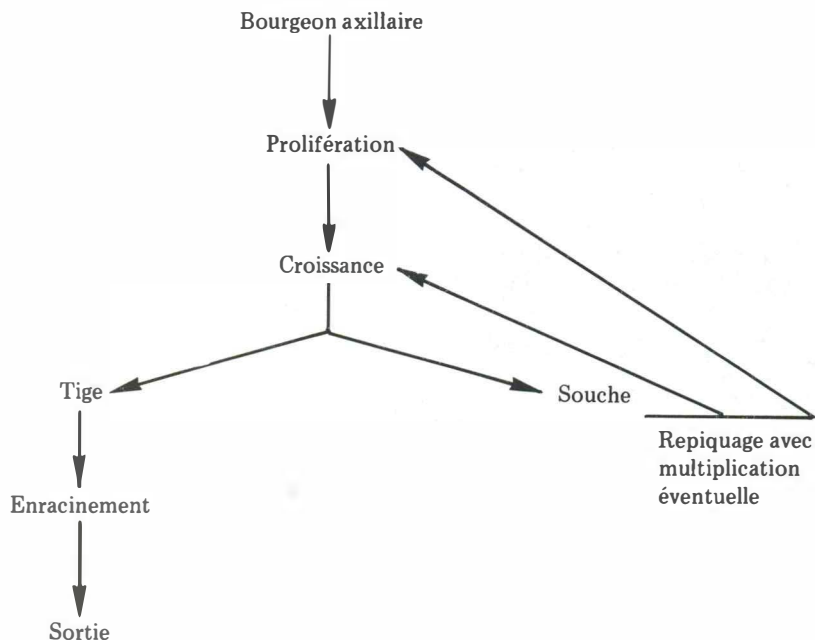


Figure 1 - Schéma de culture proposé pour le microbouturage *in vitro* de l'avocatier.

pendant plusieurs repiquages, on constate une diminution de la croissance (le nombre de tiges produites par souche passe de 1,13 à 0,87 en cinq repiquages) et parallèlement la capacité d'enracinement des tiges produites chute de 75 p. 100 à 45 p. 100 en cinq repiquages. De plus, la

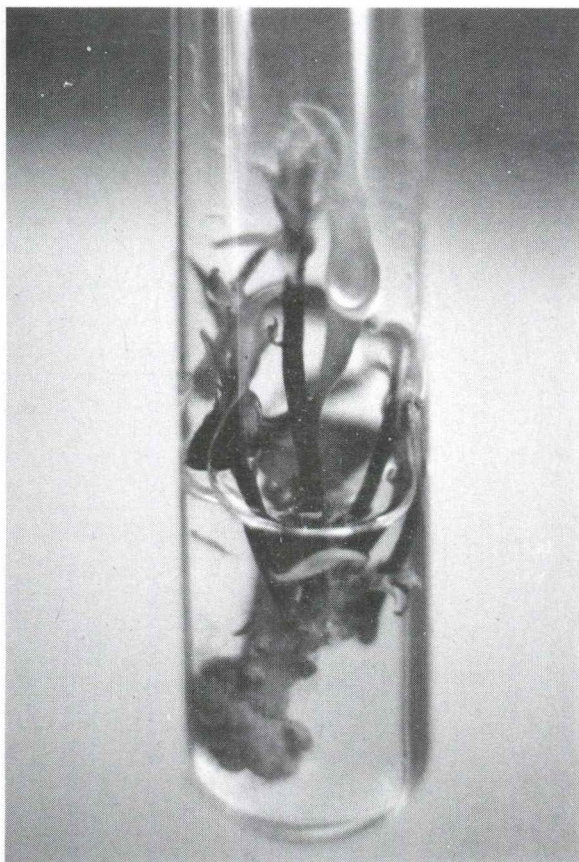


Photo 1 - Prolifération d'un bourgeon axillaire.

qualité générale devient médiocre et tend à rejoindre celle observée chez les cultures réalisées avec de la BAP à 10 mg/l.

