

## Variability of the root morphogenetic response of 'Garnem' rootstock microcuttings (*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*) to exogenous auxins and its impact on their acclimatization survival

### Variabilité de la réponse morphogénétique racinaire des vitropousses du porte-greffe 'Garnem' (*Prunus persicax Prunus amygdalus*), à l'égard des auxines exogènes et incidence sur leur survie en acclimatation

NOURA JEMAI<sup>(1,2)</sup>, KAOUTHER BEN MAHMOUD<sup>(2)\*</sup>, MOHAMED FAKHRI KSOURI<sup>(1)</sup>, EMNA JEDIDI<sup>(2)</sup>, AHMMED JEMMALI<sup>(2)</sup>, CLAIRE KEVERS<sup>(3)</sup>

<sup>1</sup> Institut National Agronomique de la Tunisie, 43 Avenue Charles Nicolle, 1082, Tunis. Université de Carthage, Tunisie.

<sup>(2)</sup> Institut National de la Recherche Agronomique de Tunisie, Rue Hédi Karray, 1004 El Menzah. Université de Carthage, Tunisie.

<sup>(3)</sup> Département des Sciences de la vie. Université de liege, Sart Tilma B-22. B 4000 liège, Belgique.

\*Corresponding author: kaouterbenmahmoud@gmail.com

**Abstract** - The survival of vitro plants in acclimatization seems to partially depend on the quality of their in vitro-developed root system. This quality may be influenced by the culture medium and more particularly by the added auxin, with IBA and NAA being frequently used in the in vitro rooting of these rootstocks. This work aimed to study the impact of these two auxins on root morphogenesis and their incidence on the success of plantlet acclimatization under optimal conditions. The adopted methodology is based on the morphological characterization as well as the anatomical description of the structural changes caused by the two auxins. Besides the effect of the agar medium on the general structure of the root compared to the *in vivo* control, IBA and NAA seem to affect drastically the morphogenetic response of the roots. Nevertheless, more hypertrophied and shorter roots were observed with NAA than with IBA. In both cases, incomplete cell differentiation resulted in an extended cortex and a reduced stele, but this dysfunction was less marked with IBA resulting in a greater survival rate of plantlets in acclimatization. These results confirmed the role played by auxins in root development and more particularly on their functionality and its incidence on the plant survival during acclimatization. Regarding the structural difference between IBA and NAA molecules, better interpretation of these results, may require establishment of a possible correlation between their metabolism *in planta* and above mentioned effects.

**Keywords:** peach, almond, rootstock, Garnem, in vitro rooting, auxins, acclimatization.

**Résumé**- Bien que la phase d'enracinement *in vitro* des porte-greffes d'arbres fruitiers soit largement maîtrisée sur le plan quantitatif, la survie des vitroplants à l'acclimatation semble dépendre, en partie, de la qualité de leur système racinaire formé *in vitro*. Cette qualité peut être influencée par le milieu de culture et plus particulièrement par l'auxine ajoutée dont l'AIB et l'ANA fréquemment utilisées dans l'enracinement *in vitro* de ces porte-greffes. L'objectif de ce travail est d'étudier l'impact de ces deux auxines sur la morphogenèse racinaire et leur répercussion sur la réussite de l'acclimatation des plantules en conditions optimales. La méthodologie est basée sur la caractérisation morphologique apparente ainsi que sur la description anatomique des modifications structurales engendrées par les deux auxines. Mis à part l'effet du milieu gélosé sur la structure générale de la racine comparativement au témoin cultivé *in vivo*, l'AIB et l'ANA peuvent affecter drastiquement la réponse morphogénétique des racines, mais les anomalies sont plus marquées avec l'ANA où les racines étaient plus hypertrophiées et plus courtes qu'avec l'AIB. Dans les deux cas, la différenciation cellulaire incomplète donne lieu à un cortex large et une stèle réduite. Cependant, la désintégration des tissus vasculaires chez les plants traités à l'ANA semblent être à l'origine de leur plus faible taux de survie en acclimatation qu'avec l'AIB. Ces



résultats confirment le rôle joué par les auxines dans le développement des racines et plus particulièrement sur leur fonctionnalité et son incidence sur la survie des plants à l'acclimatation. Sachant que l'AIB et l'ANA sont deux molécules structurellement assez différentes, une meilleure interprétation des résultats obtenus reposerait sur l'établissement d'une éventuelle corrélation entre leur métabolisme *in planta* et les effets sus-indiqués.

---

**Mots clés:** pêcher, amandier, porte-greffe, Garnem, enracinement *in vitro*, auxines, acclimatation.

---

## 1. Introduction

*In vitro* comme *in vivo*, l'obtention d'une plante est régie par le processus complexe de croissance et développement. Chez les végétaux en général et les arbres en particulier, ce processus est accompli grâce à la double intervention de matières dites « plastiques » (glucides, lipides et protides) élaborées notamment lors des multiples réactions de la photosynthèse, et de matières dites « oligodynamiques » de nature variée, qui ont la même origine que les premières mais qui interviennent à très faible dose comme agents stimulateurs de la croissance et organisateurs de la matière vivante (Roussel 1973).

Parmi ces matières oligodynamiques, une place à part doit être faite aux auxines et tout spécialement à l'AIA (acide  $\beta$  indole acétique:  $C_{10}H_9NO_2$ ), première auxine naturelle identifiée chez les plantes.

