

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا للفلاحة، الحراش، الجزائر

Ecole Nationale Supérieure Agronomique (E.N.S.A), El-Harrach, Alger



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de **Doctorat en Sciences Agronomiques**

Thème

Elaboration d'une approche biotechnologique pour l'obtention de plants d'olivier (*Olea europaea* L.) tolérants aux pathogènes fongiques avec une capacité d'enracinement améliorée.

Présenté par : M^r Titouh Khayreddine

Devant le jury :

Président : Pr. Morsli Abdelkader, ENSA, Alger.

Directeur de thèse : Pr. Khelifi Lakhdar, ENSA, Alger.

Examineurs : Pr. Amdoun Ryad, INRF, Alger.

Pr. Toumi Mohamed, Univ. Alger 1, Alger.

Soutenu le : 21 Novembre 2024

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail je tiens à exprimer ma forte gratitude, ma sincère reconnaissance et mon profond respect à mon Directeur de thèse Mr Khelifi Lakhdar, Professeur à l'ENSA pour la qualité de son encadrement, ses encouragements et ses précieux conseils durant la réalisation de cette étude.

Je remercie M^r Morsli Abdelkader, Professeur à l'ENSA, de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Un grand remerciement à M^r Amdoun Ryad, Directeur de recherche à l'Institut National de la Recherche Forestière (INRF) d'Alger, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Un chaleureux remerciement à M^r Toumi Mohamed, Professeur à l'Université d'Alger 1, de nous avoir honoré d'examiner notre travail.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et reconnaissances à Mme Tihar-Benzina Farida (Laboratoire de Valorisation et Conservation des Ressources Génétiques (VALCOR) à Université de Boumerdès) pour avoir mis à ma disposition les souches de *Verticillium dahliae* et m'avoir accordé l'accès au laboratoire pour effectuer des manipulations primordiales au travail.

Mes remerciements les plus profonds à mon épouse Hadj Moussa Khadidja pour ses précieux encouragements, son soutien et son sacrifice durant la réalisation de ce travail.

J'exprime particulièrement ma profonde reconnaissance à M^{me} Wadhi-Zaoui Djamilia Ingénieur du Laboratoire des Ressources Génétique et Biotechnologies (L-RGB) pour ses aides et sa disponibilité durant toute l'expérimentation. Qu'elle trouve ici l'expression de mon respect le plus sincère.

Je tiens à remercier également tout mes collègues du laboratoire L-RGB : Yasmine, Hadjer, Khaled, Saad, Bilal, Zaki, Asma, Amina, Nouara, Roukia, Soumia ainsi que toutes personnes que j'ai rencontré au laboratoire pour leur soutien, aides et conseils durant la réalisation de ce travail.

Mes sincères remerciements à mes collègues de travail à l'Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) particulièrement aux centres de Oued Ghir (Béjaïa) et Baraki (Alger) pour leurs encouragements afin d'achever ce travail.

Je ne saurais oublier de remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

DEDICACES

Je dédie le présent travail à :

☞ Mes très chers parents

☞ Ma très chère femme

☞ Mes chers enfants : Khalilou, Rahmouma, Annous et Samsoum

☞ Mes chers frères et sœurs

☞ Ma Famille Titouh et belle famille Hadj Moussa

☞ Mes chers collègues de l'INRAA

☞ Tous mes amis

Khayreddine

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des planches

Introduction et Objectifs 1

Partie I. Synthèse bibliographique

1. L'olivier 5

1.1. Taxonomie, origine et diversité génétiques 5

1.2. Origine et distribution géographiques 8

1.3. Caractéristiques botaniques et agronomiques 9

1.4. Importance économique 10

1.5. Amélioration génétique de l'olivier par les méthodes conventionnelles 11

2. Biotechnologies appliquées à l'olivier 13

2.1. Techniques de multiplication de l'olivier *in vitro* 14

2.1.1. Microbouturage et micropropagation 14

2.1.2. Germination d'embryons zygotiques et micro-greffage *in vitro* 18

2.1.3. Organogenèse 20

2.1.4. Embryogenèse somatique 21

2.1.4.1. Induction des cultures embryogènes 23

2.1.4.2. Maintien et prolifération des cals embryogènes 28

2.1.4.3. Différenciation et maturation des embryons somatiques 29

2.1.4.4. Germination des embryons somatiques 30

2.1.4.5. Régénération de plantules et cryoconservation 31

2.2. Stabilité morpho-génétique des plantes régénérées *in vitro* 31

2.3. Biotechnologies appliquées dans l'amélioration génétique de l'olivier 33

2.3.1. Variation somaclonale 33

2.3.1.1. Définition, origine et causes de la variation somaclonale 33

2.3.1.2. Sélection *in vitro* par l'utilisation d'une pression sélective 34

2.3.1.3. Variation somaclonale et olivier 35

2.3.2. Transgénèse	36
2.3.2.1. Définition et objectifs de la transformation génétique	36
2.3.2.2. Processus de la transformation génétique	36
2.3.2.3. Transformation génétique de l'olivier	38

Partie II. Matériels et Méthodes

1. Rappel des objectifs du travail	41
2. Matériel végétal et désinfection	41
3. Embryogenèse somatique	42
3.1. Induction de cals embryogènes	42
3.2. Évaluation de la capacité embryogène de quelques lignées de cals	45
3.2.1. Estimation de la capacité de prolifération	45
3.2.2. Production d'embryons somatiques	47
3.2.3. Différenciation et maturation des embryons somatiques	47
3.2.4. Germination des embryons somatiques et régénération de plantules	48
3.3. Micropropagation des pousses issues des embryons somatiques	48
3.4. Acclimatation des plantules régénérées	49
4. Variation somaclonale : Induction par pression sélective	51
4.1. Souches de <i>Verticillium</i> utilisées	51
4.2. Production du filtrat brut de la culture de <i>Verticillium</i>	51
4.3. Sélection en présence du filtrat brut de la culture de <i>Verticillium</i>	53
4.3.1. Sélection en milieu liquide (sélection discontinue)	53
4.3.2. Sélection sur milieu solide (sélection continue)	54
4.4. Estimation du degré de brunissement des amas cellulaires	55
4.5. Régénération de plantules après sélection en présence du filtrat fongique	55
5. Transformation génétique : Enracinement par inoculation bactérienne	56
5.1. Souche bactérienne, inoculation des microboutures et co-culture	57
5.2. Mise en culture des microboutures	57
5.3. Acclimatation des plantules développées	58
6. Analyse statistique des données	58

Partie III. Résultats et Interprétation

1. Établissement des cultures embryogènes	60
1.1. Induction des cals embryogènes	60
<i>Conclusion partielle (Induction des cals embryogènes)</i>	70
1.2. Évaluation de la capacité embryogène de quelques lignées de cals	71
1.2.1. Estimation de la capacité de prolifération	71
1.2.1.1. <i>Effet du type de milieu de prolifération</i>	71
1.2.1.2. <i>Effet de la balance hormonale</i>	74
1.2.1.3. <i>Effet de la concentration du saccharose</i>	80
1.2.1.4. <i>Effet de l'addition du charbon actif (CA)</i>	84
1.2.1.5. <i>Effet de la durée d'incubation des cultures</i>	87
1.2.2. Production d'embryons somatiques	91
1.2.3. Différenciation et maturation des embryons somatiques	93
<i>Conclusion partielle (Évaluation de la capacité embryogène des cals)</i>	95
1.2.4. Germination des embryons somatiques et régénération de plantules	96
1.2.5. Micropropagation des pousses issues des embryons somatiques	100
<i>Conclusion partielle (Germination des ES et micropropagation)</i>	106
2. Variation somaclonale : Induction par pression sélective	107
2.1. Sélection en milieu liquide (sélection discontinue)	107
2.2. Sélection sur milieu solide (sélection continue)	117
2.3. Régénération de plantules après sélection en présence du filtrat fongique	122
<i>Conclusion partielle (Variation somaclonale par pression sélective)</i>	123
3. Transformation génétique : Enracinement par inoculation bactérienne	124
<i>Conclusion partielle (Enracinement par inoculation bactérienne)</i>	128

Partie IV. Discussion

1. Embryogenèse somatique	130
1.1. Induction des cals embryogènes	130
1.1.1. <i>Effet du milieu d'induction</i>	130
1.1.2. <i>Effet des régulateurs de croissance</i>	135
1.1.3. <i>Structure des cals obtenus</i>	138

1.2. Évaluation de la capacité embryogène	139
1.2.1. Prolifération cellulaire et production d'embryons somatiques	140
1.2.1.1. <i>Effet de la composition chimique du milieu de prolifération</i>	140
1.2.1.2. <i>Effet de la balance hormonale</i>	144
1.2.1.3. <i>Effet de la concentration du saccharose</i>	146
1.2.1.4. <i>Effet de l'addition du charbon actif (CA)</i>	147
1.2.1.5. <i>Effet de la durée d'incubation des cultures</i>	148
1.2.2. Différenciation et maturation des embryons somatiques	150
1.3. Germination des embryons somatiques et régénération de plantules	152
1.4. Micropropagation et acclimatation des plantules régénérées	156
2. Variation somaclonale par le filtrat de la culture de <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	159
<i>Types de culture et de sélection</i>	159
<i>Concentration du filtrat fongique</i>	160
<i>Durée de sélection</i>	162
3. Transformation génétique et capacité d'enracinement	162
Partie V. Conclusion générale et perspectives	167
Références bibliographiques	171
Annexes	199
Résumés	211
Articles publiées	214

Liste des abréviations

2,4 D : Acide **2,4-D**ichloro-phénoxy-Acétique.

2iP : 6-(**D**imethylallylamino)**P**urine

ANOVA/MANOVA : **A**nalyse de la **v**ariance (simple, multiple)

ADN : Acide **D**ésoxyribonucléique

AIA : Acide **I**ndole-3-Acétique

AIB : Acide **I**ndole-3-**B**utyrique

ANA : Acide Naphtalène-Acétique

BAP : 6-**B**enzyl-**A**mino-**P**urine

bit : **b**inary digit (chiffre binaire)

C : Chemlal (lignée cellulaire de cal)

CA : **C**arbon **A**ctif

cm : centimètre

COI : **C**onseil **O**léicole **I**nternational

Cor : **C**ordiforme (stade de développement embryonnaire)

Cot : **C**otylédons ou **C**otylédonaire (stade de développement embryonnaire)

Cv. : **C**ultivar

DKW : Milieu de **D**river et **K**uniyuki (1984)

ECO : Milieu d'**E**mbyogenèse **C**yclique d'**O**livier (Pérez-Barranco *et al.*, 2007)

ES : **E**mbyon **S**omatique

ESs : **E**mbyogenèse **S**omatique **s**econdaire

FAO : **F**ood and **A**griculture **O**rganization (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)

FAOSTAT : **F**ood and **A**griculture **O**rganization **S**tatistics (Statistiques de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)

g : grammes

GA₃ : Acide **G**ibbérellique 3

Glo : **G**lobulaire (stade de développement embryonnaire)

gmf : grammes de **m**atière **f**raîche

h : heure

IB : **I**nfection **B**actérienne

Ind₁ ou **Ind₂** : **I**nduction (Milieu d'induction de cal)

INRAA : **I**nstitut **N**ational de la **R**echerche **A**gronomique d'**A**lgérie

l : litre

M : Mole
MADR : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural
ME : Masse Embryogène
mg : milligramme
ml : millilitre
mm : millimètre
mn : minutes
MPa : Méga-Pascal
MS : Milieu de Murashige et Skoog (1962)
μmol : micromole
n : nombre chromosomique
N : Normalité
N° : Numéro
Néc : Nécrose
Nod : Nodule
OM : Olive Medium (Milieu d'olivier de Rugini, 1984)
PDA : Potato Dextrose Agar (Gélose Dextrosée à la Pomme de terre)
pH : potentiel Hydrogène
PPDS : Plus Petite Différence Significative
Rac : Racine
s : seconde
S : Semaine
ssp. : sub-species (Sous espèce)
TDZ : Thidiazuron
Tor : Torpide (stade de développement embryonnaire)
tr/mn : tours par minute
v : volume
YEM : Yeast Extract Mannitol (Extrait de Levure au Mannitol)
Zéa : Zéatine
% : Pourcentage
° : Degré
°C : Degré Celsius

Liste des figures

- Figure 1.** Effet du type de milieu de culture (A et B) et du type de d'auxine sur le taux de callogenèse et d'induction de l'embryogenèse somatique à partir d'explants de radicules d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal. 62
- Figure 2.** Effet du type de milieu de prolifération solide (A) et liquide (B) sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal. 72
- Figure 3.** Effet de la combinaison hormonale additionnée au milieu de prolifération ECO solide (A) et liquide (B) sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal. 76
- Figure 4.** Effet de la concentration du saccharose dans le milieu de prolifération ECO solide (A) et liquide (B) sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal. 81
- Figure 5.** Effet de l'addition du charbon actif au milieu de prolifération ECO solide (A) et liquide (B) sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal. 85
- Figure 6.** Effet de la durée d'incubation des cultures en milieu de prolifération ECO solide et liquide sur l'accroissement du poids frais (A et B) et la vitesse de prolifération (C et D) des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal. 88
- Figure 7.** Effet de la concentration du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* dans le milieu de prolifération ECO liquide sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection. 108
- Figure 8.** Effet de la concentration du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* dans le milieu de prolifération ECO liquide sur le brunissement des amas cellulaires de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection. 109

Figure 9. Evolution du poids frais total de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection en milieu ECO liquide additionné de différentes concentrations du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* et durant trois mois de maintien sur le milieu ECO solide sans filtrat. 112

Figure 10. Effet de la concentration du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* dans le milieu de prolifération ECO solide sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection. 117

Figure 11. Effet de la concentration du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* dans le milieu de prolifération ECO solide sur le brunissement des amas cellulaires de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection. 118

Figure 12. Evolution du poids frais total de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal durant quinze semaines de sélection en milieu ECO solide additionné de différentes concentrations du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae*. 120