Tous ces éléments obligent à dissocier la phase de prolifération de celle de la croissance qui, elle, doit se réaliser sur un milieu plus pauvre en cytokinine.

Croissance.

Le milieu le plus propice à la croissance des tiges mises en place sur le milieu de prolifération, est constitué du milieu de base contenant de la BAP à 1 mg/l. Il permet d'obtenir en 6 à 8 semaines des tiges suffisamment développées pour être mises à enraciner (Photo 2).

Seulement 50 à 60 p. 100 des souches cultivées sur un tel milieu produisent des tiges utilisables pour l'enracinement. Là encore, la tendance au bourgeonnement s'amenuise au fil des repiquages, de sorte qu'il est nécessaire de temps à autre (tous les 3 à 4 repiquages) de replacer les souches sur le milieu de prolifération (Figure 1).

L'alternance de cultures sur milieu de prolifération et milieu de croissance, bien que son utilisation soit empirique, alliée à une bonne connaissance des cultures permet néanmoins d'obtenir un rendement global de l'ordre de 70 p. 100 de souches qui produisent des tiges suffisamment développées.

Enracinement.

L'enracinement des tiges d'avocatier obtenues *in vitro* ne s'observe que rarement sans le recours à des auxines. Lorsqu'on ajoute des auxines au milieu de base (AIA - acide indole acétique, AIB - acide indole butyrique, ANA -

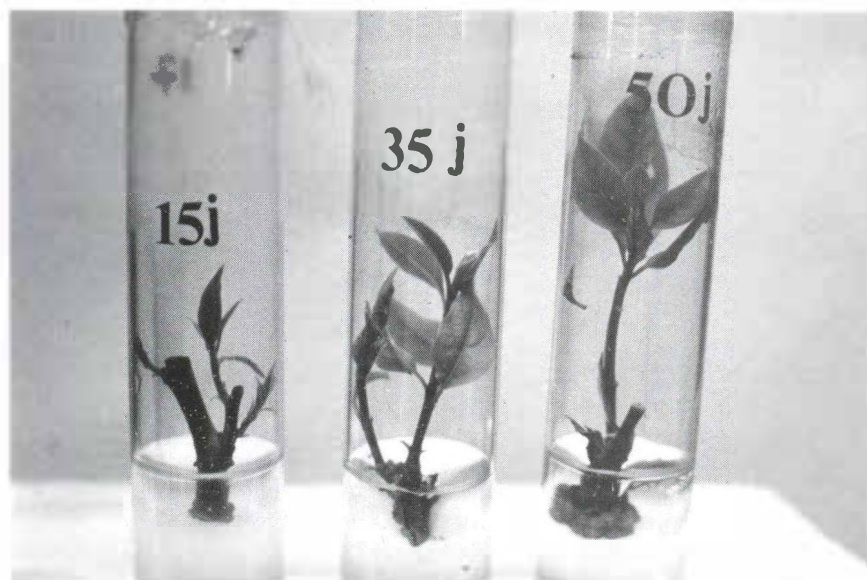


Photo 2 - Croissance des tiges.

acide naphthyl acétique à 1, 2, 5 ou 10 mg/l) les réussites sont sporadiques et le taux d'enracinement n'excède pas 26 p. 100 dans le meilleur des cas (AIB à 5 mg/l, essais effectués à la lumière et à l'obscurité). Par contre, si on ajoute du charbon actif à 0,5 p. 100 aux milieux de culture (charbon actif Merck GR) le nombre de tiges racinées est nettement plus important pour presque tous les traitements, le meilleur résultat est enregistré pour la combinaison AIB 5 mg/l, C.A. à 0,5 p. 100 avec 87 p. 100 d'enracinement en 77 jours. (De nombreuses répétitions de cet essai ont prouvé que l'on peut obtenir un taux moyen de 75 à 80 p. 100 en 70 jours). Ce milieu de culture permet d'obtenir des plants comportant 2 à 3 racines, souvent ramifiées, qui prennent naissance directement sur la base de la tige, et qui vont poursuivre un développement après leur transfert ultérieur en conditions non aseptiques (Photo 3).