Une étude faite par Epstein et Ludwig-Muller (1993) sur la biosynthèse, le métabolisme et le transport des auxines a révélé qu'en plus de l'AIA, l'AIB (acide indole butyrique :  $C_{12}H_{13}NO_2$ ) est également synthétisé par les plantes, mais sa concentration à l'état libre ou conjugué reste plus faible que celle de l'AIA. Il est cependant admis que l'AIB exogène a une meilleure action promotrice de l'enracinement que l'AIA exogène puisque (i) l'AIB est converti en AIA qui s'accumule à la base des boutures avant le démarrage de l'enracinement, (ii) l'AIB et ses conjugués sont plus résistants à l'oxydation (donc à la désactivation) que l'AIA et ses conjugués et (iii) le niveau d'AIB total (libre et conjugué) reste plus élevé que celui de l'AIA par suite de leur métabolisation dans les tissus. L'étude du transport de ces deux auxines a montré qu'il a lieu selon une direction basipète (transport polarisé) avec une plus grande vitesse pour l'AIA.

Certaines données génétiques publiées par Zolman et al. (2000) suggèrent que les activités auxiniques attribuées à l'AIB viennent, en fait, de sa conversion en AIA qui semble jouer l'action auxinique directe sur le processus biologique en question comme celui de l'induction racinaire, quelle que soit sa provenance, par hydrolyse de ses conjugués qui lui servent d'une forme de réserve ou par conversion de l'AIB (Simon et al. 2013).

En culture de tissus, l'apport exogène d'auxines aux milieux de culture est généralement associé à l'amélioration de la croissance, la prolifération des cals et l'induction des racines adventives. Cet apport et plus particulièrement celui des auxines de synthèse telles que l'ANA (acide  $\alpha$ -naphthalène acétique dont la formule  $C_{12}H_{10}O_2$  contient un noyau naphthalène au lieu d'un noyau indole chez l'AIA et l'AIB), ne semble pas affecter négativement la voie de biosynthèse de l'AIA à travers laquelle s'accomplit le rôle des auxines exogènes (Ribnicky et al. 1996). Comme l'AIB, l'ANA est souvent plus utilisé en culture des tissus que l'AIA, tout simplement parce qu'il résiste mieux à la photo-destruction ou à l'oxydation dans le milieu de culture avant son intégration dans les tissus. L'ANA n'est pas comme l'AIB converti en AIA, mais il semble interagir avec ce dernier en lui permettant de garder une certaine homéostasie dans les tissus par la régulation de son métabolisme (Tuli et Moyed 1969) en favorisant la formation de conjugués phénoliques d'AIA physiologiquement actifs qui améliorent l'induction d'ébauches racinaires (Goren et Bukovac 1973). L'induction primaire (les premières heures) des racines adventives *in vitro* sur des microboutures excisées à leur base, est provoquée par la rupture du continuum vasculaire qui est à l'origine de l'accumulation des auxines endogènes au niveau de la blessure. L'indépendance de cette réaction précoce de l'apport d'auxines exogènes, n'empêche pas l'implication de ces dernières dans la néoformation des racines adventives en stimulant les divisions mitotiques au sein du cambium et l'activité sucrolytique à la base des microboutures (Agullo-Anton et al. 2013). Bien que ce rôle des auxines exogènes soit à l'origine des succès prodigieux obtenus dans l'enracinement des végétaux dont ceux les plus récalcitrants, leur efficacité reste tributaire de nombreux facteurs qui sont principalement liés au génotype et à l'auxine utilisée (nature et concentration). Notons par ailleurs que l'excision des explants et leur mise en culture *in vitro* les soustrait du contexte d'inhibition corrélative de la plante entière et les met dans un nouveau contexte moins contrôlé qui constitue un terrain favorable à l'apparition d'anomalies diverses dans la descendance (Jemmali 1994). Parmi les anomalies pouvant intéresser notre étude, on peut citer celles observées par Moreira et al. (2000) chez *Gomphrenamacrocephala* où les microboutures traitées par 10 mg/l d'AIB ont développé des racines à système vasculaire altéré et à cellules corticales hypertrophiées. De telles anomalies peuvent contribuer

à la fragilisation des vitroplants et nuire à leur survie en phase d'acclimatation, phénomène qui serait également à l'origine des mortalités fréquentes observées dans le cas du porte-greffe « Garnem » sélectionné à SIA-DGA Saragosse en Espagne pour le greffage de l'amandier et du pêcher dans le bassin méditerranéen (Felipe et al. 1995).

Afin de vérifier si des anomalies racinaires de ce genre pouvaient effectivement être engendrées chez ce même porte greffe par des auxines exogènes ajoutées au milieu d'enracinement, nous avons mené la présente étude avec l'AIB et l'ANA en insistant plus sur la nature de l'auxine que sur sa concentration. L'incidence de cet effet sur la survie des plantules a également été analysée en phase d'acclimatation où la culture est faite sur de la tourbe stérilisée afin d'éliminer l'origine pathologique très probable de ses mortalités dont nous avons identifié les champignons responsables (Jemaietal. 2019).

## **2. Matériel et Méthodes**

### **2.1. Matériel végétal**

Le matériel végétal de départ est constitué de vitropousses en phase de prolifération du porte-greffe de pêcher et d'amandier 'Garnem', gracieusement fourni par la société Promag Mabrouka - Tunisie.