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique des différents milieux de culture utilisés.	44
Tableau 2 : Facteurs étudiés pour l'évaluation de la capacité de prolifération et de production d'embryons somatiques de trois lignées de cals d'olivier (Cv. Chemlal).	45
Tableau 3 : Composition chimique des milieux utilisés pour la culture de <i>Verticillium dahliae</i> Kleb.	53
Tableau 4 : Composition chimique du milieu YEM utilisé pour la culture d' <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .	57
Tableau 5 : Effet du type de milieu d'induction de l'embryogenèse somatique sur l'élongation des racines et la nécrose des cals obtenus à partir d'explants de racines d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal.	63
Tableau 6 : Caractéristiques des lignées de cals embryogènes obtenues à partir de racines d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, en présence de différentes auxines et sur deux milieux de culture (OMc et MS).	68
Tableau 7 : Nombre moyen et stades de développement des embryons somatiques immatures produits par gramme de matière fraîche après 4 semaines de culture en milieu liquide sous agitation de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal.	91
Tableau 8 : Nécrose, prolifération, différenciation et nombre moyen d'embryons somatiques matures récupérés à partir d'embryons somatiques immatures (pro-embryons) de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de maturation sur le milieu ECO solide sans hormones et avec charbon actif.	93
Tableau 9 : Effet du milieu (OM et MS), type de culture (solide 'S' et liquide 'L') et présence d'hormones (sans hormones '0' ou avec hormones '1') sur la germination et le développement de plantules à partir des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après huit semaines de culture.	98

Tableau 10 : Effet du milieu de micropropagation (OM et DKW) et de la présence d'hormones sur le débourrement et le développement des pousses chez les microboutures uninodales issues de la germination des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture. 102

Tableau 11 : Effet du milieu de micropropagation (OM et DKW) et de la présence d'hormones sur la callogenèse basale et l'enracinement des microboutures uninodales issues de la germination des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture. 104

Tableau 12 : Effet du traitement (addition d'auxine AIB au milieu de culture et inoculation bactérienne basale) sur le débourrement et le développement des pousses chez les microboutures uninodales issues de la germination des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 6 semaines de culture. 126

Tableau 13 : Effet du traitement (addition d'auxine AIB au milieu de culture et inoculation bactérienne basale) sur l'enracinement des microboutures uninodales issues de la germination des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 6 semaines de culture. 126

Liste des planches

- Planche 1 :** Etapes de récupération et de désinfection de la semence d'olivier à partir des noyaux du cultivar 'Chemlal' et procédé d'extraction des embryons zygotiques puis isolement de la radicule utilisée comme explant pour l'induction de cals embryogènes. 42
- Planche 2 :** Etapes de l'induction de cals embryogènes à partir de radicules d'embryons zygotiques de l'olivier, Cv. Chemlal. 43
- Planche 3 :** Protocole de germination des embryons somatiques (ES) matures, micropropagation et acclimatation des plantules régénérées. 50
- Planche 4 :** Production du filtrat brut de la culture de *Verticillium dahliae* Kleb. utilisé pour la sélection *in vitro* des cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal. 52
- Planche 5 :** Estimation du degré de brunissement des amas cellulaires du cal embryogène d'olivier après sélection en présence du filtrat brut de culture de *Verticillium dahliae* Kleb. 56
- Planche 6 :** Aspect des radicules des embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, cultivées sur le milieu de culture OMc additionné de différentes auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D) après 3 semaines et 4 semaines d'induction de l'embryogenèse somatique. 64
- Planche 7 :** Aspect des radicules des embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, cultivées sur le milieu de culture MS additionné de différentes auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D) après 3 semaines et 4 semaines d'induction de l'embryogenèse somatique. 65
- Planche 8 :** Evolution des explants de radicules d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, mises en culture en présence de différentes auxines après 3 semaines sur les premiers milieux d'induction OMc ou MS (Ind₁), 4 semaines sur les deuxièmes milieux OMc ou MS (Ind₂) d'induction de l'embryogenèse somatique et début d'apparition des structures embryogènes après transfert sur le milieu ECO. 66

- Planche 9 :** Aspect des lignées de cals embryogènes obtenues à partir des radicules d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, après plusieurs mois d'induction en présence de différentes auxines sur deux milieux de culture (OMc et MS) et apparition des structures embryogènes après transfert sur le milieu ECO. 69
- Planche 10 :** Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur trois milieux de prolifération (MS, OM et ECO) solides et liquides. 73
- Planche 11 :** Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur sur trois différents milieux de prolifération (MS, OM et ECO). 74
- Planche 12 :** Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO solide en présence de différentes combinaisons hormonales à base d'auxines (AIB ou ANA) et de cytokinines (Zéatine ou Thidiazuron). 77
- Planche 13 :** Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO liquide en présence de différentes combinaisons hormonales à base d'auxines (AIB ou ANA) et de cytokinines (Zéatine ou Thidiazuron). 78
- Planche 14 :** Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO en présence de différentes combinaisons hormonales à base d'auxines (AIB ou ANA) et de cytokinines (Zéatine ou Thidiazuron). 79
- Planche 15 :** Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO solide en présence de différentes concentrations de saccharose. 82
- Planche 16 :** Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO liquide en présence de différentes concentrations de saccharose. 83

Planche 17 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur milieu ECO solide et liquide en présence de différentes concentrations du charbon actif.	86
Planche 18 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après différentes durées d'incubation sur le milieu ECO solide.	89
Planche 19 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après différentes durées d'incubation sur le milieu ECO liquide.	90
Planche 20 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur milieu ECO liquide et embryons somatiques récupérés par chaque lignée à différents stades de développement.	92
Planche 21 : Maturation des pro-embryons des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture sur milieu ECO solide avec du charbon actif et embryons somatiques récupérés de chaque lignée.	94
Planche 22 : Germination des embryons somatiques matures de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture sur milieux OM ou MS solides (S) ou liquides (L) en présence ou absence d'hormones (0 ou 1).	99
Planche 23 : Micropropagation des vitroplants issues de la germination des embryons somatiques matures de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture sur milieux OM ou DKW solides en présence ou absence d'hormones.	105
Planche 24 : Aspect des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection en milieu ECO liquide additionné de différentes concentrations du filtrat brut de la culture de deux souches de <i>Verticillium dahliae</i> .	110
Planche 25 : Aspect des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois mois de maintien sur un milieu ECO solide sans filtrat de culture de <i>Verticillium dahliae</i> .	113
Planche 26 : Prolifération cellulaire observée chez le cal de la lignée embryogène 'C1' à la sortie du milieu de sélection liquide et après trois mois de maintien sur un milieu ECO sans filtrat de culture de <i>Verticillium dahliae</i> .	114

- Planche 27** : Prolifération cellulaire observée chez le cal de la lignée embryogène 'C2' à la sortie du milieu de sélection liquide et après trois mois de maintien sur un milieu ECO sans filtrat de culture de *Verticillium dahliae*. 115
- Planche 28** : Prolifération cellulaire observée chez le cal de la lignée embryogène 'C3' à la sortie du milieu de sélection liquide et après trois mois de maintien sur un milieu ECO sans filtrat de culture de *Verticillium dahliae*. 116
- Planche 29** : Aspect des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après quinze semaines de maintien sur un milieu ECO solide avec différentes concentrations de filtrat de culture de *Verticillium dahliae*. 121
- Planche 30** : Essai de régénération de plantules par germination d'embryons somatiques après sélection en présence du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae*. 122
- Planche 31** : Essai d'amélioration de l'enracinement des microboutures issues de la germination des ES par inoculation basale à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* et mise en culture en présence ou absence d'AIB. 127

Introduction et Objectifs

Introduction et Objectifs

L'olivier (*Olea europaea* L.) de la famille des oléacées est l'une des principales espèces cultivées dans la région méditerranéenne. Cette espèce est d'une grande importance dans le marché international de l'alimentation humaine pour ses bienfaits sanitaires et les qualités culinaires de ses produits (Cançado et al., 2013). Avec un verger dépassant 1 milliard d'oliviers et une superficie de culture dépassant 11 millions d'hectares dont plus de 96% est située dans les pays méditerranéens, la production oléicole annuelle est plus de 20 millions de tonnes d'olives en moyenne variant entre 2 et 3 millions de tonnes d'huile. L'olivier se trouve ainsi parmi les principales cultures oléagineuses au monde après le soja, colza, tournesol et le palmier à huile (FAOSTAT, 2022 ; COI, 2022).

En Algérie, l'oléiculture est maintenue depuis longtemps sous forme d'une culture vivrière particulièrement dans les régions montagneuses (Lamani et Ilbert, 2016) et occupe plus de 46% des surfaces dédiées aux cultures fruitières. Avec un verger de plus de 60 millions d'oliviers plantés sur environ 430 milles hectares, l'Algérie produit près de 860 milles tonnes d'olives dont plus de 65% est destinée à l'extraction d'environ 100 milles tonnes d'huile en moyenne (MADR, 2019) soit l'équivalent de 4% de la production mondiale, occupant ainsi la 9^{ème} place après le Maroc et la Syrie (COI, 2022).

L'olivier compte une diversité génétique importante dépassant 2600 cultivars identifiés à travers le monde entier (Rugini et al., 2000 ; FAO, 2010) sélectionnés et multipliés par les agriculteurs principalement pour leur fruit (Rugini et al., 2008 ; Besnard et al., 2018 ; Rallo et al., 2018).

En Algérie, Hauville (1953) suggèrent l'existence de plus de 150 variétés, alors que Mendil et Sebai (2006) n'ont caractérisé que 36 cultivars dont les appellations sont souvent en relation avec la région de culture, l'utilisation pratique ou bien pour les caractères morphologiques spécifiques au fruit (INRAA, 2006) et qui ont fait l'objet de certaines études moléculaires (Dominguez-Garcia et al., 2012 ; Abdessemed et al., 2015 ; Haddad et al., 2020). Les variétés les plus répandues sont 'Chemlal' comme olive à huile et 'Sigoise' comme olive de table alors que 'Azeradj' est à double utilisation. Par ailleurs, plusieurs travaux mentionnent d'autres variétés locales qui présentent des différences à l'échelle morphologique et moléculaire (Dominguez-Garcia et al., 2012 ; Mansouri, 2014 ; Abdessemed et al., 2015 ; Abdessemed, 2017 ; Boukhari et al., 2020). De ce fait, le nombre

réel des cultivars d'olivier en Algérie peut être plus élevé vu le manque d'information sur les variétés locales à diffusion restreinte (Abdessemed et *al.*, 2015 ; Abdessemed, 2017 ; Abdessemed et *al.*, 2018 ; El Bakkali et *al.*, 2019).

Les méthodes classiques d'amélioration et de multiplication de l'olivier ont produit jusqu'à présent des résultats limités et sont incapables de répondre à la demande agricole (Palomo-Ríos et *al.*, 2021) et d'achever seules des acquis significatifs (Cançado et *al.*, 2013 ; Rugini et *al.*, 2016) à cause de la période juvénile assez longue (10 à 15 ans) (Rugini et Silvestri, 2016) et des problèmes d'adaptation de l'espèce aux nouvelles conditions des zones de culture, des pratiques culturales dans le contexte du changement climatique (Rallo et *al.*, 2018 ; Cardoso et *al.*, 2019 ; Rugini et *al.*, 2020) en plus de pertes considérables de productivité entraînées par plusieurs maladies et ravageurs notamment la verticilliose et la tuberculose (Trapero et Blanco, 2017) ainsi que la mouche de l'olive (Alvarado et *al.*, 2017) et récemment le syndrome du déclin rapide de l'olivier causé par *Xylella fastidiosa* (Sabella et *al.*, 2018). En outre, les principaux cultivars en Algérie, tels que 'Chemlal' et 'Azeradj', sont récalcitrants au bouturage semi-ligneux et présentent une faible capacité d'enracinement (Fabbri et *al.*, 2004).

De ce fait, l'utilisation des méthodes biotechnologiques telles que la transformation génétique et l'induction de la variation somaclonale pourrait être d'une grande utilité pour la création variétale chez l'olivier. Toutefois, l'application de ces techniques nécessite l'établissement d'une approche de régénération *in vitro* efficace particulièrement pour les génotypes récalcitrants. Dans ce contexte, l'embryogenèse somatique semble être la technique la plus appropriée à l'application de ces outils biotechnologiques d'amélioration et de régénération *in vitro* chez plusieurs espèces ligneuses y compris l'olivier (Rugini et Gutiérrez-Pesce, 2006 ; Sánchez-Romero, 2019 et 2021).

L'objectif global de notre travail est d'élaborer une approche biotechnologique pour l'obtention de plants d'olivier (*Olea europaea* L.) tolérants aux pathogènes fongiques avec une capacité d'enracinement améliorée chez le principal cultivar en Algérie 'Chemlal'. Pour atteindre cet objectif, il faudrait :

1. Etablir un protocole efficace de régénération *in vitro* de plantes entières d'olivier par embryogenèse somatique induite à partir de radicules d'embryons zygotiques du cultivar 'Chemlal'. L'effet de plusieurs facteurs et conditions de culture au cours des différentes étapes du processus d'embryogenèse somatique (induction de cals, prolifération et maintien, différenciation et maturation des embryons somatiques, germination, micropropagation et acclimatation des plantules) a été évalué.
2. Evaluer l'effet de la sélection de certaines lignées de cals embryogènes d'olivier en présence du filtrat brut de la culture du *Verticillium dahliae* Kleb. dans le but d'induire une variation somaclonale et régénérer des plants d'olivier résistants au *Verticillium*. La pression sélective sera appliquée sur un milieu solide (sélection continue) ou en milieu liquide (sélection discontinue) contenant différentes concentrations du filtrat brut de la culture du champignon.
3. Améliorer la capacité d'enracinement *in vitro* des microboutures issues des pousses obtenues après germination des embryons somatiques d'olivier à l'aide d'inoculation par *Agrobacterium rhizogenes*. Les bases des microboutures seront inoculées par immersion dans une suspension bactérienne et co-cultivées avant d'être introduites sur un milieu de culture additionné ou non d'une auxine afin d'évaluer la capacité d'enracinement chez les pousses développées.

Partie I. Synthèse Bibliographique

1. L'olivier

1.1. Taxonomie, origine et diversité génétiques

L'olivier (*Olea europaea* L.) est une dicotylédone de la famille des Oléacées incluant environ 25 à 30 genres et approximativement 900 espèces (Rugini et Baldoni, 2005 ; Therios, 2009) parmi lesquelles figurent le jasmin, le frêne, et le lilas. La famille des *Oléacées* est subdivisée en deux sous-familles : *Oleideae* et *Jasminoidaceae* (Johnson, 1957 ; Green, 2002 ; Rugini et Baldoni, 2005 ; Mataix et Barbancho, 2006 ; Baldoni et Belaj, 2009 ; Therios, 2009). Selon la phylogénie des 'Angiospermes' récemment mise à jours par le groupe APG (2016) la famille des 'Oléacées' comprenant l'olivier cultivé est classée dans l'ordre des 'Lamiales' faisant partie de la sous-classe des 'Astérides' rattachée à la classe des 'Eudicotylédones' ou 'Tricoplates'.