Les problèmes de brunissement et d'oxydation.

Au cours de la mise en culture et des repiquages successifs, nous avons constaté que l'avocatier cultivé *in vitro* est particulièrement sujet aux oxydations, ce qui se traduit par le brunissement des milieux de culture et la mort des explants. Ces brunissements proviennent de l'action de polyphénoloxydases qui catalysent les réactions d'oxydation des phénols en quinones dont la polymérisation non enzymatique conduit à la formation de composés bruns.

Pour enrayer ce phénomène, nous avons testé un certain nombre de substances bloquant les oxydations, qui agissent selon trois modalités :

- l'adsorption des phénols : nous avons retenu le PVP (polyvinylpyrrolidone) à 100, 250, 500 et 1000 mg/l, et le charbon actif à 0,3, 0,5 et 1 p. 100.

- la modification du potentiel redox : nous avons testé l'acide ascorbique, la L. cystéine, l'acide citrique à 100, 250 et 500 mg/l.

- l'inhibition des phénoloxydases : c'est le fait d'agents chélateurs qui complexent les ions nécessaires au fonc-

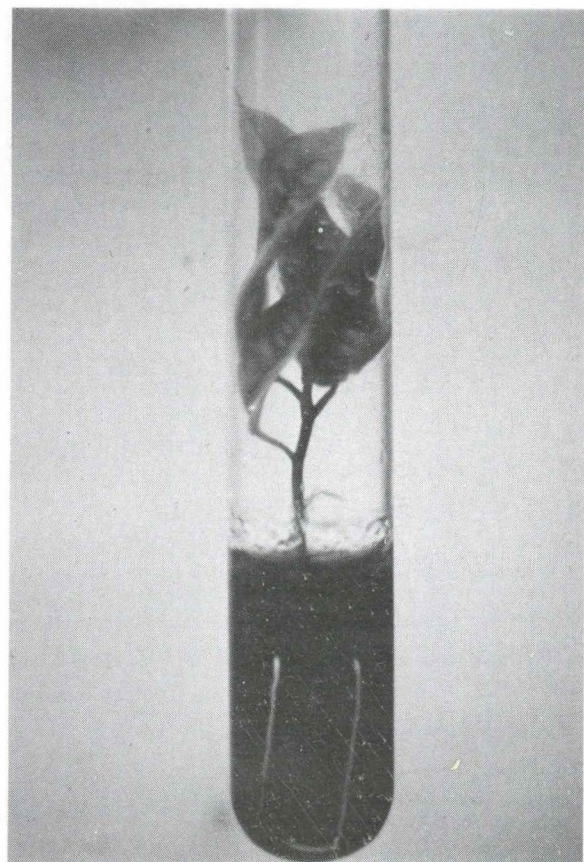
tionnement des enzymes. Nous avons testé le DIECA (diéthyl dithiocarbamate de sodium) à 100, 250, 500 et 1000 mg/l.

Brunissement des milieux de culture.

(A l'exception du charbon actif pour lequel la lecture est impossible).

Pour le témoin et les traitements n'apportant pas d'amélioration, nous constatons que 50 p. 100 des milieux

Photo 3 - Enracinement.



n'ont aucune trace de composé brun (Classe A) 25 à 60 p. 100 présentent un brunissement diffus autour de l'explant (classe B) et 5 à 25 p. 100 un fort brunissement généralisé dans toute la hauteur du milieu de culture (classe C). Deux traitements apportent une amélioration significative, ceux au PVP à 250 et à 500 mg/l avec respectivement 91 et 95 p. 100 de milieu sans trace (classe A) le reste se répartissant dans la classe B.

Oxydation des explants.