### **2.2. Conditions de culture**

La mise en culture des vitropousses et les repiquages ultérieurs sont effectués aseptiquement sous hotte à flux laminaire. L'élevage se déroule dans une chambre de croissance sous une photopériode de 16h/8h et à une température de  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La lumière d'une intensité de  $36 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  est fournie par des tubes fluorescents (Sylvania GroLux).

### **2.3. Etapes de culture**

#### **2.3.1. Enracinement**

Des touffettes de tiges récupérées en fin de phase de prolifération sont séparées en pousses individualisées et celles ayant au moins 1,5 cm de longueur sont transférées sur le milieu d'enracinement. Elles sont d'abord incubées dans la chambre de culture à l'obscurité totale pendant les 7 premiers jours avant de passer à la lumière sous les mêmes conditions de culture sus-indiquées.

Afin d'étudier l'effet comparatif des deux auxines et à une même concentration molaire ( $2.5 \mu\text{M}$ ), l'essai comporte deux milieux d'enracinement de base MS avec AIB (M1) et ANA (M2). L'effet auxinique est évalué en fin de phase (après 4 semaines) d'enracinement à travers le taux d'enracinement (%), le nombre moyen de racines par plantule, la longueur moyenne des racines par plantule (cm) et d'autres non quantitatifs basés sur la morphologie et l'anatomie des racines.

#### **2.3.2. Acclimatation**

Les vitroplantules enracinées sont transférées, chaque traitement à part, dans des containers en plastique désinfectés remplis de tourbe noire autoclavée. Les containers ainsi plantés sont hermétiquement couverts d'un film plastique transparent de  $50 \mu\text{m}$  d'épaisseur avant d'être placés dans un phytotron avec une humidité relative d'environ 80% et une température de  $27^{\circ}\text{C}$  le jour et  $18^{\circ}\text{C}$  la nuit, sous une photopériode de 16 h/8 h (jour/nuit) avec une intensité lumineuse d'environ  $84 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  pendant la phase claire. Le film plastique est progressivement soulevé à partir du 15<sup>ème</sup> jour afin d'éviter le flétrissement des plantules par une baisse brutale de l'humidité relative.

Le nombre définitif de plantules ayant survécu à cette phase est relevé après 6 semaines.

### **2.4. Histologie**

Les échantillons (racines attachées à un fragment de la partie basale de la tige) sont imprégnés, pendant 24 heures, dans un fixateur FAA (formaldéhyde, acide acétique glacial, alcool absolu 2:1:1 v/v). La déshydratation des tissus se fait dans une série de bains d'alcool à concentrations croissantes ( $50^{\circ}$  ;  $70^{\circ}$  et  $100^{\circ}$ ), suivis d'un bain de xylène/alcool et de deux bains successifs de xylène. Les échantillons inclus dans la paraffine sont sectionnés à  $10 \mu\text{m}$  d'épaisseur à l'aide d'un microtome Leica (RM2125RT).

Les coupes ainsi obtenues subissent une double coloration. D'abord à l'hématoxyline (Regaud) 0.5% pour la révélation des parois cellulaires, des noyaux et des nucléoles, puis à la safranine (Riedel de haën) 2% permettant la coloration des faisceaux vasculaires.

Les observations sont effectuées sous microscope optique (Leica DMLB2) et les microphotographies sont prises à l'aide d'un appareil photo numérique (Canon S50).

## 2.5. Dispositif expérimental et analyse statistique

L'expérience est conduite selon un dispositif expérimental aléatoire complet comportant deux traitements auxiniques répétés 5 fois chacun, avec un nombre de 10 plantules par répétition. Les données recueillies sont analysées au moyen du logiciel «SPSS» (version .20). La comparaison des moyennes des réponses quantitatives des vitropousses à la rhizogenèse, est effectuée par le test Duncan ( $p < 0.05$ ).