Le genre *Olea* inclut trois sous-genres : *Olea*, *Paniculatae* et *Tetrapilus* regroupant entre 30 et 40 espèces incluant des arbustes et arbres à feuilles persistantes (Green, 2002 ; Boskou, 2006) distribuées en Océanie, Asie, Afrique et la région méditerranéenne (Rugini et Baldoni, 2005 ; Therios, 2009). Le sous-genre *Olea* se divise à son tour, en deux sections *Ligustroides* et *Olea* auquel fait partie l'espèce *Olea europaea* considérée comme l'unique espèce cultivée pour ses fruits comestibles charnus et riches en huile (Niaounakis et Halvadakis, 2006). De plus, en se basant sur la morphologie et la distribution géographique ; l'espèce *Olea europaea* inclut six sous-espèces: (i) *O. europaea* ssp. *guanchica*, des îles Canaries ; (ii) *O. europaea* ssp. *cuspidata*, de l'Asie et du Sud-est d'Afrique; (iii) *O. europaea* ssp. *laperrinei* du Sahara; (iv) *O. europaea* ssp. *maroccana*, présente au Maroc ; (v) *O. europaea* ssp. *cerasiformis*, typique des îles Canaries ; et (vi) *O. europaea* ssp. *europaea* du bassin méditerranéen, et qui inclut des variétés cultivées ou cultivars (var. *sativa*) et des formes sauvages ou oléastres (var. *sylvestris*) utilisés comme porte-greffes pour la variété *sativa* (Rugini et al., 2000 ; Green, 2002 ; Rugini et Baldoni, 2005 ; Mataix et Barbancho, 2006 ; Baldoni et Belaj, 2009). Besnard et al. (2018) indiquent que les six espèces du genre *Olea* ont le même ancêtre présent il y a 4 à 8.3 millions d'années durant la fin du Miocène et le début du Pliocène. Par la suite, les six espèces se sont adaptées aux différents changements climatiques passés expliquant leur distribution actuelle.

L'olivier (*Olea europaea* ssp. *europaea*) est une espèce diploïde à $2n = 2x = 46$ (Therios, 2009) dont l'origine génétique demeure sans réponse (Besnard et al., 2018).

L'olivier est probablement issu de l'hybridation naturelle entre plusieurs espèces du genre *Olea* (Chevalier, 1948 ; Breviglieri et Battaglia, 1954) notamment son ancêtre sauvage 'Oléastre' (Díez et *al.*, 2016 ; Rugini et *al.*, 2020) permettant une introgression continue de la diversité génétique vers les variétés initialement cultivées (Besnard et *al.*, 2018).

L'olivier compte une diversité génétique importante dépassant 2600 cultivars identifiés à travers le monde (Rugini et *al.*, 2000 ; FAO, 2010) sélectionnés et multipliés par les agriculteurs principalement pour la taille de leur fruit, la proportion occupée par la pulpe ainsi que la teneur en huile en plus de l'adaptation à certaines zones climatiques (Rugini et *al.*, 2008 ; Besnard et *al.*, 2018 ; Rallo et *al.*, 2018). De ce fait, trois types d'utilisations de l'olive peuvent exister : olive à l'huile, olive de table et celle à double fins. Toutefois, ce nombre de cultivars issus des croisements des anciennes variétés entre elles ou avec la forme sauvage de l'espèce (Angiolillo et *al.*, 1999 ; Besnard et Bervillé, 2000 ; Rugini et *al.*, 2008) est probablement sous-estimé à cause de l'apparition continue de nouvelles variétés par hybridation naturelle (Díez et *al.*, 2016 ; Ben Mohamed et *al.*, 2017) ou par mutations génétiques spontanées (Rallo et *al.*, 2018). Il manque cependant, les informations sur les génotypes locaux qui sont, généralement, minoritaires avec une grande variabilité génétique (Muzzalupo et *al.*, 2014 ; El Bakkali et *al.*, 2019), menacés de disparaître par les nouvelles pratiques de culture adoptées (Díez et *al.*, 2016 ; Mnasri et *al.*, 2017) ainsi que l'introduction de nouvelles variétés étrangères au détriment de la diversité locale. Par ailleurs, la reconnaissance et l'identification des différents cultivars sont confrontées à plusieurs problèmes de confusion taxonomique, homonymie (différentes variétés avec une même appellation) ou synonymie (une variété avec différentes appellations) (Caballero et Del Rio, 1999) en plus des variétés populations rassemblant des génotypes différents ayant des phénotypes plus ou moins proches (Ouazzani et *al.* 1996).

De ce fait, les caractères morphologiques sont très anciennement utilisés pour la description, la distinction ainsi que la classification des différents cultivars d'olivier (Ruby, 1917 in Idrissi et Ouazzani, 2006 ; Barranco et Rallo, 1984 ; Barranco, 1994 ; Cantini et *al.*, 1999 ; Barranco et Rallo, 2000 ; Barranco et *al.*, 2000). Ainsi, une méthode de caractérisation primaire des variétés d'olivier (Barranco et Rallo, 1984 ; Barranco, 1994) sur la base de ces caractères morphologiques a été adoptée par le conseil oléicole international (COI) pour une meilleure valorisation agronomique de ces ressources génétiques (COI, 1997). Depuis, plusieurs travaux d'identification établis dans plusieurs pays oléicoles, ont démontré la grande utilité de ce type de marqueurs dans l'étude des ressources génétiques oléicoles (Titouh et *al.*,

2021) tout en résolvant plusieurs cas d'homonymie et de synonymie et aboutissant à l'identification de milliers de variétés (Caballero et Del Rio, 1999). Par la suite, la conservation des ressources génétiques oléicoles est devenue une nécessité via la création d'un réseau international de collections vivantes d'olivier pour faire face aux risques d'érosion et de perte génétiques (Díez et *al.*, 2016 ; Rallo et *al.*, 2018).

En Algérie, Hauville (1953) suggèrent l'existence de plus de 150 variétés d'olivier, alors que Mendil et Sebai (2006), en utilisant le descripteur adopté par le COI, n'ont identifié et caractérisé que 36 cultivars ou dénominations à travers le territoire national dont les appellations sont souvent en relation avec la région de culture ou de diffusion ainsi que leur utilisation pratique ou des caractères morphologiques spécifiques au fruit (INRAA, 2006 ; Dominguez-Garcia et *al.*, 2012). Ces cultivars ont fait l'objet de certaines études moléculaires (Dominguez-Garcia et *al.*, 2012 ; Abdessemed et *al.*, 2015 ; Haddad et *al.*, 2020). Les variétés les plus répandues sont 'Chemlal' comme olive à huile et 'Sigoise' comme olive de table. Cependant, plusieurs travaux mentionnent d'autres appellations de variétés locales différentes sur le plan morphologique et même moléculaire de ce qui a été déjà caractérisé par Mendil et Sebai en 2006 (Dominguez-Garcia et *al.*, 2012 ; Mansouri, 2014 ; Abdessemed et *al.*, 2015 ; Abdessemed, 2017 ; Boukhari et *al.*, 2020). Par conséquent et sur la base d'actuelles prospections, le nombre réel des cultivars d'olivier en Algérie peut être plus élevé vue le manque d'information sur les variétés locales à diffusion restreinte (Abdessemed et *al.*, 2015 ; Abdessemed, 2017 ; Abdessemed *al.*, et 2018 ; El Bakali et *al.*, 2019).

Certains travaux ont démontré que ces descripteurs morphologiques et biométriques ne sont pas suffisants pour distinguer les cultivars des formes sauvages de l'olivier comme l'a déjà suggéré Green (2002) et Hannachi et *al.* (2008) tandis que d'autres ont mis en évidence l'influence de l'interaction génotype avec les conditions environnantes sur les caractères de description (Hannachi et *al.*, 2017 ; Dridi et *al.*, 2018). En outre, Barranco (1994) et Barranco et *al.* (2000) soulignent que les mesures biométriques doivent être accompagnées d'une description morphologique détaillée des organes utilisés pour l'identification, et ce, à cause des variations que peuvent induire les conditions environnementales et/ou la conduite culturale (Contento et *al.*, 2002 ; Hadiddou et *al.*, 2013). De ce fait, d'autres types de marqueurs biochimiques ou enzymatiques, moins influencés par le milieu, sont développés afin de compléter l'apport des descripteurs morphologiques dans la reconnaissance variétale chez l'olivier (Pontikis et *al.*, 1980 ; Ouazzani et *al.*, 1993 et 1995 ; Trujillo et Rallo 1995).

Par la suite, en raison des limites rencontrées même avec ces derniers marqueurs enzymatiques ; l'outil moléculaire (RAPD, SSR, ISSR, SNP, etc.) a contribué significativement dans la reconnaissance variétale ainsi que l'étude des relations génétiques inter et intra-spécifiques de l'olivier (Bogani et al., 1994 ; Vergari et al., 1996 ; Gemas et al., 2000 ; Belaj et al., 2001 ; Besnard et al., 2001 ; Vargas et Kadereit, 2001 ; Carriero et al., 2002 ; Cipriani et al., 2002 ; Dominguez-Garcia et al., 2012 ; Trujillo et al., 2014).

Néanmoins, l'importance de la description morphologique demeure incontournable dans la classification, la reconnaissance et l'authentification des cultivars d'olivier (Mnasri et al., 2017 ; Titouh et al., 2021). La description morphologique a suscité un intérêt particulier ces dernières années en raison de la forte discrimination de certaines caractéristiques morphologiques notamment celles des fruits et noyaux (Titouh et al., 2021) ainsi que la corrélation positive montrée avec les autres types de marqueurs (Rotondi et al., 2003 ; Taamalli et al., 2006 ; D'Imperio et al., 2011 ; Emmanouilidou et Kyriacou, 2018 ; Pereira et al., 2018 ; El Bakkali et al., 2019).

1.2. Origine et distribution géographiques

L'olivier est originaire de l'Asie (Syrie, Asie Mineure ou l'Inde). Il est domestiqué, probablement, au moyen orient (Rugini et Baldoni, 2005) ou en méditerranée depuis 3000 ans A.C, malgré que des évidences scientifiques démontrent la présence de certaines formes d'olivier durant la dernière glaciation (18000 ans A.C) dans les régions méditerranéennes de l'Ouest et de l'Est (Díez et al., 2016 ; Rugini et al., 2020).

Par la suite, l'olivier est répandu sur les deux rives de la mer méditerranéenne avec les migrations humaines durant les civilisations phénicienne et romaine (Boskou, 2006 ; Baldoni et Belaj, 2009 ; Rallo et al., 2018 ; Rugini et al., 2020). Au début du 15^{ème} siècle, les espagnoles et les italiens l'ont introduit respectivement en Amérique latine et en Australie (Polymerou-Kamilakis, 2006 ; Rallo et al., 2018).

L'habitat naturel de l'olivier cultivé se situe entre les latitudes 30° et 45°, des deux hémisphères nord et sud, dans des régions climatiques de type méditerranéen, caractérisées par un été sec et chaud (bassin méditerranéen). Dans l'hémisphère sud, l'olivier est présent dans les latitudes plus tropicales avec un climat modifié par l'altitude. Actuellement, il est également cultivé en Afrique du Sud, en Chine et au Japon (Green, 2002).

1.3. Caractéristiques botaniques et agronomiques

L'olivier cultivé possède une tige cylindrique sous une frondaison plus ou moins arrondie avec des feuilles simples insérées généralement deux par nœud, plus ou moins lancéolées et persistantes. Le système racinaire de l'olivier dépend de l'origine du plant et des conditions du sol ainsi que la disponibilité de l'eau. En effet, lorsque l'arbre provient d'une graine, il se forme une racine pivotante principale possédant des racines latérales, alors que chez les plantes multipliées par voie végétative (bouturage) de multiples racines adventives horizontales se forment dans la zone basale de la bouture (Rapoport et *al.*, 2016 ; Rugini et *al.*, 2020).

Les fleurs sont petites et actinomorphes groupées en inflorescences produites au cours du printemps sur les croissances végétatives de l'année précédant la floraison. Les fleurs peuvent être imparfaites (sans ovaires) ou parfaites donnant, après pollinisation anémophile et fréquemment allogame, à un fruit "drupe" sphérique, ovale ou elliptique d'une couleur violet-bleuâtre, noir-rougeâtre ou rarement blanchâtre, avec une pulpe contenant une teneur plus ou moins élevée en huile qui varie selon le cultivar. L'endocarpe ou noyau englobe généralement une semence dont l'embryon occupe quasiment la totalité du volume de l'amande (Rugini, 1995 ; Rapoport et *al.*, 2016).

L'olivier supporte bien les climats chauds, secs et froids et s'adapte à plusieurs types de sol grâce à son système racinaire. Cette espèce peut tolérer la sécheresse et la salinité de l'eau mieux que d'autres cultures fruitières du fait que ses organes possèdent des caractéristiques structurelles considérées comme adaptations xérophytiques réduisant la perte d'eau (Rapoport et *al.*, 2016). De plus, l'olivier est l'une des espèces les moins exigeantes en matière de fertilisation et d'interventions culturales. Par conséquent, en dépit d'une alternance de production dépendant du génotype et des pratiques culturales (Rugini et *al.*, 2020) ; l'olivier peut toujours maintenir une certaine productivité indépendamment de la région de plantation (Rugini et *al.*, 2000 ; Mataix et Barbancho, 2006 ; Therios, 2009). Par ailleurs, la culture d'olivier est confrontée à plusieurs maladies et ravageurs pouvant entraîner des pertes considérables sur la productivité. Parmi les maladies les plus redoutées figurent la verticilliose, une trachéomycose causée par un champignon tellurique *Verticillium dahliae* et la maladie fongique de l'œil de paon due à *Spilocaea oleaginea* (Jiménez-Díaz et *al.*, 2012) ainsi que les maladies bactériennes, telles que la tuberculose causée par la bactérie *Pseudomonas savastanoi* (Trapero et Blanco, 2017) et récemment le syndrome du déclin

rapide de l'olivier causé par *Xylella fastidiosa* (Sabella et al., 2018). En outre, la mouche de l'olive *Bactrocea oleae* et la teigne de l'olivier *Prays oleae* sont les principaux insectes ravageurs de l'espèce (Alvarado et al., 2017).