Les explants témoins présentent des taux d'oxydation se situant autour de 50 p. 100. Seul le traitement au DIECA à 250 mg/l fait chuter ce taux de façon sensible aux alentours de 20 à 30 p. 100.

Transfert en conditions horticoles.

Le transfert en conditions horticoles constitue la dernière étape du programme de multiplication *in vitro*. Les jeunes plants élevés en tube vont se trouver dans un environnement qui peut se révéler hostile si un certain nombre de précautions ne sont pas prises pour assurer une acclimatation progressive. Les conseils qui suivent n'ont qu'une valeur indicative : ils ne sauraient remplacer l'expérience du praticien, et sont à reconsidérer en fonction de l'époque de sortie, des équipements et des structures disponibles.

Pour notre part, nous respectons deux précautions

essentielles à ce type de transfert : éviter le choc hydrique et créer un environnement sanitaire correct.

Pour cela, les plants sont placés en serre sur des tablettes de multiplication et recouverts d'un tunnel plastique pour assurer une atmosphère saturée en humidité. Les parois du tunnel sont relevées progressivement à partir du troisième jour environ et supprimées totalement vers le huitième ou le dixième jour.

Sur le plan sanitaire, le substrat constitué de perlite et de terreau en parts égales, ou de terreau (2/3) et de pouzzolane (1/3), est préalablement stérilisé. Dès le premier jour, puis toutes les semaines, des traitements fongicides (dirigés principalement contre *Pythium* et *Botrytis*) et insecticides sont appliqués. Dans ces conditions, le taux de reprise est de 60 p. 100. Il peut être amélioré en pulvérisant sur les parties aériennes un antitranspirant constitué de cire de paraffine en émulsion. Des essais effectués dans les mêmes conditions et aux mêmes périodes que précédemment aboutissent à des taux de réussite de 80 p. 100 environ. (Photos 4 et 5).

CONCLUSION

Quelle que soit la voie empruntée (sexuée ou non) la reproduction des végétaux fait intervenir un stade de jeunesse. On sait que les espèces ligneuses ne sont pas plus difficiles à multiplier que les espèces herbacées à condition qu'elles soient en phase juvénile, et l'obtention de matériel

Photo 4 - Acclimatation (1 mois).

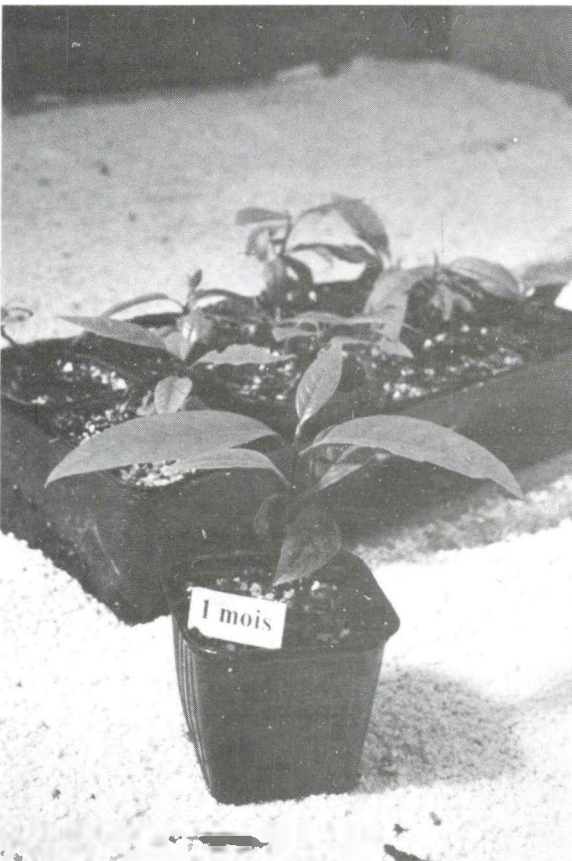


Photo 5 - Acclimatation (1 an).