## 3. Résultats

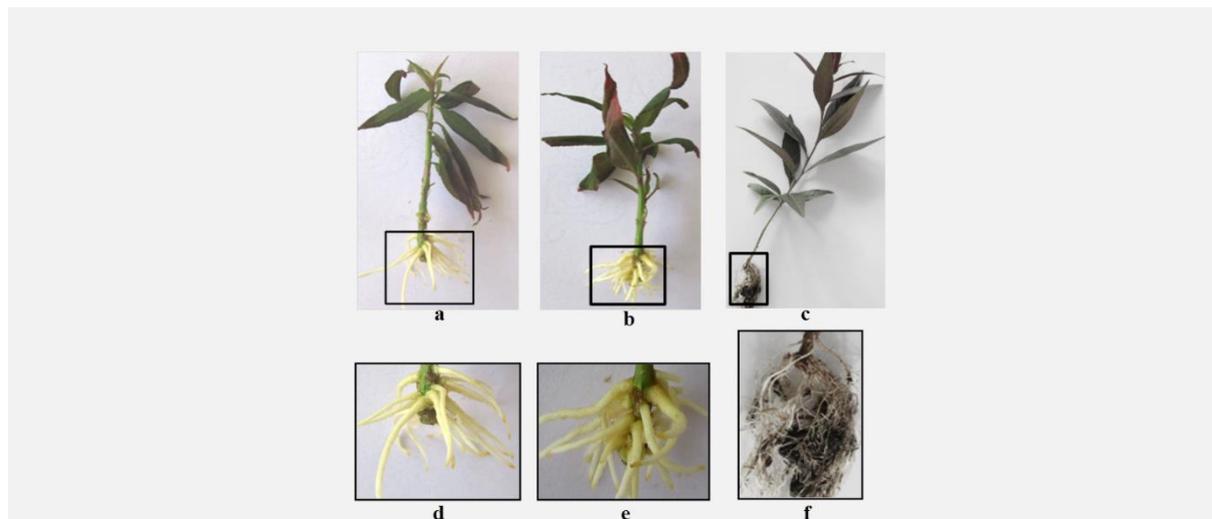
### 3.1. Phase d'enracinement

#### 3.1.1. Réponses morphologiques qualitatives

##### a. Aspect extérieur des racines

Sans pour autant faire de mesures précises sur cette partie végétative de la plante soumise aux différents traitements auxiniques, nous pouvons remarquer à travers les photographies prises en fin de phase d'enracinement (Figure 1a,b), que le développement caulinaire n'a pas été notablement affecté par le type d'auxine utilisée. Au contraire, l'allure a complètement changé *ex-vitro* (Figure 1c) pour les deux parties de la plante dont les feuilles ne présentent plus les malformations et les traumatismes observés *in vitro* alors que les racines deviennent plus fines et ramifiées.

Un zoom réalisé sur ces racines (Figure 1 d,e,f), illustre plus nettement les différences générées par les traitements auxiniques, puisqu'en présence d'ANA à  $2.5 \mu\text{M}$  les racines se montrent plus hypertrophiées et à surface plus rugueuse. Ces anomalies s'étendent jusqu'à la partie terminale de la racine dont l'apex méristématique qui est moins élancé que celui de l'AIB, également affecté par l'hypertrophie, et certainement moins que le témoin. L'absence de racines secondaires est un trait commun aux vitroplantules traitées à l'AIB et à l'ANA. Le système racinaire témoin est, par contre, très ramifié faisant preuve d'un fonctionnement normal.



**Figure 1.** Aspect des vitroplantules du porte-greffe 'Garnem', en fin de phase d'enracinement sur milieu de culture additionné de  $2.5 \mu\text{M}$  d'AIB (a) ou d'ANA (b) avec comme témoin un vitroplant en phase d'élévation après acclimatation (c). Zoom (encadré) sur la partie racinaire de chaque traitement, respectivement (d), (e) et (f).

##### b. Aspect anatomique des racines

Eu égard à ces différences morphologiques apparentes, l'exploration au niveau anatomique devrait apporter des indications plus précises sur le rôle spécifique joué par l'auxine utilisée. Néanmoins, pour une comparaison cohérente, l'analyse a porté sur des coupes transversales réalisées toutes dans la partie proximale (à proximité de la tige) de la racine qui constitue la zone la plus âgée et donc la plus différenciée sur le plan cytologique. Cette analyse comparative faisant l'objet des micrographies de la figure 2 porte sur trois niveaux, la structure générale de la racine (G x 200), la structure de la stèle (s) (G x 400) et l'aspect cellulaire au sein de la stèle et du cortex (c) (G x 1000).

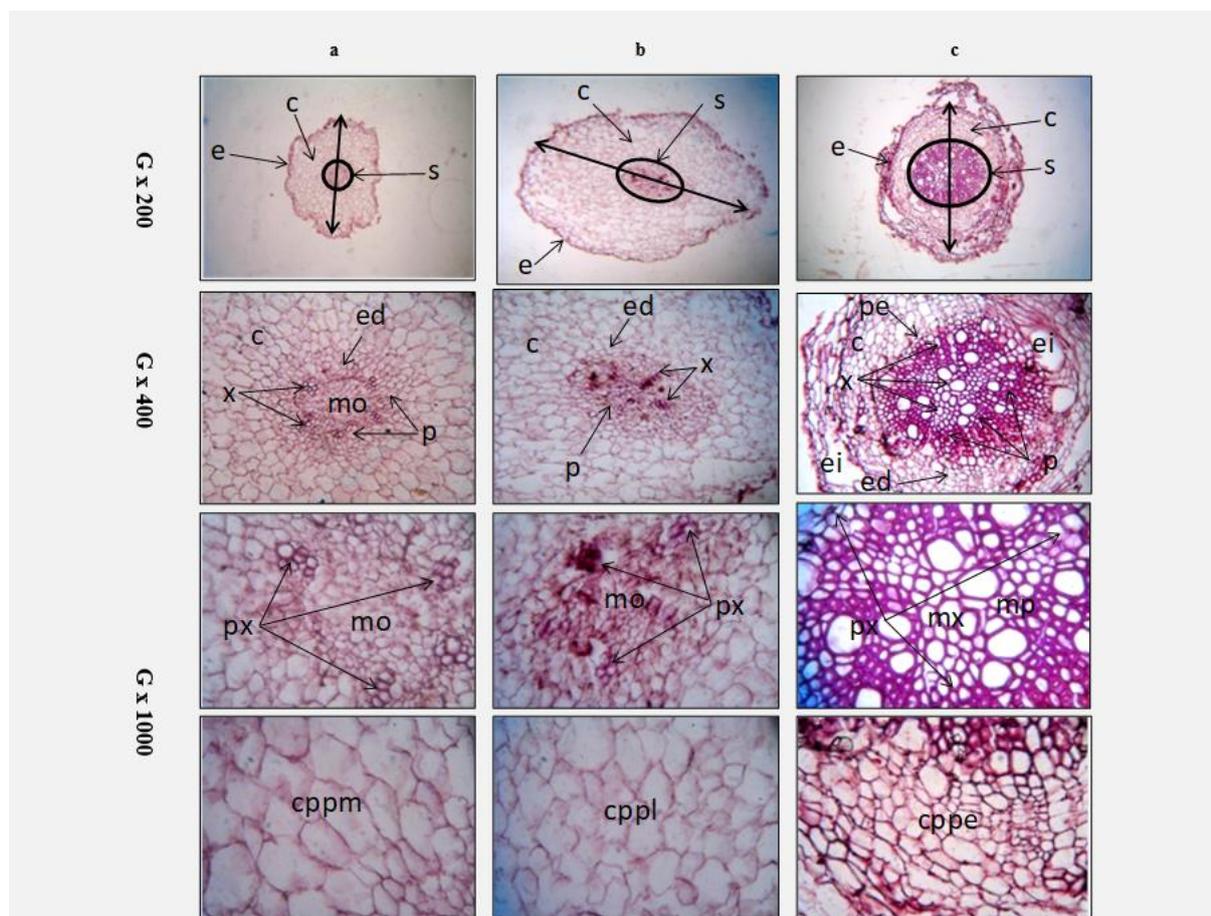
- Au premier niveau, l'effet le plus remarquable réside dans la réduction du rapport diamètre de la stèle/diamètre total de la racine dans le cas des microboutures cultivées sur un milieu gélosé et ce, indifféremment du traitement auxinique (Figure 2a,b). Dans ce cas, le rapport oscille autour de 25% alors qu'il atteint près de 50% chez le témoin (Figure 2c) dont l'épiderme (e) montre, à lui seul, une certaine desquamation qui a lieu sous l'effet de la maturation des tissus à cet endroit dont le système vasculaire est en état de différenciation avancée. Le second effet notoire se traduit par la forme ovoïdale prise par