1.4. Importance économique

L'olivier est l'une des espèces cultivées les plus importantes dans la région méditerranéenne. Cette espèce est d'une grande importance dans le marché international de l'alimentation humaine par ses bienfaits sanitaires et les qualités culinaires de ses produits (Cançado et al., 2013). De plus, la diète méditerranéenne traditionnelle est considérée comme la plus bénéfique pour la santé par sa forte teneur en antioxydants présents dans l'huile d'olive, fruits et légumes (Rugini et al., 2008). Par ses multiples usages et son omniprésence dans les agrosystèmes ; l'olivier est le pilier économique et la pierre d'angle de l'agriculture méditerranéenne (Besnard et al., 2018). Avec un patrimoine oléicole estimé à plus de 1 milliard d'oliviers ; sa superficie de culture dépasse les 11 millions d'hectares dont plus de 96 % de la superficie cultivée se situe dans les pays méditerranéens, 1,2 % dans le continent américain, 0,4 % en Asie orientale et 0,4 % dans l'Océanie. Avec une production annuelle moyenne dépassant les 20 millions de tonnes d'olives dont 90% sont destinées à produire entre 2 à 3 millions de tonnes d'huile ; l'olivier est parmi les principales cultures oléagineuses au monde après le soja, le colza, le tournesol et le palmier à huile (FAOSTAT, 2022 ; COI, 2022).

En Algérie, l'oléiculture occupe plus de 46% des surfaces dédiées aux cultures fruitières. Avec un verger de plus de 60 millions d'oliviers plantés sur environ 430 mille hectares, l'Algérie produit plus de 860 mille tonnes d'olives dont plus de 65% est destinée à l'extraction de l'huile (MADR, 2019) soit environ 100 mille tonnes d'huile d'olive l'équivalent de 4% de la production mondiale, occupant ainsi la 9^{ème} place après le Maroc et la Syrie (COI, 2022). En effet, plus d'un tiers de la production nationale des olives destinées à l'huile provient principalement de trois wilayas de la "Kabylie" : Béjaïa, Tizi Ouzou et Bouira comptant plus de 30% de la superficie oléicole nationale (MADR, 2019). De même, ces wilayas abritent seules près de 65% des huileries où plus de 60% sont de type traditionnel (Lamani, 2014).

L'oléiculture algérienne est maintenue depuis longtemps sous forme d'une culture vivrière particulièrement dans les régions montagneuses (Lamani et Ilbert, 2016) où

l'extraction de l'huile d'olive est réalisée principalement d'une manière traditionnelle dans des huileries fonctionnant avec le système de pression mécanique ou hydraulique (Titouh et *al.*, 2020) alors que le système continu par centrifugation représente à peine 20% de la chaîne oléicole (Mendil, 2009).

Au cours des dernières années, l'oléiculture est considérée comme l'une des plus importantes filières agricoles en Algérie (Journal officiel N°19/2015) et a connu de profondes mutations, pour sa mise à niveau nécessaire à son intégration dans l'économie mondiale (Boudi et *al.*, 2013 ; Aït Mouloud, 2014). Dans ce contexte, de nouvelles plantations plus intensives sont installées dans des zones très arides (Ouargla, Oued Souf, Biskra, etc.) ainsi que la modernisation des huileries et des confiseries (Hadjou et *al.*, 2013) en plus de plusieurs mesures d'accompagnement telles que l'attribution de labels et d'indications géographiques pour les produits oléicoles (Olive de table du Sig à Mascara), création d'associations et d'offices dédiés à l'olivier ainsi que l'organisations de fêtes oléicoles et les programmes de vulgarisation sur les bonnes pratiques (Mendil, 2009 ; Hadjou et *al.*, 2013 ; Aït Mouloud, 2014 ; Lamani, 2014) ont contribué significativement au développement de la filière.

1.5. Amélioration génétique de l'olivier par les méthodes conventionnelles

L'amélioration génétique classique est initiée durant la seconde moitié du 20^{ème} siècle et elle représente jusqu'à présent la stratégie la plus prometteuse pour disposer de nouveaux cultivars plus adaptés aux nouvelles conditions de culture et du milieu (Rallo et *al.*, 2018). Elle représente une solution adéquate pour faire face aux problèmes de l'oléiculture, particulièrement les maladies. Néanmoins, ce type d'amélioration est trop compliqué vu la période juvénile assez longue d'olivier (entre 10 et 15 ans), dépendant particulièrement du génotype ainsi que le manque d'informations sur les aspects génétiques de l'espèce (Rugini et Silvestri, 2016). Malgré que l'olivier est une espèce allogame ; les fleurs de certains cultivars sont complètement autostériles, alors que d'autres sont plus ou moins auto-fertiles en plus de la courte durée de floraison ce qui rend la castration-pollinisation très difficile à pratiquer (Rugini et *al.*, 1995 ; Rugini, 1995 ; Rugini et Baldoni, 2005 ; Rallo et *al.*, 2018).

Les principaux objectifs des programmes d'amélioration de l'olivier sont : la réduction de la période improductive ou juvénile, l'augmentation du nombre et de la taille des fruits, l'augmentation de la teneur et de la qualité de l'huile d'olive, la diminution du phénomène de l'alternance, la réduction du volume et/ou la modification de l'architecture de

l'arbre pour faciliter la taille et la récolte mécaniques, l'amélioration de la résistance aux stress biotique (maladies et insectes ravageurs) et abiotique (sécheresse, froid, etc.), l'obtention de l'auto-fertilité pour réduire la dépendance aux pollinisateurs (Baldoni et Belaj, 2009 ; Rallo et *al.*, 2018 ; Sánchez-Romero, 2019). En plus, des tentatives pour augmenter la capacité d'enracinement et l'adaptation à d'autres climats et milieux pour étendre l'aire de la culture (Rugini, 1995).

Du fait que l'olivier se multiplie principalement par greffage, son amélioration est orientée sur les deux parties du plant : la partie basale ou porte-greffe et la partie aérienne ou greffon (cultivar ou variété). Plusieurs études ont mis en évidence l'influence de l'origine du porte-greffe, pouvant être issus du semis ou de l'oléastre, sur le rendement de la variété (Rugini et Baldoni, 2005 ; Baldoni et Belaj, 2009). Par ailleurs, des porte-greffes clonaux ont été sélectionnés pour leur compatibilité au greffage avec une capacité d'enracinement améliorée qui modifient la vigueur du greffon, alors que d'autres modifient la tolérance au froid, la sécheresse et la résistance aux maladies racinaires (Rugini et Baldoni, 2005) alors que d'autres travaux ont porté sur la sélection de clones nains ou résistants aux maladies (Rugini et *al.*, 2020). Actuellement, presque tous les programmes d'amélioration incluent comme objectif la résistance à la verticilliose et l'œil de paon (Rallo et *al.*, 2018 ; Rugini et *al.*, 2020). Par contre, l'amélioration du greffon est orientée vers les traits végétatifs et reproductifs, résistance aux maladies et ravageurs, tolérance au froid, sécheresse et stress salin en plus de l'amélioration de la qualité et la teneur en huile, l'autofertilité et l'adaptation aux systèmes de culture intensive, et beaucoup plus la réduction de la période juvénile improductive (Rugini et Baldoni, 2005 ; Rallo et *al.*, 2018 ; Rugini et *al.*, 2020).

Les principales étapes d'un programme d'amélioration de l'olivier sont : (i) Établir un inventaire des variétés existantes et la détermination de leur valeur agronomique suivi d'une conservation in-situ ou ex-situ, ensuite (ii) Réaliser des croisements par hybridation et sélection préliminaire. La première étape est en exécution dans plusieurs pays méditerranéens, néanmoins la seconde n'est initiée qu'en Espagne et quelques autres pays (Palestine occupée, Italie, Grèce, Maroc) (Baldoni et Belaj, 2009 ; Rallo et *al.*, 2018). Par conséquent, en dépit des nombreux cultivars développés par ces méthodes classiques ; seulement quelques variétés ont montré un intérêt pratique au contexte actuel de la culture (Rugini et Baldoni, 2005) et la grande partie des cultivars utilisés commercialement provient des sélections faites par les oléiculteurs à travers plusieurs siècles et multipliés par bouturage et/ou par greffage (Rallo et *al.*, 2018).

Parmi les résultats de l'amélioration classique de l'olivier en Italie, les cultivars 'FS17' ou 'Favolosa' et 'Don Carlo' (Fontanazza et *al.*, 1998). Alors qu'en Palestine occupée, le nouveau cultivar 'Maalot' résistant à l'œil de paon, est sélectionné à partir d'une autofécondation de la génération F1 de plantules semi-résistantes du cultivar Chemlali. Les cultivars 'Barena' avec une vigueur et type de croissance verticale et 'Kandesh' comme olive de table sont sélectionnés à partir de populations de plantules obtenues de parents inconnus tandis que le nouveau cultivar 'Askal', un hybride du croisement entre Barena x Manzanillo, est sélectionné pour son adaptation au milieu et son bon rendement en plantations intensives (Lavee et *al.*, 2003). Par la suite, trois nouveaux cultivars 'Arno', 'Tevere' et 'Basento' sont obtenus du croisement de Picholine x Manzanillo (Baldoni et Belaj, 2009). Récemment, plusieurs autres cultivars ont été développés particulièrement pour les plantations intensives. En Italie, la variété 'Lecciana' dérivant du croisement entre 'Arbosana' et 'Leccino' (Camposeo, 2017). En Espagne, le cultivar 'Oliana' issu du croisement entre 'Arbequina' et 'Arbosana' (Cunill et Duran, 2014) ainsi que le nouveau cultivar 'Chiquitita', dérivé d'un croisement entre 'Picual' et 'Arbequina'. Ce dernier cultivar est caractérisé par une production précoce et un rendement élevé en huile, une faible vigueur, une frondaison compacte et des branches suspendues ce qui le rendent plus approprié pour les plantations intensives (Rallo et *al.*, 2008).

Récemment, la sélection de nouveaux cultivars chez l'olivier est devenue plus rapide suite au développement des marqueurs moléculaires. Un marqueur moléculaire SCAR lié avec la tolérance à l'œil de paon est développé (Hernández et *al.*, 2001). Des marqueurs SSR et AFLP sont utilisés pour des essais de paternité dans la progéniture d'olivier et d'oléastre, ainsi que pour étudier la compatibilité entre variétés et identifier, d'une manière évidente, les sélections dans un programme d'amélioration (Rallo et *al.*, 2018). Une des contributions majeures des marqueurs moléculaires dans l'amélioration de l'olivier est la construction de cartes génétiques et la détection de QTLs de plusieurs traits agronomiques (Baldoni et Belaj, 2009).

2. Biotechnologies appliquées à l'olivier

L'utilisation des outils biotechnologiques pourrait être d'une grande utilité pour l'amélioration et la conservation des ressources génétiques oléicoles du fait que les méthodes conventionnelles d'amélioration et de multiplication n'ont produit jusqu'à présent que des résultats limités et sont incapables d'achever seuls des acquis significatifs (Cançado et *al.*,

2013 ; Rugini et *al.*, 2016). En effet, durant la dernière décade ; un progrès significatif est mis au point dans le développement des techniques de clonage de l'olivier (Rallo et *al.*, 2018) en dépit de certaines difficultés rencontrées telles que l'établissement de cultures stériles *in vitro*, l'oxydation et la nécrose des explants ainsi que la morphogénèse à partir des tissus de certains cultivars (Rugini et Silvestri, 2016).

2.1. Techniques de multiplication de l'olivier *in vitro*

La multiplication végétative pourrait être induite dans les cultures tissulaires par le biais des bourgeons axillaires ou de l'embryogenèse somatique pour produire rapidement un grand nombre de plantes à partir de génotypes sélectionnés et pour répondre à la demande croissante d'oliviers certifiés à la fois pour la fidélité génétique et les caractéristiques phytosanitaires. Toutefois, le succès commercial de l'application de ces techniques dépend principalement de l'absence de variants somaclonaux parmi les plantes produites (Leva, 2009).

Cette technique implique la propagation sous conditions contrôlées des cultivars d'olivier, pour produire des plants génétiquement identiques et indemnes de pathogènes notamment chez les variétés présentant des difficultés de propagation par bouturage. Chez l'olivier, il est possible de produire des plantes à partir des tissus zygotiques et matures de plusieurs cultivars avec plusieurs techniques : (1) Micropropagation par stimulation des bourgeons axillaires, (2) Germination des embryons zygotiques et micro-greffage *in vitro*, (3) Organogénèse et (4) Embryogenèse somatique et production de semences artificielles par cryoconservation (Rugini et Gutiérrez-Pesce, 2006).

2.1.1. Microbouturage et micropropagation

La micropropagation de l'olivier par stimulation des bourgeons axillaires remonte aux années 80. Elle est actuellement une réalité commerciale pour la production de plants de plusieurs cultivars à travers les pays oléicoles (Rugini et *al.*, 2020 ; Mirzaei et *al.*, 2021). Les explants utilisés sont généralement des sections nodales avec des bourgeons latéraux forcés de s'allonger *in vitro* et suivi de la propagation des pousses obtenues par segmentation : élongation -fragmentation (Lambardi et *al.*, 2013) produisant des plants d'une bonne qualité phytosanitaire en plus d'une conformité et stabilité génétiques garanties et confirmées par analyses moléculaires (Leva et Petruccioli, 2012 ; Mirzaei et *al.*, 2021) ainsi qu'un comportement normal lors du transfert en conditions naturelles (Leva, 2009 ; Brito et *al.*,

2010) en dépit de quelques variations observées chez les plants régénérés après de longues périodes de maintien *in vitro* (Peyvandi et al., 2009b ; Farahani et al., 2011a et b) ou *in vivo* (Briccoli Bati et al., 2006). En effet, le processus de la micropropagation inclut généralement les étapes suivantes : (1) Collecte et désinfection des explants, (2) Initiation et développement des pousses, (3) Élongation et enracinement et (4) Acclimatation des vitroplants et transfert sur champ (Fabbri et al., 2004).

