

(1) Recherches sur la micropropagation de la picholine marocaine

par BOULOUHA B.

1. INTRODUCTION

La culture in vitro des plantes d'intérêt agronomique, commence à devenir un outil important dans la production agricole.

La multiplication végétative in vitro de nombreuses espèces d'arbres fruitiers, présente actuellement des difficultés provenant de divers facteurs concernant, soit la nature du matériel végétal, soit les conditions de culture qui diffèrent d'un cas à l'autre.

L'olivier est une plante en général qui répond favorablement au bouturage ligneux ou semi-ligneux. Cependant on connaît des variétés comme la Picholine Marocaine qui répond différemment à ces modes de multiplication.

Cette plante d'intérêt agronomique et social important, n'a pas encore fait l'objet d'études de micropropagation ou très peu.

ALSKIEF en 1978 a essayé le microgreffage d'apex sur jeunes plantules d'oliviers cependant avec échec.

De notre part, nous avons commencé l'étude de cette technique sur olivier au laboratoire d'Arboriculture Fruitière de Montpellier (France), avec l'assistance de P. VILLEMUR.

problèmes de contamination et de brunissement des cultures.

L'emploi d'un matériel végétal issu d'une serre et prélevé sur la partie médiane ou basale du rameau d'un an, a pu éviter les contaminations et les oxydations.

Le matériel végétal juvénile pris sur la variété Arbequine, s'est montré capable de régénérer des racines sur le milieu de Knop. Un pourcentage d'enracinement de 50 % a été obtenu sur ce milieu, cependant le milieu de culture de Miller était moins favorable.

Dans le but d'approfondir et de mettre en relief d'autres facteurs inhérent à ce type de propagation que nous avons poursuivi les essais au Maroc sur la variété la plus répandue la Picholine Marocaine.

2. MATERIELS ET METHODES:

2.1. Matériel végétal adulte:

Les explants sont prélevés sur la plante olivier, variété picholine Marocaine. Cette variété est d'une expansion très grande au Maroc, constituant les 9/10 de ses oliveraies.

Les plants qui ont servi comme source d'explants sont élevés dans une serre. Ils ont été obtenus par bouturage herbacé de cette variété.

Les prélèvements ont été effectués durant les mois de Janvier, février et Mars 1979.

Des organes de natures différentes ont été pris sur la plante:

- Microboutures à un nœud sur rameaux d'un an de la partie supérieure ou inférieure de la plante.

- Des pousses de l'année, courtes, sur le rameau d'un an (anticipés).

- Des bourgeons pris sur des microboutures in vitro.

Ces prélèvements de différents organes de la plante sont effectués dans le but d'éprouver l'aptitude de chacun à l'organogénèse.

Les techniques de prélèvement et d'ensemencement en conditions aseptiques, sont faites selon les techniques préconisées par GAUTHERET (1959).

2.1.1. Méthodes de désinfection

Les rameaux d'un an sont lavés à l'eau avec du Teepol (détergent de ménage) pour faire disparaître les poussières et les impuretés en surface.

Les feuilles axillaires sont supprimées et le rameau est fragmenté en petites portions de 2 à 3 cm. de longueur, comprenant deux bourgeons axillaires.

Les microboutures sont traitées à l'Alcool 95° pendant quelques secondes, puis rincées à l'eau stérile.

Dans l'enceinte à flux laminaires, la désinfection est faite à l'aide de l'hypochlorite de sodium dilué ou eau de javel de commerce pendant 30 mn.

2.1.2. Ensemencement des explants:

Trois rinçages à l'eau stérile d'une durée de 10mn. chacune, sont effectuées sur les explants avant de les ensemercer dans des tubes à essais en verre de 2 cm. de diamètre et de 20 cm. de longueur, contenant le milieu nutritif préalablement stérile.

2.1.3. Culture de bourgeons

Les bourgeons sont prélevés sur les microboutures en culture in vitro pendant la période hivernale. Après un passage de 10 jours des microboutures dans la chambre de culture à une température de 27°C la nuit, la dormance est levée et les bourgeons sont isolés sur un milieu nutritif.