la stèle dans le cas du traitement par l'ANA (Figure2b) alors qu'elle conserve son allure circulaire dans le cas de l'AIB comme chez le témoin.

- Au second niveau, l'accent est mis sur la stèle et son système vasculaire vu le rôle vital que joue ce dernier dans le fonctionnement de la racine. La photographie correspondante réalisée au grossissement G x 400, révèle des changements conséquents au niveau de ce tissu. A cet effet, la stèle de type protostélisque observé chez le témoin (Figure2c) dont le xylème (x) bien différencié remplit le centre de la racine, prend avec l'AIB (Figure2a) une allure tubulaire dont le centre occupé par des cellules parenchymateuses rappelle une moelle (mo) entourée par les faisceaux xylémiens. Avec l'ANA, la situation est plus complexe car le système vasculaire semble être altéré (Figure2b) et ne permet pas une délimitation précise des différentes parties de la stèle.

Une autre incidence commune cette fois-ci aux deux traitements auxiniques, consiste en l'absence de péricycle (pe) autour de la stèle, qu'on retrouve par contre plus nettement chez le témoin. Concernant la partie corticale, elle est nettement plus large que la stèle dans les cas de l'AIB et de l'ANA, et est constituée de cellules parenchymateuses quasi-semblables, depuis l'épiderme (e) jusqu'à l'endoderme (ed) surtout avec l'ANA. Par contre, le cortex chez le témoin est bien organisé en ses différents compartiments classiques avec des cellules dont le degré de différenciation (grande taille) va en diminuant de l'extérieur vers l'intérieur. Dans ce dernier cas, le cortex se distingue, entre autres, par la présence d'espaces intercellulaires (ei) schizogènes symétriquement arrangés dans le cortex.

- Au troisième niveau, le gros plan (G x 1000) fait sur le centre de la stèle d'un côté et le cortex de l'autre, montre que, mis à part l'effet de la rhizosphère ici constitué par le support gélosé, l'aspect des cellules et leur organisation dans ces deux compartiments ont été drastiquement affectés par les deux traitements auxiniques. Par analogie avec le témoin, les modifications relevées consistent surtout en un manque de spécialisation structurale qui se manifeste par l'absence de compartimentation évidente aussi bien au sein de la stèle que du cortex surtout en présence d'ANA. S'agissant de la stèle, ces modifications structurales touchent le cylindre central dont le xylème et le phloème (p) sont réduits à des restes de faisceaux vasculaires au stade primaire de protoxylème (px) et de protophloème (pp) respectivement (Figure2a, b). Il n'ya donc pas eu de différenciation centripète en métaxylème (mx) et en métaphloème (mp) comme dans le cas du témoin (Figure 2c) qui se distingue aussi des deux autres traitements par la présence du péricycle (pe) autour du cylindre central. De telles modifications prennent une allure tératologique dans le cas de l'ANA où les faisceaux du xylème et du phloème sont presque entièrement dégradés et anarchiquement répartis dans la stèle (Figure2b). Pour sa part, le cortex dont le tissu montre une nette compacité conférée par des cellules parenchymateuses (cp) à paroi épaisse (pe) chez le témoin, montre une configuration moins compacte, avec des cellules largement vacuolisées et à paroi mince (pm) sous AIB (Figure2a) et à paroi lâche (pl) sous ANA (Figure2b).