végétal qui présente de telles caractéristiques est une préoccupation constante chez l'utilisateur. La réversion en phase juvénile est notamment rendue possible par l'utilisation des techniques de culture *in vitro*. Elle peut résulter de la simple répétition de repiquages, ou de l'emploi de cytokinines dans les milieux de culture. Nous avons constaté le même phénomène chez l'avocatier. En augmentant la concentration de BAP contenue dans les milieux de culture, à 5 et 10 mg/l, on obtient des tiges qui sont en tous points semblables à des tiges émergeant de graines (donc juvéniles), c'est-à-dire tendres, à entre-noeuds longs, fortement pigmentées en rouge et tachetées portant des feuilles duveteuses et réduites à des écailles, alors que les tiges poussant sur milieu plus pauvre en cytokinine sont vertes, à entre-noeuds plus courts, à croissance plus lente et portent des feuilles étalées.

Cet ensemble de caractères morphologiques peut nous faire penser que nous nous sommes rapprochés de la juvénilité recherchée et nous pouvons espérer grâce aux propriétés organogénétiques de ce matériel végétal réaliser une multiplication de plus en plus aisée.

Cependant, pour l'instant, des améliorations doivent être apportées à cette méthode notamment en ce qui concerne la phase de multiplication, du fait de son côté encore trop empirique et de son faible taux de multiplication.

Mais le frein essentiel est constitué par le problème d'oxydation des explants, auquel se superpose vraisemblablement celui de la production d'éthylène. Il est difficile en effet par la simple observation visuelle d'attribuer les symptômes observés (dessèchement, chute de feuilles, oxydation ...) à l'une ou l'autre cause. PLIEGO-ALFARO (1978) a montré que des tiges adultes d'avocatier (cv Topa-Topa et Duke 7) mises à raciner *in vitro* perdaient leurs feuilles et se desséchaient, alors que des tiges issues de semis placées dans les mêmes conditions se comportaient bien. Après des dosages en chromatographie en phase gazeuse, il s'avérait que les tiges adultes produisaient deux fois plus d'éthylène. L'emploi d'AVG (amino-éthoxy-vinyl-glycine) pour bloquer sa synthèse s'est révélé inefficace.

L'enracinement et l'acclimatation donnent déjà des résultats satisfaisants et doivent pouvoir être améliorés assez facilement. Ceux obtenus avec la variété Fuerte demandent à être vérifiés sur d'autres cultivars.

La méthode de multiplication proposée doit pouvoir rapidement trouver des débouchés à petite échelle, en vue d'approvisionner l'expérimentation en matériel végétal, pour peu que les impératifs de production (coût, calendrier de production ...) ne soient pas trop stricts.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- MOREL (G.). 1948.
Recherche sur la culture associée de parasites obligatoires de tissus végétaux.
Ann. Epiphytes, 14, 123-134.
- MURASHIGE (T.) et SKOOG (F.). 1962.
A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant., 5, 473-497.
- NEL (D.D.), KOTZE (J.M.) et SNYMAN (C.P.). 1982 a
In vitro propagation of *Persea indica*.
South Afr. Avoc. Grow. Ass. Yearb., 5, 92.
- NEL (D.D.), KOTZE (J.M.) et SNYMAN (C.P.). 1982 b.
In vitro propagation of *Persea indica*.
Calif. Avoc. Soc. Yearb., 66, 167-168.
- NEL (D.D.) et KOTZE (J.M.). 1983.
Tissue culture of Avocado.
South Afr. Avoc. Soc. Yearb., 6, 68-70.
- NEL (D.D.), KOTZE (J.M.) et SNYMAN (C.P.). 1983.
Progress in tissue culture of Avocado.
South Afr. Avoc. Grow. Ass. Yearb., 6, 90-91.
- PLIEGO-ALFARO (F.). 1978.
Morfogenesis del aguacate (*Persea americana* MILL.) *in vitro*.
Fundación Juan March, Serie Universitaria, 205, 1-45.