2.2. Plantule de semis

Les plantules de semis, obtenues par culture de graines in vitro, âgées de 3 mois, sont décapitées dans une boîte de pétri stérile, leurs parties apicales de 1 ou 2 cm. de long contenant des bourgeons axillaires ou pas ont été prises comme explants.

2.3. Milieu de culture

Il est constitué par les macroéléments de KNOP dilués de moitié et par les microéléments de MILLER. Une solution de fer (Fec 13.6 h 20) de 1mg/l. a été ajoutée au milieu.

La solution minérale est solidifiée avec l'addition de la gélose en poudre 9 g/l.

Les substances phytohormonales

Pour favoriser l'organogénèse des cultures entreprises, nous avons fait appel à quelques auxines:

- Acide Naphtalene acétique (ANA)
- Acide indol butyrique (AIB)
- Acide 2-4 — Dichlorophenoxyacétique (2-4.D)

Une cytokinine:

- 6 Benzyladonine

Ces phytohormones sont ajoutées au milieu de culture sucré avant l'autoclavage à des doses allant de 0,1 à 10 mg/l, soit 0,1 à 10 p.p.m.

2.4. Chambre de culture

Elle a comme caractéristiques:

- Un éclairage périodique de 16 h/j
- Une intensité lumineuse de 0,005 W/cm²
- La température est de 27°C le jour et de 23°C la nuit.

3. RESULTATS

3.1. Réalisation d'une culture aseptique

Nos expériences ont débuté par la prise des explants sur des oliviers adultes en plein champ. Les premiers essais ont montré une contamination de l'ordre de 100 %.

La stérilisation avec de l'eau de javel (utilisée à des doses variantes de 5 % (V/V eau), 10 %, 50 % et 100 %) du matériel de plein champ et celui pris en serre a montré que le matériel de la serre peut donner une culture stérile valable de 10 à 12 % de contamination avec des doses d'eau de javel au delà de 10 %, tandis que le matériel de plein champ présente toujours des contaminations importantes.

3.2. L'organogénèse

3.2.1. Effet du milieu de base sucrée

Toutes les microboutures sur le milieu KNOP sucré (30 g/L) prises sur le rameau d'un an, ont développé leurs bourgeons axillaires ou surnuméraires après 10 à 13 jours de la mise en culture.

Pour certaines microboutures, il y a développement simultanément des bourgeons axillaires et surnuméraires.

Les pousses feuillées ainsi obtenues, ont atteint 2 à 3 cm. de long.

3.2.2. Effet des substances phytohormonales

3.2.2.1. Les auxines

Elles jouent un rôle important dans l'induction racinaire chez plusieurs plantes. Elles sont en général incorporées au milieu de culture, cependant ABOTT et WHITELEY (1976), ont procédé à l'immersion de la base des microboutures du Pommier, dans une solution d'AIB pendant 15 mn. à la dose de 1 mg/l. et pendant 8 h à celle de 0,1 mg/l.

Nous avons procédé de même pour l'AIB avec un temps d'immersion de 45 mn à la dose de 10 mg/l.

Aussi nous avons procédé à l'incorporation de l'AIB 1 mg/L, de l'ANA (1 mg/L) et le 2-4 D (10 mg/L) dans le milieu de culture.

Les différentes microboutures prises à la fois sur la partie supérieure ou inférieure de la plante, sur les pousses courtes du rameau d'un an, n'ont donné ni cal ni racines.

3.2.2.2. Combinaisons entre Auxines et la Benzyladenine (Cytokinine)

La réponse indifférente des explants utilisés vis-à-vis des Auxines seules, nous a poussé à essayer de combiner entre l'ANA et la BA. LAVÉE et GLENDA MESSER (1969) ont montré que le tissu du rameau d'un an de l'olivier, sous l'influence d'une Cytokinine (Kinetine) et d'une auxine (ANA, AIA, ou 2.4 D), donne des cals très développés.

Effectivement nous avons obtenu des cals à la base des microboutures de couleur Blanc-crème, entraînant avec le temps la fondaison de l'épiderme à leurs basés.

Les différentes combinaisons essayées sont;

| | | | | | | | | |
|------------|---|-------------|---|------|------|------|-------|-------|
| <u>ANA</u> | ; | <u>1 mg</u> | ; | 2/1; | 4/1; | 4/4; | 10/2; | 16/2. |
| <u>BA</u> | | <u>1 mg</u> | | | | | | |

Dans ces combinaisons, la part de l'ANA est plus importante que celle de BA, dans le but de favoriser la rhizogénèse (Murashige, 1974).