**Figure 2.** Coupes transversales montrant l'effet du traitement auxinique sur l'aspect anatomique des racines adventives des microboutures du porte greffe 'Garnem' après 4 semaines de culture sur le milieu MS additionné de 2.5 µM d'AIB (a) ou d'ANA (b), en comparaison avec des racines témoin formées in vivo (c). Abréviations : épiderme (e), endoderme (ed), Cortex (c), espaces intercellulaires (ei), stèle (s), péricycle (pe), xylème (x), phloème (p), protoxylème (px), protophloème (pp), métaxylème (mx), métaphloème (mp), moelle (mo), cellules parenchymateuses (cp), paroi épaisse (pe), paroi mince (pm), paroi lâche (pl).

### 3.1.2. Réponses quantitatives (Tableau1)

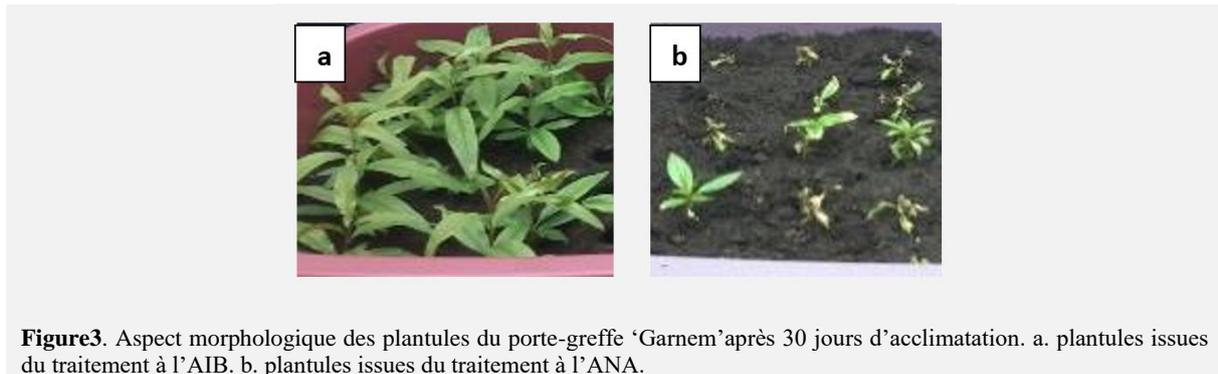
Quel que soit le paramètre quantitatif analysé, le milieu M1 enrichi en AIB fournit les meilleures réponses. La totalité des pousses (100%) ont développé des racines quelle que soit l'auxine utilisée, avec une légère précocité de 3 jours (10 contre 13) de l'émission racinaire chez les pousses traitées à l'AIB (M1). Le nombre moyen de racines par plantule a aussi été significativement (15 racines/plantule,  $p \leq 5\%$ ) supérieur avec l'AIB (M1) par rapport à l'ANA (M2 ; 6 racines/plantule). En ce qui concerne la longueur moyenne des racines/plantule, l'AIB occupe toujours la première place avec une différence significative ( $p \leq 5\%$ ) de l'ordre de 25% par rapport à l'ANA (M2).

**Tableau 1.** Effet du traitement auxinique sur les paramètres morphométriques de l'enracinement des microboutures du porte-greffe 'Garnem'. M1: MS + 2.5 µM AIB; M2: MS + 2.5 µM ANA

Milieu d'enracinement	Taux d'enracinement	Nombre moyen de racines/plantule	Longueur moyenne des racines/plantule
M1	100%	15,3 <sup>a</sup>	2,46 <sup>a</sup>
M2	100%	6,25 <sup>b</sup>	0,62 <sup>b</sup>

### 3.2. Phase d'acclimatation

En dépit d'une reprise quasi-similaire des plantules au début de cette phase, nous avons pu constater, surtout après l'enlèvement de la couverture plastique, un dessèchement qui affecte celles issues du traitement à l'ANA. Après environ 4 semaines (Figure 3a,b), le dessèchement des plantules traitées à l'ANA (b) est devenu plus marqué et on ne compte plus qu'environ 5% de survivants dont le développement est également réduit. En revanche, les plantules issues des traitements à l'AIB (a) ont montré un taux de reprise beaucoup plus significatif qui atteint les 80% avec un développement caulinaire et foliaire sans défaut majeur.



**Figure3.** Aspect morphologique des plantules du porte-greffe 'Garnem' après 30 jours d'acclimatation. a. plantules issues du traitement à l'AIB. b. plantules issues du traitement à l'ANA.

#### 4. Discussion

L'environnement particulier de la culture *in vitro* fait que la plante y éprouve un comportement qualifié d'hétérotrophe puisqu'elle trouve à sa disposition directe tous les éléments nécessaires à son développement. Cet état physiologique bien particulier n'est pas sans risque pour la plante qui pourrait avoir une apparence normale tout en présentant des anomalies structurales et fonctionnelles qui ont été plus spécialement mises en évidence au niveau des tissus foliaires dont l'activité photosynthétique peut en être plus ou moins drastiquement affectée (de Fossard 1977; Debergh 1982; Sutter 1985; Jemmali 1994; Ziv et Chen 2008).