- *Collecte et désinfection des explants :*

Le microbouturage de l'olivier est confronté à plusieurs problèmes tels que l'oxydation et la nécrose des explants, la faible croissance ainsi que la forte influence du génotype, ainsi que les difficultés de désinfection (Lambardi et al., 2013 ; Rallo et al., 2018 ; Rugini et al., 2020). De ce fait, les explants provenant d'une source présentant des caractéristiques intéressantes avec une bonne croissance végétative durant la période automnale ou printanière et particulièrement un bon état sanitaire permet de réduire significativement le risque des contaminations ainsi qu'un bon développement (Yakoub-Bougdal et al., 2007). En outre, un lavage avec de l'eau contenant un détergent suivi d'un rinçage par eau seule ensuite la désinfection par un trempage dans de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) à diverses concentrations et différentes durées suivi de plusieurs rinçages par l'eau distillée stérile ainsi que l'élimination des parties brunies qui étaient en contact avec l'agent de désinfection ; permet d'avoir les meilleurs résultats (Fabbri et al., 2004). De plus, la suppression des feuilles des boutures réduit le risque des contaminations mais aussi améliore significativement la réactivité des explants (Antonopoulou et al., 2012). Toutefois, une brève immersion dans l'éthanol dilué ou une solution fongicide (Brito et al., 2010) avant la désinfection ou même l'utilisation d'autres désinfectants tels que le chlorure du mercure 'HgCl₂' ou l'hypochlorite de calcium 'CaOCl' avec l'intégration d'un antibiotique (Sghir et al., 2005 ; Zacchini et De Agazio, 2004) ou récemment l'incorporation de nanoparticules d'argent dans le milieu de culture (Rostami et Shahsavari, 2009) ont permis de réduire significativement l'apparition des contaminations d'origine endogène.

- *Initiation et développement des pousses :*

Le développement de pousses d'olivier *in vitro* est principalement influencé par la composition chimique et hormonale du milieu d'induction, qui sont étroitement spécifiques au génotype en culture (Mirzaei et al., 2021).

En effet, l'initiation des cultures se fait souvent sur le milieu "OM" conçu par Rugini (1984) sur la base de l'analyse chimique de feuilles et des embryons zygotiques. En comparaison avec le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) couramment utilisé en culture *in vitro* ; le milieu OM est moins riche en nitrogène mais plus enrichi en micro-éléments. Depuis, ce milieu est fréquemment employé pour l'établissement des cultures de plusieurs cultivars d'olivier à travers le monde (Lambardi et al., 2013) malgré que d'autres compositions minérales telles que MS (Murashige et Skoog, 1962), WPM (Lloyd et McCown, 1980), DKW (Driver et Kuniyuki, 1984) ou RP (Roussos et Pontikis, 2002) étaient plus utilisées pour d'autres variétés (Bartolini et al., 1990 ; Grigoriadou et al., 2002 et 2005 ; Charbaji et al., 2008 ; Donini et al., 2008 ; Peyvandi et al., 2009a ; Vidoy-Mercado et al., 2012).

De plus, la réduction ou la modification de la concentration de un ou plusieurs éléments chimiques (Nitrates, Macro- ou micro-éléments) ou additifs tels que le saccharose (Dimassi, 1999 ; Brhadda et al., 2003b ; Zacchini et De Agazio, 2004 ; Binet et al., 2007 ; Brito et Santos, 2009 ; Padilla et al., 2009 ; Chaari-Rkhis et al., 2011) ou même la substitution ou l'addition de certains composés (Mannitol, Dikegulac, etc.) (Leva et al., 1994 ; Roussos et Pontikis, 2002 ; Farahani et al., 2008 ; Mendoza-de Gyves et al., 2008 ; Leva, 2011 ; Leva et al., 2012a ; Mirzaei et al., 2021) permettent d'aboutir à de meilleures réponses.

En outre, la présence d'une cytokinine notamment la Zéatine à une concentration pouvant atteindre 10 ou 20 mg l⁻¹ est indispensable pour le développement de pousses (Abousalim et al., 2005 ; Lambardi et al., 2013 ; Farooq et al., 2017 ; Mirzaei et al., 2021) quoique de bons résultats sont obtenus aussi avec d'autres cytokinines telles que la BAP ou TDZ (García-Férriz et al., 2002 ; Peixe et al., 2007 ; Rostami et Shahasavar, 2012) ou le 2iP (Peyvandi et al., 2009a) ce qui indique que l'effet de la cytokinine est fortement dépendant du génotype (Micheli et al., 2010 ; Mirzaei et al., 2021).

Par ailleurs, l'initiation des cultures se fait généralement sur un milieu solide tandis que Grigoriadou et al. (2005) ont développé une nouvelle méthode de prolifération en immersion temporaire sur un milieu WPM liquide permettant un développement très significatif des pousses. De ce fait, l'effet du milieu de culture ainsi que sa composition et son type interagissent directement avec le génotype et l'explant à multiplier (Cozza et al., 1997 ; Mirzaei et al., 2021).

- *Elongation et enracinement des pousses :*

Les pousses induites sont très courtes pour être enracinées. Afin d'avoir des plantules prêtes à l'enracinement ; une phase d'élongation est nécessaire sur un milieu additionné d'une gibbérelline GA₃ à des concentrations allant jusqu'à 40 mg l⁻¹ seule ou en combinaison avec une cytokinine (Dimassi et al., 1999 ; Grigoriadou et al., 2002 ; Khan et al., 2002 ; Fabbri et al., 2004 ; Chaari-Rkhis et al., 2006 ; Rostami et Shahasavar, 2012 ; Vidoy-Mercado et al., 2012 ; Lambardi et al., 2013).

L'enracinement est une phase critique dans le processus de la micropropagation du fait qu'elle influence directement l'acclimatation aux conditions externes (Cançado et al., 2013). En effet, l'enracinement des pousses est réalisé généralement en deux étapes débutant par une courte exposition à une auxine souvent AIB ou ANA pendant 1 à 2 semaines sous obscurité suivie d'un transfert sur un milieu dépourvu d'auxines et contenant une cytokinine (Zéatine) (Rugini, 1984 ; Abousalim et al., 2005 ; Farooq et al., 2017). De même, une immersion dans une solution d'AIB pendant quelques secondes (Sghir et al., 2005 ; Peixe et al., 2007 ; Chaari-Rkhis et al., 2011) ou jusqu'à 30 mn (Bartolini et al., 1990) avant la mise en culture améliore significativement l'enracinement des boutures. Padilla et al. (2009) proposent une méthode d'enracinement en une seule étape consistant en une immersion dans une solution d'AIB traversé par des pulsations électriques.

Par ailleurs, Leva (2011) propose un enracinement direct *ex vitro* par immersion dans une solution d'ANA des bases de pousses ou microboutures tri-nodales issues après plusieurs générations de propagation avant de les incuber sous photopériode dans des pots de Coco. De plus, Chaari-Rkhis et al. (2011) ont trouvé que les pousses multi-nodales portant un apex forment plus de racines que celles décapitées. En addition, Peyvandi et al. (2010a) indiquent que l'inoculation des pousses et du substrat par *Pseudomonas fluorescens* améliore significativement la qualité d'enracinement réalisé. Toutefois, l'enracinement peut être amélioré uniquement par incorporation d'autres composés dans le milieu tels que la putrescine synthétique (Rugini et al., 1988 ; Rugini et al., 1993 ; Cozza et al., 1997 ; Grigoriadou et al., 2002 et 2003), le charbon actif (Rugini, 1984 ; Peixe et al., 2007 ; Yakoub-Bougdal et al., 2007), colorant noircissant le milieu (Rugini et al., 1993 ; Mencuccini, 2003) ou la couverture de la base du tube de la culture (Chaari-Rkhis et al., 2011).

- *Acclimatation des vitroplants et transfert sur champ :*

L'acclimatation est une phase critique du processus de micropropagation (Chaari-Rkhis et *al.*, 2015). Elle est généralement réalisée dans des serres dont la lumière et la température sont contrôlées (Rallo et *al.*, 2018 ; Rugini et *al.*, 2020). En effet, les plantules sont détachées du milieu gélosé et leurs racines sont lavées pour éliminer la gélose, ensuite trempées dans une solution de fongicide pour éviter toutes contaminations ultérieures. Par la suite, les plantules sont cultivées dans des pots contenant un substrat drainant tel que la perlite ou vermiculite mélangé avec la tourbe (Fabbri et *al.*, 2004 ; Lambbardi et *al.*, 2013). L'addition d'un fertilisant au substrat ou l'irrigation à l'aide d'une solution minérale (Peixe et *al.*, 2007 ; Brito et *al.*, 2010 ; Chaari-Rkhis et *al.*, 2011) ou l'inoculation des racines par mycorhize (Binet et *al.*, 2007) ou même la pulvérisation des feuilles par une solution de GA₃ (Rugini, 1984 ; Cañas et Benbadis, 1988) permettent un bon développement des plantules lors de l'acclimatation. Les pots sont couverts par du film plastique transparent dans lequel on réalise après une certaine période des perforations pour diminuer graduellement l'humidité relative (Fabbri et *al.*, 2004). Les plantules sont ensuite plantées en pépinière pour une certaine période pour atteindre la taille adéquate permettant leur transfert en plein champ.

2.1.2. Germination d'embryons zygotiques et micro-greffage *in vitro*

La culture d'embryons zygotiques est une méthode très intéressante pour les études sur le développement et la dormance embryonnaires ainsi que la croissance végétative du fait qu'elle assure une source importante de matériel végétal axénique en plus de la création variétale via le sauvetage d'embryons immatures obtenus après croisement entre parents génétiquement éloignés (Haslam et Yeung, 2011 ; Cançado et *al.*, 2013).

Chez l'olivier, la culture d'embryons zygotiques remonte à la fin des années 70 lorsque Diamantoglou et Mitrakos (1979) ont décrit pour la première fois l'isolement des embryons de la semence d'oléastre et leur mise en germination sur un simple milieu nutritif solide. À partir des années 80, plusieurs études indiquent l'utilisation des embryons zygotiques entiers ou leurs différentes parties pour l'induction de l'embryogenèse somatique (Rugini et Tarini, 1986 ; Rugini, 1988), organogenèse (Cañas et Benbadis, 1988) ou pour la génération de plants d'olivier *in vitro* à utiliser comme porte-greffes (Cañas et *al.*, 1987 ; Haddadi et Yakoub-Bougdal, 2010) ou pour la création variétale après croisements contrôlés entre différents cultivars (Montilon et *al.*, 2022) afin de contrecarrer le problème de dormance

physique et biochimique observées chez la semence entière (Acebedo et *al.*, 1997 ; Haslam et Yeung, 2011 ; Montilon et *al.*, 2022).

Les amandes extraites à partir d'olives plus ou moins mures sont désinfectées habituellement par une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) suivi de plusieurs rinçages à l'eau distillée stérile avant d'être incubées en imbibition sous obscurité à la température ambiante pendant 48-72h afin de faciliter la séparation de l'embryon du tégument. En effet, la composition optimale du milieu de culture change avec le degré de maturité de l'embryon (Haslam et Yeung, 2011 ; Cançado et *al.*, 2013) quoique, chez l'olivier la germination est achevée après 6 à 8 semaines d'incubation sur des milieux réduits tels que MS (Acebedo et *al.*, 1997 ; Brhadda et *al.*, 2000 ; Troncoso et *al.*, 2003 ; Kiani et *al.*, 2006 ; Haddadi et Yakoub-Bougdal, 2010 ; Souza et *al.*, 2012 et 2013 ; Chamandoosti, 2014), OM (Cañas et *al.*, 1987 ; García et *al.*, 2002 ; Zienkiewicz et *al.*, 2011), WPM (Germanà et *al.*, 2014) ou même sur une simple eau gélosée (Voyiatzis, 1995 ; Pritsa et *al.*, 1999).

La capacité germinative des embryons zygotiques est fonction de leur degré de maturité. En effet, une récolte tardive réduit fortement la germination des embryons à cause de l'accumulation de substances inhibitrices de la germination dans l'albumen et les tissus embryonnaires (Kiani et *al.*, 2006). De plus, les embryons mures germent facilement même en absence de régulateurs de croissance tandis que les embryons immatures nécessitent impérativement la présence d'hormones notamment les cytokinines telles que la Zéatine (Troncoso et *al.*, 2003 ; Montilon et *al.*, 2022). De même, Souza et *al.* (2013) indiquent que l'addition de l'eau de coco au milieu de germination améliore significativement le développement des plantules qui en dérivent des embryons zygotiques vue sa richesse en éléments nutritifs particulièrement les cytokinines. Toutefois, une balance hormonale déséquilibrée peut provoquer des variations phénotypiques chez les plants obtenus (Haddadi et Yakoub-Bougdal, 2010) ou une callogenèse suivie d'une organogénèse (Chamandoosti, 2014).

La germination de l'olivier *in vitro* peut être améliorée par les conditions de pré-culture ou durant l'incubation des graines. En effet, l'élimination de l'endocarpe et de l'albumen améliore la germination mais aboutit à la formation de plantules souvent de taille plus réduite par rapport à celles issues de la semence entière (Acebedo et *al.*, 1997 ; Germanà et *al.*, 2014). Ceci serait dû au fait que les réserves dans les cotylédons sont mobilisés graduellement à partir de l'endosperme jusqu'à l'autotrophie des plantules (Zienkiewicz et *al.*,

2011). Par conséquent, une concentration de 10 à 20 g l⁻¹ de saccharose est largement suffisante pour une bonne germination alors que les concentrations les plus élevées peuvent avoir un effet négatif même sur les pousses issues par micropropagation (García et al., 2002). De plus, l'incubation continue des cultures à des températures variant de 10 à 20°C ou une pré-incubation à une basse température d'environ 10°C durant 2 à 3 semaines suivie de la culture sous 15 à 20°C permettent une bonne germination tandis que les températures supérieures à 25°C la réduisent fortement (Voyiatzis, 1995 ; Brhadda et al., 2000). En plus, le maintien des cultures sous une photopériode aboutit à une germination plus rapide et à des plantules bien développées que sous l'obscurité (Souza et al., 2012).