Cependant aucune racine n'a été émise.

3.2.3. Essai avec l'incision à la base des microboutures

Chez certaines variétés, ou espèce d'arbres fruitiers, la difficulté d'enracinement provient de l'existence d'un anneau sclérenchymateux continu qui empêche l'émission racinaire.

OUUGHIRI (1976) a effectivement montré chez la Picholine Marocaine, qu'il existe un anneau sclérenchymateux continu et lignifié dans le rameau d'un an.

La présence de celui-ci, permet d'affirmer que cette variété est à bouturage difficile.

Dans le but de rompre cet anneau, nous avons pratiqué une incision verticale de l'écorce des explants. Ceux-ci sont ensuite ensemencés dans le milieu de culture contenant les diverses combinaisons entre ANA et BA déjà citées précédemment.

Toutes les microboutures ont donné des cals mais sans néoformation de racines.

3.2.4. Effet de la combinaison ANA et BA sur la culture de bourgeons

Des bourgeons excisés sur des microboutures déjà en culture in vitro sur milieu de base, sont ensemencés sur le milieu contenant 1 mg/L de BA et de l'ANA à des doses: 0,1; 1 et 2 mg/L. Les bour-

geons élevés sur milieu contenant 2 mg/L d'ANA et 1 mg/L BA, ont développé des cals à leurs bases mais présentent une croissance végétative très lente.

Les bourgeons cultivés sur 1 mg/L de BA et 0,1 mg/L d'ANA, se sont développés en pousses principales feuillées de 2 cm. de longueur et ont donné naissance à des bourgeons adventifs.

Aucun des explants n'a cependant émis de racines.

Essais sur le matériel juvénile :

Des plantules issues de semis de la variétés Picholine Marocaine, ont été décapitées. Cette partie apicale de 2 cm. de longueur, a étéensemencée sur le milieu de KNOP contenant de l'ANA à différentes doses. La concentration de 1 mg/L d'ANA, a donné le meilleur enracinement 100 % avec 2 ou 3 racines par microbouture. L'apex ayant développé une pousse feuillée de 3 à 4 cm de longueur.

Les racines ont été obtenues 5 à 8 jours après l'ensemencement. Excepté le milieu contenant une dose d'ANA de 0,1 mg/L, tous les explants ont donné des cals avant l'apparition des racines.

La croissance journalière moyenne des racines varie selon les doses d'ANA utilisées:

- 2,4 mn./j pour la dose 0,1 mg/L
- 4,2 mn./j pour la dose 1,0 mg/L
- 3,0 mn./j pour la dose 2,0 mg/L
- 0,6 mn./j pour la dose 6,0 mg/L

4. DISCUSSION

4.1. Les contaminations et oxydations

Ces deux problèmes épineux n'ont pas été retrouvés dans nos essais sur la Picholine Marocaine pour deux raisons.

- 1) Le matériel végétal utilisé provient de la serre
- 2) Les microboutures sont prélevées sur les parties basales et médianes du rameau d'un an seulement.

Ainsi, nous avons pu obtenir des cultures aseptiques à 90 %.

Les brunissements ou exsudats secrétés par les microboutures étaient faibles à cette époque de prélèvement (Janvier, Février et Mars).

4.2. Action des phytohormones appliquées:

Les divers essais que nous avons entrepris avec le matériel adulte, pris sur différentes positions de la plante, étaient indifférents vis-à-vis de l'action des auxines: AIB, ANA et le 2-4-D.

Ces hormones ont été appliquées à diverses doses, qui ont souvent donné des résultats intéressants chez d'autres espèces ligneuses. Le même résultat a été obtenu chez les variétés d'olivier: Cailletier, Tanche et Amygdalolia au cours des essais que nous avons entrepris à Montpellier (1978).