Les racines adventives formées *in vitro* de manière spontanée ou induite sont également soumises aux contraintes de ce même environnement de culture artificielle. Dans de telles circonstances, la formation de racines secondaires est rare alors que celle des poils absorbants est quasi-impossible lorsque la racine principale plonge entièrement dans la gélose. Avec des insuffisances pareilles aux niveaux caulinaire et racinaire, il est tout à fait normal que les vitroplants manifestent une certaine fragilité en phase d'acclimatation où la plante doit passer au régime autotrophe nécessitant des racines et des feuilles en état de fonctionnement adéquat (Pierick 1997). Afin de préparer les vitroplantules à ce changement brutal, différentes solutions ont été proposées, mais elles ont particulièrement touché à la partie aérienne en agissant sur divers facteurs physiques et chimiques (Pierick 1997). Pour ce qui est du développement racinaire, le facteur d'amélioration qui a suscité le plus d'intérêt fut, de toute évidence, celui des auxines qui sont connues pour leur rôle prépondérant sur la morphogenèse racinaire (Enders et Strader 2016). Plus particulièrement, les études réalisées sur la micropropagation des portes greffes, ont surtout porté sur les aspects quantitatifs du développement racinaire sous l'effet des auxines (Stephan et Hamzah 1988; De Klerket al. 1999; Ludwig -Muller 2000; Vaez-Livarietal. 2005). L'expérience actuelle menée sur l'AIB et l'ANA qui constituent les deux auxines de synthèse les plus utilisées *in vitro* sur le porte-greffe d'arbres fruitiers à noyau 'Garnem' s'est également intéressée aux aspects qualitatifs de l'effet de ces deux auxines ajoutées au milieu de culture à la même concentration molaire (2.5  $\mu$ M). Outre l'influence subie par l'environnement physico-chimique du milieu de culture artificiel, le développement racinaire a montré des modifications remarquables sous l'effet des auxines par comparaison au témoin cultivé sur de la tourbe. Ces modifications particulièrement marquées avec l'ANA, touchent aussi bien la morphologie apparente que l'anatomie des racines. Avec l'absence totale de ramifications secondaires, les racines d'ailleurs plus épaisses *in vitro* qu'*in vivo*, sont plus hypertrophiées, plus courtes et plus rugueuses sous ANA. Leurs cellules corticales et vasculaires ne semblent pas avoir subi de différenciation normale durant l'ontogenèse racinaire. Dans le cortex, ces cellules qui se ressemblent beaucoup dans l'aire s'étalant de l'épiderme à l'endoderme, sont hautement vacuolisées et entourées de parois minces (AIB) et même lâches (ANA). Le système vasculaire qui est parfaitement différencié chez le témoin et occupe de fait, le cylindre central par le métaxylème et le métaphloème, montre une nette désorganisation qui le réduit à des vestiges de xylème et de phloème dégradés dans le cas de l'ANA. A moindre degré avec l'AIB, le xylème persiste sous forme d'ilots (protoxylèmes) entourant le cylindre central formé par une sorte de moelle rappelant une siphonostèle essentiellement rencontrée chez les monocotylédones dont le xylème n'a pas une différenciation centripète (Esau 1965 ;Evert et Eichhorn, 2006). Le péricycle générateur de racines secondaires est identifiable chez le témoin, mais il est absent chez les racines principales induites sous AIB ou ANA, expliquant ainsi pourquoi celles-ci n'ont pas formé de racines secondaires. Cette défaillance morphologique ne semble pas empêcher les racines mères plongeant directement dans le milieu de culture, d'y puiser le besoin nutritif des plantules, mais sûrement de manière moins efficace en présence d'ANA.

Des travaux comparatifs similaires sur les effets morphogénétiques entre différentes auxines, on n'en a pas recensé dans la littérature, mais il a été clairement établi que les racines formées *in vitro* présentent une morphologie et une anatomie plus ou moins altérées comparativement à leurs homologues induites *in vivo* sur des boutures des mêmes espèces (McClelland et al. 1990; Moreira et al. 2000; Sharma et al. 2007). D'autres ont trouvé que l'AIB appliqué aux microboutures de *Gomphrenamacrocephala*, induit des racines épaisses dont le cylindre central altéré et les cellules corticales hypertrophiées font que leur connexion vasculaire aux pousses mères soit très fragile. De telles pousses comparées à leurs homologues racinées sans AIB, éprouvent plus de difficultés à l'acclimatation qui se traduisent par des taux de mortalité pouvant atteindre 30 à 40 % (Moreira et al. 2000). Dans cette même tendance, des mortalités encore plus importantes (environ 95%) ont été enregistrées avec les plantules traitées à l'ANA tel que rapporté par les résultats de cette expérience.

## 5. Conclusion

À la lumière des résultats obtenus dans cette étude, nous pouvons conclure que la nature de l'auxine additionnée au milieu de rhizogenèse, affecte considérablement aussi bien les paramètres quantitatifs que les paramètres qualitatifs des racines néoformées *in vitro* chez le porte-greffe Garnem. Sur le plan quantitatif, on note une supériorité significative de l'AIB par rapport à l'ANA pour les paramètres morphométriques (nombre et longueur) de l'enracinement. Sur le plan qualitatif, et par comparaison à un témoin cultivé *in vivo*, nous avons décelé des modifications très marquées surtout dans le cas de l'ANA qui a induit des racines plus courtes, plus hypertrophiées et affectées d'une désorganisation structurale plus marquée au niveau du cortex et de la stèle. Ces anomalies tératologiques se sont corollairement traduites par un taux de mortalité très élevé (95%) à l'acclimatation.