Peu d'études sont réalisées sur le micro-greffage de l'olivier, particulièrement dans le but d'induire un rajeunissement chez les cultivars récalcitrants. En effet, Revilla et al. (1996) ont décrit le micro-greffage en fente de pousses apicales du cultivar 'Arbequina' régénérées *in vitro* par microbouturage sur des microboutures multi-nodales issues de la germination des embryons zygotiques et dont les bourgeons axillaires sont éliminés pour éviter la reprise du porte-greffe. Après l'assemblage du greffon et du porte-greffes par un anneau de silicone ; la formation de cal suivie de l'union cellulaire aboutissant à la différenciation de tissus vasculaires sont observés durant les deux premières semaines de culture (Troncoso et al., 1999) aboutissant à des plants bien développés après environ 8 semaines (Revilla et al., 1996). Dans ce cas, les cultures sont incubées sous photopériode et sur un milieu riche en cytokinine. Revilla et al. (1996) ont utilisé le milieu DKW additionné de 1 mg l⁻¹ de BAP alors que Farahani et al. (2011c) ont incubé les micro-greffes du cultivar 'Zard' sur 'Koroneiki' sur le milieu OM contenant de la Zéatine. Par ailleurs, Rache-Cardenal et al. (2008) indiquent que la 2iP additionnée au milieu MS permet un bon taux de survie et de reprise du greffon par rapport à la BAP.

2.1.3. Organogenèse

L'organogénèse est la base fondamentale de la multiplication végétative *in vitro*. C'est le processus par lequel des cellules de n'importe quel tissu se différencient pour produire différents organes (racines, bourgeons, etc.) après formation de cal (Margara, 1984 ; Fabbri et al., 2004). Chez l'olivier, les principaux types d'organogénèse obtenue consistaient en des racines et pousses après formation de cal. En effet, une callogenèse précédant la formation de racines est obtenue pour la première fois par Grossoni (1979) à partir de tissus adultes (segments inter-nodaux) du cultivar 'Frantoio' sur les milieux ½ Knop et MS additionnés

d'ANA et Kinétine. Par la suite, Cañas et Benbadis (1988) ont observé la formation de racines et de pousses sur les cals issus de la culture des sections basales de cotylédons d'embryons zygotiques respectivement en présence d'AIB et de 2iP. De même, Orinos et Mitrakos (1991), Trabelsi et *al.* (2003) et Brhadda et *al.* (2008) indiquent l'apparition de racines sur les cals des segments cotylédonaires après trois semaines de culture sur un milieu riche en AIB ou ANA. De plus, des tissus matures (pétioles, fragments foliaires et bourgeons) sont utilisés par Mencuccini et Rugini (1993), Rugini et Caricato (1995), Capelo et *al.* (2010) et Bahrami et *al.* (2010) en présence de cytokinines notamment TDZ seul ou avec l'ANA pour induire la formation de pousses et de racines dès les premières semaines de culture tandis que Rugini (1988) indique l'obtention de racines uniquement chez les disques de feuilles sur un milieu contenant du 2,4-D ou ANA en combinaison avec la BAP.

2.1.4. Embryogenèse somatique

L'embryogenèse somatique est un processus morphogénétique par lequel des cellules somatiques produisent une structure bipolaire morphologiquement semblable à l'embryon zygotique appelée 'embryon somatique' capable de se développer en une plante entière (Pliego-Alfaro et Barceló-Muñoz, 2001 ; Neumann et *al.*, 2009). L'embryogenèse somatique implique une conversion de l'état somatique vers un autre état embryogène par des changements cellulaire, biochimique, génétique et épigénétique coordonnées, et qui sont induits par un stress exogène qui déclenche une expression massive de gènes (Aguilar-Hernández et Loyola-Vargas, 2018). Les embryons somatiques peuvent se différencier directement de l'explant (embryogenèse somatique directe) ou indirectement après formation d'un cal (embryogenèse somatique indirecte) (Von Arnold, 2008). Ce processus est devenu une technique commune de régénération pour plusieurs espèces ligneuses vue l'amélioration des connaissances sur les facteurs physiologiques et biochimiques contrôlant l'induction et le maintien ainsi que la maturation et le développement des ES (Benelli et *al.*, 2001). Elle permet l'application de plusieurs outils biotechnologiques tels que la transformation génétique, variation somaclonale, sélection *in vitro* et cryoconservation des génotypes intéressants (Sánchez-Romero, 2019 et 2021). L'embryogenèse somatique est une technique qui présente une grande utilité économique pour la production d'un grand nombre de plantes en un espace et temps réduits en plus de son importance dans les études histologiques, physiologiques et génétiques (Cançado et *al.*, 2013).

Chez l'olivier, l'embryogenèse somatique représente le système de régénération *in vitro* le plus utilisé (Palomo-Ríos et al., 2021). Elle est décrite pour la première fois par Rugini et Tarini (1986) ayant utilisé les racines des plantules obtenues par semis *in vitro* pour induire des cals embryogènes. Par la suite, Rugini (1988) ont pu régénérer des plantes entières à partir de cals induits à partir d'embryons zygotiques entiers. Depuis, plusieurs travaux sont réalisés pour optimiser les différentes étapes et conditions de régénération par embryogenèse somatiques chez les principaux cultivars d'olivier à travers certains pays oléicoles comme la Grèce (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et al., 1992 ; Pritsa et Voyiatzis, 1999), l'Italie (Rugini et Caricato, 1995 ; Leva et al., 1995), l'Iran (Peyvandi et al., 2001 et 2010b), la Jordanie (Shibli et al., 2001), la Tunisie (Maalej et al., 2002 ; Trabelsi et al., 2003), le Maroc (Brhadda et al., 2003a et 2008 ; Mazri et al., 2011, 2012, 2013 et 2020 ; Toufik et al., 2014 et 2017 ; Oulbi et al., 2018 et 2021), l'Espagne (Cerezo et al., 2011) ainsi que le Portugal (Capelo et al., 2010 ; Pires et al., 2020).

L'origine histologique des embryons somatiques chez l'olivier a fait l'objet de plusieurs études. En effet, Benelli et al. (2001) indiquent qu'il n'est pas possible de prouver si l'origine des embryoïdes est mono ou multicellulaire du fait que l'analyse histologique révèle la présence de plusieurs centres d'activité méristématique périphériques ou internes (Brhadda et al., 2007) où les premières divisions localisées sont détectées chez plusieurs cellules de la zone épidermique et sub-épidermique du cal (Benelli et al., 2001). Les divisions observées aboutissent après plusieurs semaines à l'apparition de petits globules considérés comme des pro-embryons qui augmentent de taille d'une manière isodiamétrique avec une activité mitotique dans la zone centrale dirigeant les divisions dans deux sens de telle sorte à former une structure bipolaire prenant la forme d'un cœur (stade cordiforme) puis d'un torpide (Lambardi et al., 1999a ; Benelli et al., 2001 ; Peyvandi et al., 2001 et 2008). Cette structure reste toujours insérée sur le tissu primaire à travers sa partie radiculaire considérée comme un suspenseur (Brhadda et al., 2007) avant une séparation plus ou moins évidente lors du stade cotylédonaire parfait (Benelli et al., 2001). De plus, selon Capelo et al. (2010) les cellules épidermiques périphériques des nodules ou même des embryons somatiques au stade de développement avancé 'cotylédonaire' montrent une forte activité mitotique avec des divisions périclinales fréquentes aboutissant à la différenciation de nouveaux globules développant d'autres embryons à la surface par embryogenèse secondaire répétitive et continue (Brhadda et al., 2003a ; Von Arnold, 2008).

Le processus de régénération de plants par embryogenèse somatique passe par plusieurs étapes commençant par l'induction de cals embryogènes suivie de leur maintien et leur prolifération ensuite leur différenciation et maturation en embryons somatiques, et enfin, leur germination et conversion en plantules acclimatables (Bhojwani et Razdan, 1996 ; Sánchez-Romero, 2019). En effet, la majorité des travaux établis sur l'olivier considèrent trois principales étapes débutant par l'établissement d'une culture embryogène regroupant l'induction et la prolifération des cals, suivi par une phase d'expression de leur capacité embryogène à développer des embryons structurés prêts, finalement, à une conversion par leur mise en germination (Rugini et *al.*, 1988 ; Leva et *al.*, 1995 ; Rugini et Caricato, 1995 ; Shibli et *al.*, 2001 ; Maalej et *al.*, 2002 ; Brhadda et *al.*, 2003a, 2007 et 2008 ; Trabelsi et *al.*, 2003 ; Cerezo et *al.*, 2011 ; Mazri et *al.*, 2011, 2012 et 2013 ; Cançado et *al.*, 2013 ; Toufik et *al.*, 2014 et 2017 ; Oulbi et *al.*, 2018 ; Rallo et *al.*, 2018 ; Pires et *al.*, 2020 ; Oulbi et *al.*, 2021).

2.1.4.1. Induction des cultures embryogènes

L'établissement d'une culture embryogène est l'une des étapes limitantes dans le processus de régénération par embryogenèse somatique du fait que toutes les autres étapes qui suivent en dépendent directement (Sánchez-Romero, 2018 et 2019). En effet, l'induction de cals embryogènes est influencée par plusieurs facteurs tels que le génotype, origine et âge de l'explant mais notamment les conditions d'induction (Bhojwani et Razdan, 1996 ; Von Arnold, 2008).

a. Explants utilisés

L'induction des cultures embryogènes peut être réalisée à partir de différents types d'explants. Néanmoins, le succès de cette induction dépend beaucoup plus de l'âge de l'explant, de ce fait, pour plusieurs espèces récalcitrantes telles que l'olivier, un tissu juvénile doit être utilisé comme source d'explants pour obtenir l'embryogenèse somatique (Bhojwani et Razdan, 1996 ; Von Arnold, 2008).

Chez l'olivier, l'embryogenèse somatique a été induite à partir de tissus juvéniles et adultes tels que les embryons zygotiques entiers soit matures ou immatures (Rugini, 1988 ; Maalej et *al.*, 2002), les radicules d'embryons zygotiques (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et *al.*, 1992 ; Peyvandi et *al.*, 2001 et 2010b ; Cerezo et *al.*, 2011 ; Mazri et *al.*, 2011 et 2012 ; Toufik et *al.*, 2017 ; Pires et *al.*, 2020), les cotylédons entiers (Leva et *al.*,

1995 ; Mazri et *al.*, 2011 ; Brhadda et *al.*, 2008) ou les segments de cotylédons (Mitrakos et *al.*, 1992 ; Pritsa et Voyiatzis, 1999 ; Peyvandi et *al.*, 2001 et 2010b ; Brhadda et *al.*, 2003a et 2007 ; Trabelsi et *al.*, 2003 ; Mazri et *al.*, 2012 ; Pires et *al.*, 2020). Les tissus adultes sont généralement utilisés pour garder la conformité variétale. Ils peuvent être prélevés à partir de plants *in vivo* ou *in vitro* tels que les parties du limbe des feuilles (Rugini, 1988 ; Shibli et *al.*, 2001 ; Mazri et *al.*, 2011 et 2013 ; Trabelsi et *al.*, 2011 ; Toufik et *al.*, 2014 ; Oulbi et *al.*, 2018 et 2021), les pétioles (Rugini et Caricato, 1995 ; Shibli et *al.*, 2001 ; Capelo et *al.*, 2010 ; Mazri et *al.*, 2011 et 2013 ; Toufik et *al.*, 2014 ; Oulbi et *al.*, 2018), les hypocotyles ou les racines (Shibli et *al.*, 2001) ou même les organes de reproduction comme les ovaires et les étamines (Ramezani et Shekafandeh, 2009 ; Mazri et *al.*, 2011). Cependant, les meilleurs résultats de formation de cals embryogènes sont souvent obtenus à partir des radicules d'embryons zygotiques du fait qu'ils sont formés par des cellules peu différenciées (méristématiques) et ayant un potentiel morphogénétique élevé (Pliego-Alfaro et Barceló-Muñoz, 2001).

L'induction à partir de tissus adultes est l'un des principaux challenges du processus (Palomo-Ríos et *al.*, 2021). L'utilisation de ces tissus dépend fortement de l'âge du tissu (Pires et *al.*, 2020) et fortement du génotype (Rugini et Silvestri, 2016) car ce type d'explants (feuilles et pétioles) produit soit des cals spongieux sans expression embryogène effective (Mazri et *al.*, 2011 ; Toufik et *al.*, 2014 ; Oulbi et *al.*, 2018 et 2021) soit des cals organogènes avec des racines (Rugini, 1988), des pousses (Rugini et Caricato, 1995) ou bien des bourgeons (Mazri et *al.*, 2013). De plus, certains tissus adultes comme les ovaires et les étamines génèrent des cals amorphes qui se nécrosent très rapidement (Ramezani et Shekafandeh, 2009 ; Mazri et *al.*, 2011). Toutefois, les pétioles et les parties externes du limbe notamment la partie proximale ainsi que les apex de pousses sont les tissus adultes les plus prometteurs pour la régénération de l'olivier (Rugini et Caricato, 1995 ; Mazri et *al.*, 2013 ; Oulbi et *al.*, 2018 et 2021) et l'oléastre (Capelo et *al.*, 2010 ; Narváez et *al.*, 2019). Rugini et Caricato (1995) ont développé une méthode nommée "système de régénération double" permettant une embryogenèse somatique à partir de tissus matures *in vitro* (feuilles et bourgeons) issus d'une organogenèse induite sur un matériel adulte (feuilles et pétioles) prélevé à partir de pousses régénérées sur des bourgeons axillaires et maintenues en multiplication par repiquages successifs sur une longue période de 3 à 5 années. Néanmoins, d'autres travaux préconisent l'utilisation de feuilles et pétioles prélevés directement à partir de pousses maintenues *in vitro* pour une durée allant d'une année (Shibli et *al.*, 2001 ; Toufik et *al.*,

2014) jusqu'à 3 ou 4 ans (Benelli et al., 2001 ; Mazri et al., 2011 et 2013 ; Oulbi et al., 2018). Ce long séjour *in vitro* se fait dans l'objectif d'induire un rajeunissement des tissus (Mazri et al., 2013) du fait que les explants prélevés directement *in vivo* même à partir de plants jeunes ne donnent aucune organogenèse *in vitro* (Mencuccini et Rugini, 1993) mais uniquement une callogenèse amorphe (Rugini, 1988).

b. Facteurs nutritionnels et hormonaux

Régulateurs de croissance

L'induction de l'embryogenèse somatique se fait en cultivant l'explant sur un milieu contenant une auxine, et dans certains cas une cytokinine (Pliego-Alfaro et Barceló-Muñoz, 2001 ; Von Arnold, 2008 ; Neumann et al., 2009 ; Cançado et al., 2013 ; Palomo-Ríos et al., 2021). Le transfert sur un milieu généralement de même composition chimique mais dépourvus d'auxines ou avec une concentration réduite est généralement nécessaire pour favoriser l'expression embryogène (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et al., 1992 ; Bhojwani et Razdan, 1996 ; Peyvandi et al., 2001). Le besoin en auxine ou autres régulateurs de croissance additionnés pour l'initiation de l'embryogenèse somatique est fonction de l'état de développement de l'explant (Von Arnold, 2008) mais aussi de l'explant (Mazri et al., 2011) et du type d'auxine (Rugini, 1988).