Cependant, les diverses combinaisons entre l'auxine (ANA) et la cytokinine (6-Benzyladenine), ont stimulé une prolifération cellulaire à la base des microboutures. Une dose d'ANA élevée que celle de BA, semble nécessaire pour avoir des cals. Ce résultat rejoint ce qu'ont apporté LAVÉE et GLENDA MESSER (MESSER) «1969», sur le tissu cambial du rameau d'un an d'olivier. Toutefois aucune néoformation de racine n'a été obtenue.

Bien que la formation des cals est tout à fait indépendante de l'apparition des racines, ARGLES (1959) cité par OUDGHIRI (1976), rapporte qu'il y a complémentarité entre les deux types de formations.

OUDGHIRI (1976) a cependant mis en évidence l'effet mécanique des cals dans la désorganisation et la déchirure de l'anneau sclérenchymateux qui présente chez la Picholine Marocaine une barrière anatomique pour l'apparition des racines.

En ce qui concerne l'émission racinaire, MURASHIGE (1977) suggère que le processus de l'organogénèse, peut être exalté à l'aide d'un équilibre entre auxines et cytokinines dans le milieu de culture.

WIGHTMANN et al (1976) apportent que l'initiation des primordia-racinaires nécessite un rapport faible de cytokinine sur auxine. Mais la difficulté réside dans la détermination de cet équilibre hormonal qui varie selon les espèces végétales et au sein d'une variété elle-même.

4.3. Effet probable de substances endogènes

Le travail effectué à la fois sur le matériel juvénile et le matériel adulte, nous apporte un élément comparatif entre les réactions de chacun vis-à-vis de l'auxine.

En effet, la réponse favorable d'explants jeunes à l'auxine, laisse supposer l'existence de cofacteurs rhizogènes chez les jeunes plantes et leur absence chez le matériel adulte.

HESS (1962) a pu isoler des cofacteurs rhizogènes chez les plantes juvéniles des *Hedera Helix* et a montré qu'ils favorisent l'enracinement des boutures adultes en synergie avec l'auxine.

BIRAN et HALEVY (1973) ont montré que la difficulté d'enracinement observée chez les rameaux adultes, les pousses reproductrices et chez certains cultivars de *Dahlia*, est due à des inhibiteurs qui proviennent du système racinaire de la plante. Ils ajoutent que l'activité inhibitrice est plus importante dans les exsudats sécrétés par les explants à enracinement difficile que dans ceux qui sont faciles.

Cette affirmation nous laisse supposer la présence d'inhibiteurs à la rhizogénèse dans les microboutures du rameau d'un an de

l'olivier. Cependant ce même matériel s'enracine en serre sous «mist». Il semble que l'écoulement de l'eau le long de la bouture provenant du «mist» draine ces inhibiteurs, loin de la zone d'émission racinaire, ce que ne le permet pas le milieu gélosé en tube à essais qui emprisonne les exsudats secrétés.

DURAND, GRESSWEL et NITSCH (1977) rapportent que les oxydations des polyphénols contenue dans les exsudats des microboutures d'Eucalyptus inhibent la germination des graines de Gresson et l'enracinement des microboutures de Tomate.

Nature de l'explant

L'explant que nous avons utilisé est une microbouture à un nœud d'une taille de 2 cm. environ. En bouturage herbacé, on utilise des boutures feuillées d'une taille plus grande d'environ 17 cm. Cette différence de taille et l'absence de feuilles dans notre cas, peut avoir une influence sur la réussite de la culture. Les explants en grande dimension se trouvent plus riche en réserves nutritives et phytohormones endogènes précurseurs de la rhizogénèse.

Chez les Citrus, les greffons d'apex en grande dimension réussissent mieux que ceux d'une petite taille (NAVARRO et COLL, 1975). En outre, la présence de feuille sur les boutures augmente la qualité de racines néoformées sur olivier et citrus (HARTMANN et KESTER, 1968). Des cofacteurs d'enracinement semblent être synthétisés au niveau des feuilles telle que la rhizocaline.

Présence de l'anneau sclérenchymateux

La pratique de l'incision verticale à la base des microboutures pour désorganiser l'anneau sclérenchymateux était sans effet. Ceci laisse supposer, qu'autres que l'anneau, des facteurs plus déterminants empêchent l'émission des racines.

Epoque de prélèvement

Nous avons effectué nos prélèvements pendant la saison hivernale, celle-ci semble ne pas être parmi les périodes favorables à l'enracinement in vivo (bouturage herbacé).