La relation de causalité entre la nature de l'auxine et les effets observés étant ainsi prouvée ; il importe désormais d'envisager des recherches complémentaires sur les mécanismes biochimiques et moléculaires jalonnant ces réponses morphogénétiques spécifiques en vue d'une meilleure maîtrise du contrôle de cette étape cruciale de la micropropagation des porte-greffes. L'apport de ce travail sur un aspect peu exploré, constitue néanmoins, une contribution importante au vu des révélations faites sur rôle des modifications morphogénétiques racinaires en tant que facteur déterminant dans la réussite de la phase d'acclimatation où les pertes annoncées à l'échelle industrielle restent élevées malgré les progrès techniques réalisées.

## 6. Références bibliographiques

- Agullo-Anton MA, Olmos E, Perez-Perez JM, Acosta M (2013)** Evaluation of ploidy level and endoreduplication in carnation (*Dianthus spp.*). *Plant Sci* 201-202:1-11.
- Debergh PC (1982)** Physical properties of culture media. In: Fujiwara A., ed, Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, 135-136. Tokyo.
- De Fossard RA (1977)** Tissue culture in horticulture - a perspective. *Acta Hort* 78:455-459.
- De klerk GJ, Der kriecken WV, De jong JC (1999)** The formation of adventitious roots: new concepts, new possibilities. *In vitro Cell Dev Biol Plant* 35:189-199.
- Enders T A, Strader LC (2016)** Auxin Activity: Past, Present and Future. *Am J Bot* 102:180-196.
- Epstein E, Ludwig-Muller J (1993)** Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum* 88:382-389.
- Esau (1965)** *Plant Anatomy*. 2<sup>nd</sup> Edition. John Wiley & Sons, New York. London. Sydney. 767 p.
- Evert RE, Eichhorn SE (2006)** *Esau's Plant Anatomy- Meristems, Cells, and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function, and Development*. 3<sup>rd</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc. 567 pages.
- Felipe AJ, Gomez Aparisi J, Vargas FJ, Romero MA, Monastra F, Caboni E, Simeone AM, Isaakidis A (1997)** Obtention et sélection de porte-greffes pour l'amandier multipliés par voie végétative. In : Germain E, ed. Amélioration d'espèces à fruits à coque : noyer, amandier, pistachier. Zaragoza : CIHEAM, p.73-92 (Options Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n.16).
- Goren R, Bukovac MJ (1973)** Mechanism of naphthalenetic acid conjugation. *Plant physiol* 51:907-913.

- Jemmali A (1994)** Etude physiologique et morphogénétique de la floraison chez les microplants de fraiser (*Fragaria x ananassa*Duch.) cv. Gorella. Thèse de Doctorat en Sciences agronomiques. Faculté des Sciences agronomiques de Gembloux (Belgique), 171p.
- Jemai N, Gargouri S, Ksouri MF, Ben Mahmoud K, Jemmali A (2019)** First report of *Rhizoctoniasolani* affecting *Prunus* rootstock ‘Garnem’. Journal of Plant Pathology.
- Ludwig-Muller J (2000)** Indole-3-butyric acid in plant growth and development. Plant Growth Regul32:219-230.
- McClelland MT, Smith MAL, Caothers ZB (1990)** The effects of in vitro and ex vitro root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants. Plant cell, Tissue and Organ Culture 23:115-123.
- Moreira MF, Appezzato-da-Glória B, Zaidan LBP (2000)** Anatomical Aspects of IBA-treated Microcuttings of *Gomphrena macrocephala* St.-Hil. Braz arch biol technol43:221-227.
- Pierick RLM (1997) The transfert from nutrient medium to soil. In: In Vitro Culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers. p:127-132.
- Roussel L (1973)** Un nouveau venu en physiologie végétale: le phytochrome. Bois et Forêt des Tropiques 149:53-57.
- Ribnicky DM, Ilic N, Cohen JD, Cooke TJ (1996)** The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism – The implications for carrot somatic embryogenesis. Plant Physiol 112:549-558.
- Roussel L (1973)** Un nouveau venu en physiologie végétale : le phytochrome. Bois et Forêt des tropiques 149:53-57.
- Sharma T, Modgil M, Thakur M (2007)** Factors affecting induction and development of in vitro rooting in apple rootstocks. Indian J Esp Biol45:824-829.
- Simon S, Kubes M, Baster P, Robert S, Dobrev PI, Friml J, Petrasek J, Zazimalova E (2013)** Defining the selectivity of processes along the auxin response chain: a study using auxin analogues. New Phytol200:1034-1048.
- Stephan W, Hamzah A (1988)** Growth hormone induced root system types in cuttings of some broad leaved tree species. Acta Hort226:601-605.
- Sutter EG (1985)** Morphological, Physical and Chemical Characteristics of Epicuticular Wax on Ornamental Plants Regenerated *In Vitro*. Ann Bot 55:321-329.
- TuliV, Moyed HS (1969)** The role of 3-methyleneoxindole in auxin action. J biol Chem244:4916-4920.
- Vaez-Livari B, Salehi-Soghadi Z (2005)**In vitro rooting of hybrid GF677 (*Prunusdulcis* × *Prunuspersica*). ActaHorticulurae726, IV International Symposium on Pistachios Almonds.
- Ziv M, Chen J (2008)** The Anatomy and Morphology of Tissue Cultured Plants. In E. F. Georgeet al.eds., Plant Propagation by Tissue Culture.P: 465–477.
- Zolman BK, Yoder A, Barel B (2000)** Genetic analysis of indole-3-butyric acid response in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. Genetics156:1323-1337.