Selon Rugini (1995) l'induction de l'embryogenèse somatique chez l'olivier peut être obtenue avec de faibles concentrations d'auxines mais aussi en leur absence totale. Les auxines ne sont pas indispensables pour le développement précoce des cals (Lavee et Messer, 1969). Par conséquent, la combinaison des auxines et cytokinines semble être essentiel pendant la phase d'induction de cals (Maalej et al., 2002 ; Hegazi et al., 2017).

Le type et la concentration des régulateurs de croissance, notamment les auxines, varient en fonction du génotype mais beaucoup plus selon le type d'explant utilisé. En effet, l'ANA est souvent l'auxine la plus utilisée pour l'induction de cals embryogènes à partir de matériel adulte tels que les pétioles et feuilles en combinaison avec le thidiazuron (TDZ) (Rugini et Caricato, 1995 ; Mazri et al., 2011 et 2013 ; Rugini et Silvestri, 2016 ; Narváez et al., 2019) ou bien avec le 2iP (Trabelsi et al., 2011) ou Zéatine (Oulbi et al., 2018). Par ailleurs, l'AIB avec la 2iP reste généralement la combinaison hormonale la plus utilisée chez les tissus les plus juvéniles tels que les radicules des embryons zygotiques (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et al., 1992 ; Cerezo et al., 2011 ; Mazri et al., 2011 et 2012 ;

Toufik et *al.*, 2017 ; Pires et *al.*, 2020) ou les parties proximales des cotylédons (Peyvandi et *al.*, 2001 et 2010b ; Trabelsi et *al.*, 2003 ; Mazri et *al.*, 2012). Toutefois, l'ANA avec la 2iP ou TDZ a permis de bons résultats à partir des cotylédons (Leva et *al.*, 1995 ; Brhadda et *al.*, 2008 ; Hegazi et *al.*, 2017) ou embryons zygotiques entiers (Maalej et *al.*, 2002). De même, Capelo et *al.* (2010) et Toufik et *al.* (2014) ont obtenu leurs meilleurs résultats respectivement à partir de feuilles d'oléastre et de pétioles du cultivar 'Picual' en présence d'AIB combinée avec le 2iP ou Zéatine. En outre, Rugini (1988 et 1995) indique que le 2,4-D, à n'importe quelle concentration, inhibe l'embryogenèse somatique suite à une nécrose rapide des cals induits.

Milieu d'induction

Le besoin en éléments nutritifs pour l'embryogenèse somatique dépend surtout du type d'explant utilisé ainsi que son état de développement et moins du génotype (Maalej et *al.*, 2006 ; Rallo et *al.*, 2018). Il n'existe pas de milieu standard pour l'induction de cultures embryogènes chez l'olivier, malgré que le milieu OM (Rugini, 1984) modifié par Cañas et Benbadis (1988) soit couramment utilisé avec les tissus juvéniles tels que les racines d'embryons zygotiques (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Cerezo et *al.*, 2011 ; Mazri et *al.*, 2011 et 2012 ; Toufik et *al.*, 2017 ; Pires et *al.*, 2020) ou les segments cotylédonaires (Mitrakos et *al.*, 1992 ; Peyvandi et *al.*, 2001 et 2010b ; Trabelsi et *al.*, 2003 ; Mazri et *al.*, 2012). Cependant, la composition du milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) souvent réduite de moitié en macroéléments se montre souvent plus bénéfique pour l'induction à partir de matériel adulte tels que les pétioles, les feuilles et les apex d'olivier (Rugini et Caricato, 1995 ; Trabelsi et *al.*, 2011 ; Mazri et *al.*, 2013) et d'oléastre (Capelo et *al.*, 2010 ; Narváez et *al.*, 2019). Toutefois, Toufik et *al.* (2014) et Oulbi et *al.* (2018) ont obtenu leurs meilleurs résultats à partir de feuilles et de pétioles respectivement des cultivars 'Picual' sur le milieu OM et 'Picholine Marocaine' sur ½ OM. Par ailleurs, l'induction à partir de cotylédons entiers ainsi que les racines de vitrosemis était plus efficace sur le milieu MS entier (Shibli et *al.*, 2001 ; Brhadda et *al.*, 2003a, 2007 et 2008) ou réduite de moitié pour les embryons zygotiques (Rugini, 1988 ; Pritsa et Voyiatzis, 1999 ; Maalej et *al.*, 2002).

Source de carbone

La source de carbone affecte l'initiation de l'embryogenèse somatique chez plusieurs espèces (Von Arnold, 2008). Chez l'olivier, indépendamment du tissu ; le saccharose induit

l'embryogenèse somatique mieux que le fructose et le glucose, alors que le mannitol et le sorbitol, en dépit de la forte callogenèse qu'ils induisent, ils réduisent la capacité embryogène du cal (Therios, 2009 ; Shibli et *al.*, 2001 ; Trabelsi et *al.*, 2003 ; Brhadda et *al.*, 2008) et entravent, par la suite, la germination des embryons somatiques (Rugini, 1988) tout en favorisant l'organogenèse (Brhadda et *al.*, 2008). En effet, une concentration variant de 20 g l⁻¹ (Rugini, 1988 ; Orinos et Mitrakos, 1991 ; Cerezo et *al.*, 2011 ; Mazri et *al.*, 2011 ; Toufik et *al.*, 2017 ; Pires et *al.*, 2020) à 30 g l⁻¹ de saccharose (Leva et *al.*, 1995 ; Rugini et Caricato, 1995 ; Shibli et *al.*, 2001 ; Brhadda et *al.*, 2003a et 2007 ; Capelo et *al.*, 2010 ; Trabelsi et *al.*, 2003 et 2011 ; Mazri et *al.*, 2013 ; Toufik et *al.*, 2014) reste la plus optimale au développement des embryons somatiques alors que des doses dépassant 30 ou 40 g l⁻¹ peuvent affecter négativement le processus d'embryogenèse somatique (Trabelsi et *al.*, 2003 ; Brhadda et *al.*, 2008).

Conditions d'induction

L'induction des cals embryogènes d'olivier est souvent réalisée sous obscurité totale (Rugini, 1988) du fait que la lumière inhibe l'expression embryogène (Rugini et Caricato, 1995) en favorisant la formation de gros cal compacts généralement organogènes (Trabelsi et *al.*, 2003 ; Hegazi et *al.*, 2017) ou complètement amorphes (Ramezani et Shekafandeh, 2009). Cependant, Orinos et Mitrakos (1991) indiquent que les conditions de photopériode peuvent améliorer l'expression embryogène des cals de radicules d'embryons zygotiques. Dans ce sens, Pires et *al.* (2020) indiquent que la lumière n'a pas d'effet sur la formation de cals mais affecte plus la nature du cal obtenu. Ces auteurs ont observé plus d'embryogenèse chez le même type d'explant (radicule ou cotylédons) du cultivar 'Galega Vulgar' sous photopériode que sous obscurité. Inversement, Peyvandi et *al.* (2001) indiquent que les cals des différentes parties de l'embryon zygotique du cultivar 'Mission' montrent un potentiel embryogène plus élevé sous obscurité qu'en conditions de photopériode. Par conséquent, l'influence des conditions d'incubation des explants varie en fonction du type de tissus et du génotype.

Durée d'induction

La durée minimale pour l'obtention de cals embryogènes d'olivier varie d'un cultivar à l'autre mais beaucoup plus en fonction du type d'explant utilisé et du milieu d'induction. En effet, les tissus adultes sur milieu solide nécessitent une longue durée d'incubation en présence d'une balance hormonale pouvant atteindre 3 mois avant d'être transférés et

maintenus au moins deux mois sur un milieu sans hormones (Rugini et Caricato, 1995 ; Shibli et *al.*, 2001 ; Mazri et *al.*, 2013 ; Toufik et *al.*, 2014 ; Oulbi et *al.*, 2018) ou avec une concentration réduite d'auxine pour favoriser l'expression embryogène (Trabelsi et *al.*, 2011). De même, Capelo et *al.* (2010) ont incubé les feuilles d'oléastre pendant 3 mois en présence d'hormones ensuite 4 semaines sur un milieu dépourvu d'auxine. Néanmoins, Mazri et *al.* (2013) et Narváez et *al.* (2019) préconisent une incubation des explants de feuilles du cultivar 'Dahbia' et d'apex d'oléastre respectivement dans un milieu liquide pendant moins d'une semaine à cause de l'oxydation rapide avant de les transférer sur un milieu sans hormones pendant deux mois. Par ailleurs, l'induction de cals à partir de radicules, cotylédons ou embryons zygotiques entiers peut être réalisée après 3 à 6 semaines seulement en présence d'hormones suivie d'un repiquage de 1 à 2 mois sur un milieu appauvri ou dépourvu d'auxines (Rugini, 1988 ; Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et *al.*, 1992 ; Maalej et *al.*, 2002 ; Brhadda et *al.*, 2003a, 2007 et 2008 ; Trabelsi et *al.*, 2003 ; Cerezo et *al.*, 2011 ; Mazri et *al.*, 2011 et 2012 ; Toufik et *al.*, 2017 ; Pires et *al.*, 2020).

2.1.4.2. Maintien et prolifération des cals embryogènes

On entend par cultures embryogènes un ensemble de masses cellulaires caractérisées par une activité mitotique continue permettant une embryogenèse somatique secondaire ou répétitive (Brhadda et *al.*, 2003a ; Von Arnold, 2008). Elles peuvent être maintenues par subcultures mensuelles durant plusieurs années sur un milieu de composition chimique généralement similaire à celle du milieu d'induction (Rugini et Baldoni, 2005 ; Cerezo et *al.*, 2011).

Chez l'olivier, plusieurs formulations chimiques à base de milieux standards OM et MS additionnées d'hormones et d'autres additifs sont développées pour garder les cals en prolifération continue. En effet, la prolifération des cals issus des tissus adultes est réalisée avec des repiquages très rapprochés de 3 à 4 semaines sur des milieux riches, notamment en auxines, tels que OM (Toufik et *al.*, 2014) ou MS (Shibli et *al.*, 2001 ; Capelo et *al.*, 2010) tandis que les cals des explants zygotiques sont maintenus jusqu'à 8 semaines entre subcultures sur des milieux OM ou MS réduits dont la concentration est réduite de moitié (Rugini, 1988 ; Maalej et *al.*, 2002) ou modifiés (Peyvandi et *al.*, 2001 et 2010b ; Trabelsi et *al.*, 2003), et souvent additionnés d'une balance hormonale plus riche en cytokinines. De même, Pérez-Barranco et *al.* (2007) et Cerezo et *al.* (2011) ont trouvé que le milieu ECO basé sur le milieu OMe (Cañas et Benbadis, 1988) contenant $\frac{1}{4}$ des macroéléments OM, $\frac{1}{4}$ des

microéléments MS ainsi que $\frac{1}{2}$ des vitamines OM, améliore significativement la capacité des cals des racines d'EZ à former des embryons matures par rapport au milieu OMc (Cañas et Benbadis, 1988). Par ailleurs, l'agent de gélification du milieu est un facteur déterminant durant cette phase et joue un rôle important sur le mode de prolifération et le maintien de la capacité embryogène. En outre, le phytigel est souvent utilisé à la place de l'agar vu son pouvoir gélifiant (Sánchez-Romero, 2019).

Par ailleurs, l'incubation des cultures se fait habituellement sous obscurité du fait que l'expression embryogène est complètement inhibée en conditions de photopériode (Rugini et Caricato, 1995) qui induit le verdissement et durcissement des cals généralement organogènes ou amorphes (Trabelsi et *al.*, 2003 ; Ramezani et Shekafandeh, 2009). En outre, Cerezo et *al.* (2011) préconisent une pré-culture pendant 4 semaines sur un milieu liquide suivie d'un tamisage à travers une maille de 2 mm, et ce, afin de synchroniser les cultures permettant une production stable de pro-embryons (Palomo-Ríos et *al.*, 2021).

2.1.4.3. Différenciation et maturation des embryons somatiques

Les embryons somatiques sont morphologiquement similaires aux embryons zygotiques (Hervé et *al.*, 2001 ; Neumann et *al.*, 2009), et passent par les stades globulaire, cordiforme, torpide et cotylédonaire (Lambardi et *al.*, 1999a) donnant lieu à des changements morphologiques et biochimiques impliquant l'accumulation de produits de réserve (Braybrook et Harada, 2008).

Chez l'olivier, peu d'études ont été réalisées sur la maturation des embryons somatiques considérée comme une phase moins critique dans le processus d'embryogenèse somatique (Rugini *al.*, 2005) parce que la conversion des ES d'olivier n'exige pas une phase de maturation rigoureuse (Sánchez-Romero, 2018 ; Pires et *al.*, 2020). De ce fait, la maturation se fait généralement sur un milieu solide dérivé des milieux MS ou OM dépourvu d'hormones et additionné de charbon actif (Sánchez-Romero, 2019). Dans ce contexte, Cerezo et *al.* (2011) ont trouvé que les masses embryogènes étalées pendant deux mois sur un milieu de base ECO additionné de 1 g l^{-1} de charbon actif génèrent plus d'ES matures que celles cultivées sur un milieu OMc. De plus, Benzekri et Sánchez-Romero (2012) indiquent qu'une concentration du sucre supérieures à 20 g l^{-1} n'affecte pas le nombre d'ES développés et favorise le développement de petits embryons translucides comme un signe d'une embryogenèse secondaire. Par contre, l'ajout de l'ABA utilisé pour synchroniser le

développement des ES des cultivars ‘Canino’ et ‘Moraiolo’ (Rugini et *al.*, 2020) n’a pas été bénéfique dans le cas de ‘Picual’ (Benzekri et Sánchez-Romero, 2012).