HARTMANN et LORETI (1965) suggèrent que les meilleurs résultats d'enracinement pour l'olivier, sont obtenus pendant les mois de juin et juillet. Tandis que MAILLARD (1975) conseille les périodes du 15 mars au 15 avril et du 15 juillet au début septembre.

Enracinement chez les microboutures juvéniles

Les explants élevés sur 1 et 2 mg /L d'ANA semblent avoir un meilleur enracinement que les autres. Ils présentent une vitesse de croissance rapide et leurs racines sont plus nombreuses et plus grosses que celles des explants élevés sur la dose 0,1 mg/L. Une dose élevée de 6 mg/L d'ANA donne de grosses racines sur des microboutures qui présentent une croissance racinaire lente.

5. CONCLUSION

La mise au point de la technique de micropropagation chez l'olivier semble encore entravée par des difficultés émanant du matériel végétal et d'autres facteurs, qu'il reste à étudier d'une manière approfondie.

Notre contribution dans cette étude sur la Picholine Marocaine a permis de relever l'aspect de certains facteurs que nous avons pu étudier avec les possibilités qui nous ont été offertes.

1) Chez le matériel adulte, le milieu de base sucré s'avère favorable au développement de bourgeons axillaires et surnuméraires en pousses feuillées.

2) Les diverses combinaisons entre l'ANA et la BA ont provoqué une prolifération cellulaire ou cals à la base des microboutures.

Nous pensons qu'un rapport optimal de ces deux phytohormones, qui est à rechercher profondément, pourrait être une issue à l'aboutissement à l'enracinement.

3) La réponse favorable du matériel juvénile à l'action de l'auxine seule d'une part et l'aptitude rhizogène du rameau d'un autre part, laisse supposer la présence d'inhibiteurs dans les exsudats sécrétés par les explants dans la gélose qui peuvent agir par l'inactivation des auxines ou des cofacteurs rhizogènes.

4) La réussite de la technique sur le matériel juvénile n'offre pas une solution au problème de la micropropagation, cependant elle projette notre attention sur un autre matériel aux caractères juvéniles, qui serait plus utile en micropropagation, c'est le rejet à la base des plantes adultes d'après NATIVIDADE (1957) ce matériel répond facilement à la rhizogénèse. Les rejets ainsi caractérisés semble nous offrir un type de matériel sur qu'il est intéressant d'entreprendre de nouvelles recherches.

RESUME

L'objectif de cette étude est d'essayer d'améliorer les techniques de multiplication intensives de l'oliver variété Picholine Marocaine par les techniques de cultures in vitro.

Les explants à nœuds de 2 à 3 cm de long pris sur le rameau de l'année pour le matériel végétal adulte et la partie apicale de la plantule pour le matériel juvénile.

Les conditions de cultures sont: 16 heures d'éclairement par jour à une intensité de 0,005 W/cm² et à la température de 27°C le jour et de 23°C la nuit.

Le milieu de culture employé est celui de Knop dilué de moitié avec les microéléments de Heller.

Une prolifération de cals à la base des microboutures a été obtenue avec l'association d'auxine (ANA) et de cytokinine (B.A.). Cependant le milieu de base sucré seul induit un développement de bourgeons axillaires ou surnuméraires à la fois de 2 à 3 cm de longueur en 2 à 3 semaines de culture.

Le matériel juvénile s'est montré facile à donner des racines sous l'action de l'ANA en faible dose.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es tratar de mejorar las técnicas de multiplicación intensiva del olivo, variedad Picholine Marocaine, mediante las técnicas de cultivo in vitro.

Los explantes utilizados eran microesquejes de 1 nudo de 2 à 3 cm de largos tomados de ramas del año para el material vegetal adulto y de la parte apical de la plantula para el material juvenil.

Las condiciones de cultivo fueron: 16 horas de luz al dia con una intensidad de 0,005 W/cm² y a una temperatura de 27°C durante el dia y de 23°C por la noche.

El medio de cultivo empleado fué el de Knop diluido a la mitad con los microelementos de Heller.

Se obtuvo una proliferación de callos en la base de los microesquejes con la asociación de auxina (ANA) y de citokinina (BA). Sin embargo el medio básico azucarado por si solo indujo un desarrollo de brotes axilares ó supernumerarios simultáneamente de 2 à 3 cm de longitud a las 2 ó 3 semanas de cultivo.

El material juvenil se mostró con facilidad para dar raíces bajo la acción del ANA a dosis pequeñas.

SUMMARY

This work tries to improve the olive propagation techniques by means of in vitro culture.

One node microcuttings, 2-3 cms. in length, have been used. The material was taken from 1 year old shoots in the case of adults plants and from the plant apical part when working with juvenil plants. The growing conditions were as follow: 16 hour photoperiod with a light intensity of $0,005 \text{ w/cm}^2$, the temperature being 27°C during day hours and 23°C during dark time. The knop's culture medium diluted to half of the keller's microelements was used.

Callus proliferation was obtained in the cutting bases hen auxin (ANA) and cytokinin (BA) were added. However the basic sugar medium induced the development of 2-3 cms. long axillary or supernumerary shoots after 2-3 weeks of culture. The juvenil material showed easy to root at little ana doses.

BIBLIOGRAPHIE

- ABBOTT A.T. et WHITELEY E., 1976 : Culture of Molus tissues in vitro. Multiplication of apple plants from — isolated shoot apice. *Scientia Horticulturae*, 4; 183-189 pp.
- ALSKIEF J., 1978 : La micropropagation in vitro de quelques arbres fruitiers. Thèse phytotechnie, présentée à l'université des Sciences et Techniques du Languedoc à Montpellier 134 p.
- BIRAN I. and HALEVY A., 1973 : Endogenous levels of Growth regulators and their relationship to the rooting of dahlia cuttings. *Physiol plant* 28, 436-442 pp.
- BOULOUHA B., 1978 : Contribution à l'étude des possibilités d'application à l'olivier (*olea Europea L.*) des techniques de micropropagation. D.E.A. Phytotechnie — Université des Sciences et Techniques du Languedoc — Montpellier, 79 p.
- DURAND — CRESSWELL and NITSCH C., 1977 : Facteurs influençant la régénération de l'*Eucalyptus grandis* à partir d'un organe de culture. *Acta Hort.* 78: 149-155 pp.
- GAUTHERET R.J., 1959 : La culture des tissus végétaux. Techniques et réalisations. Ed. Masson et Cie. Paris, 862 p.
- HARTMANN H.T. and LORETI F., 1965 : Seasonal variation in rooting leafy olive cutting under mist. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 87, 194-197 pp.
- HARTMANN H.T. and KESTER, DE, 1968 : Plant propagation principles and practices Ed. Prentice Hall. Inc. Englewood Cliffs. N.J. Second Edition: 702 p.
- HESS C.E., 1962 : A physiological analysis of root initiation in easy and difficult to root cuttings. In XVI th. Int. Hort. Congr. 4: 375-381 pp.
- LAVEE S. and GLENDA MESSER, 1969 : The effet of growth-regulating substances and light on olive callus growth in vitro. *J. Exp. Bot.* 20 : 604-624 pp.
- MAILLARD R., 1975 : Botanique — Olivier Invuflec, 19-34 pp
- MURASHIGE T., 1974 : Plant propagation tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25 ; 135 — 166 p.
- MURASHIGE T., 1977 : Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Acta Horti.* 78 : 17-30 pp.

- NATIVIDADE J.V., 1957 : Jovenilidada na olea Europea L. Agron. Lus. 19 (2), 145-159 pp.
- NAVARRO L. and ROISTACHIER C.N. and MURASHIGE T., 1975 : Improvement of shoot tip grafting in vitro for virus fres citrus J. Amer. Soc. Hort. Sci. 100: 471-479 pp.
- OUUGHIRI J.M., 1976 : Multiplication de l'olivier (Olea Europea L. Var. Picholine Marocaine) par bouttutage herbacé. Mémoire présentée en vue d'obtention du titre d'assistant. Chaire d'Horticulture, Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès — Maroc.
- WIGHTMANN, and THIMANN K.V., 1976 : Hormonal regulation of lateral root initiation in pisum sativum. Plant. Physiol, 57 (5) Supplément 52 p. n° 277.