Par ailleurs, la maturation dans des boîtes de Pétri permet d’avoir plus d’embryons que dans des tubes à essais. Par contre, une concentration élevée de l’agent de gélification provoque une forte solidification du milieu et induit une diminution significative du nombre total d’ES récupérés (Benzekri et Sánchez-Romero, 2012) suite à une forte déshydratation des masses cellulaires. En effet, une bonne maturation et différenciation d’ES est observée sur un milieu solidifié par le phytigel que d’autres agents de gélification (Sánchez-Romero, 2019). En outre, Cerezo et *al.* (2011) ont développé une nouvelle approche de dessiccation des ES sur une membrane semi-perméable d’acétate de cellulose, et ce, durant le premier mois de maturation ce qui permet une amélioration significative du nombre d’ES matures récupérés par explant.

2.1.4.4. Germination des embryons somatiques

Peu de travaux ont été effectués sur l’obtention de plantules d’olivier à partir d’embryons somatiques notamment à partir de matériel adultes car la majorité des études indiquent une régénération à partir d’ES issus des radicules ou cotylédons d’EZ. Par ailleurs, le faible taux de conversion reste le plus grand obstacle du processus de régénération par embryogenèse somatique chez l’olivier (Rugini et *al.*, 2005) causé principalement par des déficiences dans le développement et maturation embryonnaires (Sánchez-Romero, 2018 et 2019).

En effet, la germination *in vitro* a lieu généralement sur un milieu basique dépourvu d’hormones, solidifié avec de l’agar et additionné d’un sucre comme le saccharose en plus d’une incubation de 2 à 3 mois sous une photopériode de 16h de lumière. Les milieux les plus utilisés dérivent du milieu OM (Rugini, 1988 ; Trabelsi et *al.*, 2003 ; Pires et *al.*, 2020) ou MS (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Brhadda et *al.*, 2003a, 2007 et 2008) tandis que Maalej et *al.* (2002) et Cerezo et *al.* (2011) ont utilisé le milieu MS réduit de $\frac{1}{2}$ ou de $\frac{1}{3}$ de ses macroéléments respectivement, alors que Toufik et *al.* (2017) ont cultivé les ES issus des cals de radicules du cultivar ‘Dahbia’ sur le milieu ECO (Pérez-Barranco et *al.*, 2007 ; Cerezo et *al.*, 2011). Par ailleurs, Trabelsi et *al.* (2003) et Brhadda et *al.* (2003a, 2007 et 2008) indiquent que l’addition de la zéatine au milieu peut améliorer la conversion des ES alors que la présence de cette hormone inhibe complètement la germination selon Toufik et *al.* (2017) et

Mazri et al. (2020) qui serait sous l'effet du génotype. De plus, une concentration de 10 à 20 g l⁻¹ de saccharose est largement suffisante pour la germination des ES (Cerezo et al., 2011 ; Toufik et al., 2017 ; Mazri et al., 2020) car la présence du sorbitol ou mannitol augmenterait l'osmolarité du milieu et peut inhiber ainsi la germination (Rugini, 1995 ; Mazri et al., 2020).

2.1.4.5. Régénération de plantules et cryoconservation

Les plantules issues de l'embryogenèse somatique, sans passer par une phase de multiplication ou d'enracinement, sont souvent acclimatées directement de la même manière que celle des plants régénérés par microbouturage sur un mélange de sable, tourbe ou terreau et une argile (vermiculite ou perlite). Par ailleurs, les cultures embryogènes notamment les embryons somatiques semblent être le matériel le plus adéquat à la cryoconservation que les bourgeons (Sánchez-Romero, 2019). En effet, plusieurs études décrivent une conversion efficace de plantules suite à la conservation des ES issus de différents types d'explants après un traitement d'encapsulation dans une solution protectrice composée souvent de glycérol et de saccharose suivi d'une phase de déshydratation dans l'azote liquide ou une vitrification dans la glace (Shibli et Al-Juboory, 2000 ; Sánchez-Romero et al., 2009 ; Lynch et al., 2011 ; Bradaï et al., 2017 ; Bradaï et Sánchez-Romero, 2021a et b ; Bradaï et al., 2023).

2.2. Stabilité morpho-génétique des plantes régénérées *in vitro*

Plusieurs études indiquent que les plantules d'olivier régénérées par les différentes techniques de multiplication *in vitro* sont morphologiquement similaires à celles obtenues par les méthodes conventionnelles et ne présentent pas d'anomalies phénotypiques même après acclimatation en conditions naturelles (Leva et al., 1995). Cependant, il faut noter que leur transfert au sol est souvent difficile à cause de leur fragilité (Brhadda et al., 2007). Toutefois, certains facteurs peuvent induire des changements morpho-génétiques notamment le système de régénération, source d'explants, composants du milieu, durée et nombre de cycles de culture ainsi que le génotype (Leva et al., 2012b ; Mirzaei et al., 2021).

En effet, la majorité des travaux effectués sur le microbouturage d'olivier *in vitro* suivis ou non d'une micropropagation indiquent que les plantules régénérées présentent un phénotype normal similaire à celui de la plante mère source d'explants (Leva et al., 2012b). De plus, Leva et Petruccelli (2012) ont pu vérifier, en utilisant les marqueurs RAPD et ISSR, l'identité et la stabilité génétiques des plants micropropagés du cultivar 'Maurino' après une année de maintien *in vitro* et 9 ans de culture en plein champ. De même, Hassan et al. (2016)

via des marqueurs RAPD indiquent que les vitroplants des cultivars 'Picual', 'Koroneiki' et 'Manzanillo' produits *in vitro* présentent une grande similarité atteignant 93% avec la plante mère. En outre, en utilisant des marqueurs SSR et RAPD, Narváez et al. (2019) et Brito et al. (2010) ainsi que Haddad et al. (2017) indiquent que les plantules d'oléastre et celles de l'olivier de Laperrine morphologiquement normales sont génétiquement similaires à la plante mère. Brito et al. (2010) confirment qu'il n'y a pas eu de changement de ploïdie ou de mutations en utilisant la cytométrie en flux. Récemment, Mirzaei et al. (2021) via marqueurs AFLP et cytométrie ont confirmé la stabilité génétique des plants issus du microbouturage de variétés iraniennes par rapport à ceux générés par organogénèse.

Toutefois, Leva (2009) a trouvé que les plants du cultivar 'Maurino', en dépit de leur stabilité génétique (Leva et Petruccelli, 2012), après 6 ans sur champ produisent des feuilles plus larges que celles des plants conventionnels et montrent une floraison plus importante mais sans effet bénéfique sur la production. Des variations morphologiques chez les vitroplants des cultivars 'Dezful Baghmalek', 'dezful Safiabad' et 'Roughni' affectant la longueur des entre-nœuds ou le nombre et dimensions des feuilles apparaissent avec la durée de maintien en culture (Yari et al., 2011 ; Farahani et al., 2018). Farahani et al. (2011a et b) ont identifié des mutations génétiques en utilisant les marqueurs RAPD chez les plantules des cultivars 'Zard', 'Roghani', 'Eiks' ainsi que 'Dezful' régénérées à partir du 3^{ème} repiquage *in vitro*. Cependant, Noormohammadi et al. (2014) ont démontré via des marqueurs SSR et ISSR que les plants du cultivar 'Koroneiki' régénérés après une année ne sont pas entièrement conformes à la même source et montrent des différences dans la composition et fréquence alléliques.

Par ailleurs, Rugini (1988), Shibli et al. (2001), Maalej et al. (2002), Brhadda et al. (2003a et 2008), Cerezo et al. (2011), Toufik et al. (2017) et Pires et al. (2020) ont régénéré à partir d'ES, notamment induits sur des parties d'EZ, des plantules d'olivier présentant un phénotype normal et stable même après le transfert en plein champ. En effet, Lopes et al. (2009) en utilisant les marqueurs microsatellites indiquent un maintien de l'intégrité génétique durant tout le processus de l'embryogénèse sans observer aucune variation phénotypique chez le cultivar 'Canino' alors que Leva (2009) affirme que les plantules dérivant des ES de jeunes cals du cultivar 'Frangivento' se développent plus rapidement que celles issues des techniques classiques par contre les cultures embryogènes âgées du cultivar 'Picual' produisent des ES qui génèrent de petites plantules avec plusieurs anomalies qui se manifestent même *in vivo* notamment sur les feuilles et fleurs entravant ainsi leur productivité sur champ (Bradaï et al.,

2016a et b). De même, Rugini et De Pace (2016) indiquent que des cultures âgées de plus de 3 ans produisent des plantules avec des feuilles étroites et une croissance lente. Par ailleurs, Leva (2009) a caractérisé deux types de variants (nain et colonnaire) chez les plantes régénérées des ES des cotylédons du cultivar 'Frangivento' après trois ans de maintien *in vitro*. En addition, Peyvandi et al. (2010b) et récemment Bradaï et al. (2019) ont démontré l'utilité des marqueurs RAPD et SSR dans la détection de telles de variations chez les plantes dérivant des cultures âgées tandis que les plantules des lignées jeunes sont génétiquement complètement homogènes.

2.3. Biotechnologies appliquées dans l'amélioration génétique de l'olivier

L'amélioration génétique classique de l'olivier est compliquée par plusieurs facteurs notamment la période juvénile assez longue de l'espèce pouvant atteindre 15 ans, l'influence du génotype en plus des difficultés de réalisation de croisements liées aux caractères d'allogamie, auto-incompatibilité ainsi que la durée courte de floraison (Rugini et al., 1995 ; Rugini, 1995 ; Rugini et Baldoni, 2005 ; Rallo et al., 2018). De plus, l'amélioration classique est compliquée davantage par les problématiques liées à l'adaptation de l'espèce aux nouvelles conditions des zones de culture et les pratiques culturales dans le contexte du changement climatique ainsi que la tolérance aux maladies émergentes telles que la bactérie *Xylella fastidiosa* (Rugini et al., 2016 ; Cardoso et al., 2019 ; Rugini et al., 2020).

Ainsi, les techniques biotechnologiques d'amélioration génétique telles que l'utilisation d'une pression sélective induisant une variation somaclonale, la mutagenèse, la Transgénèse ou la culture des protoplastes et l'haplodiploïdisation peuvent constituer une alternative aux techniques classiques de création variétale chez l'olivier. Toutefois, l'application de ces méthodes nécessite le développement d'un procédé fiable et efficace de régénération de plantes *in vitro*. Dans le cas d'olivier, ceci n'est actuellement possible que via l'embryogenèse somatique (Rugini et Gutiérrez-Pesce, 2006).

2.3.1. Variation somaclonale

2.3.1.1. Définition, origine et causes de la variation somaclonale

La variation somaclonale (VS) est l'ensemble des altérations génétiques et / ou épigénétiques qui apparaissent souvent chez les plantes régénérées *in vitro* notamment par un protocole incluant une phase de callogenèse (Larkin et Scowcroft, 1981 ; Jain, 2001). Les

variations génétiques sont irréversibles et transmissibles à la descendance des plantules régénérées (Patiño Torres, 2010) alors que celles épigénétiques sont transitoires et réversibles lorsque leurs conditions inductives changent (Van Den Bulk, 1991 ; Bhojwani et Razdan, 1996 ; Lestari, 2006 ; Patiño Torres, 2010). La variation somaclonale *in vitro* peut être naturelle (spontanée) dont la fréquence d'apparition est extrêmement basse et à travers laquelle des variants avec ou sans variations avantageuses sont obtenus. Par ailleurs, quand la VS est induite dans le but de générer des variants avec des caractéristiques recherchées via l'usage d'un agent de sélection artificiel ; le processus est dénommé "sélection *in vitro*" (Patiño Torres, 2010).

L'apparition d'une variation somaclonale est associée à des mutations ponctuelles, des réarrangements et recombinaisons chromosomiques, l'altération du nombre de copies des séquences génétiques (Jain et *al.*, 1998 ; Jain, 2001) ou du nombre de chromosomes, une méthylation de l'ADN du génome nucléaire, mitochondrial ou chloroplastique (Van Den Bulk, 1991). Plusieurs facteurs peuvent affecter la fréquence d'apparition des variations somaclonales et sont souvent classés en trois catégories : les facteurs physiologiques tels que les régulateurs de croissance ayant un effet direct sur la division cellulaire et la prolifération sélective de types cellulaires spécifiques (Gould, 1984 ; Patiño Torres, 2010). Les facteurs génétiques (génotype, type et âge de l'explant et de la culture cellulaire) qui sont déterminés par la constitution génotypique et le niveau de ploïdie. Enfin, les facteurs biochimiques incluant les composants du milieu de culture (Veilleux et Johnson, 1998 ; Jayasankar, 2005) et sont généralement liés au mode de régénération utilisé (embryogenèse somatique, organogenèse, etc.), à la durée ou à l'âge de la culture, à la fréquence des repiquages et au type de culture (milieu solide ou liquide) (Bhojwani et Razdan, 1996).

2.3.1.2. Sélection *in vitro* par l'utilisation d'une pression sélective

Etant donné que les mutations spontanées et naturelles se produisent à une fréquence extrêmement faible ; les techniques d'induction de variations somaclonales, par pression sélective en présence d'un agent de sélection, constituent un outil puissant pour obtenir une augmentation rapide de la variabilité génétique chez les espèces cultivées (Van Den Bulk, 1991 ; Patiño Torres, 2010). En effet, l'agent de sélection peut être d'origine biotique (phytotoxine, virus, etc.) ou abiotique (métaux lourds, sels, herbicides, etc.) selon les traits ciblés par la sélection (Lestari, 2006 ; Patiño Torres, 2010).

Les phytotoxines ont été largement utilisées comme agents de sélection pour induire une résistance aux maladies chez de nombreuses espèces (Jayasankar, 2005). Toutefois, en absence de ces composants purs (toxines), le filtrat brut de la culture du pathogène fongique ou bactérien peut être utilisé (Baltoni et Rugini, 2002) tandis que dans certains cas, même l'agent pathogène de la maladie peut être utilisé en dépit du risque de contamination de la culture conduisant à des résultats peu fiables (Van Den Bulk, 1991). Par conséquent, le développement de plantes résistantes aux stress par variation somaclonale en présence d'un agent sélectif doit être précédé par l'identification d'un agent de sélection efficace et facile à produire et utiliser *in vitro*, en plus de l'élaboration d'un protocole garantissant la régénération de plantes entières à partir de cellules individuelles et, enfin, l'établissement d'une méthode de détermination et d'identification rapides des variants intéressants (Jayasankar, 2005).

La sélection *in vitro* par l'usage d'un agent sélectif peut être appliquée selon plusieurs approches. Elle peut être continue en présence permanente de l'agent sélectif ou discontinuée avec des repiquages additionnels sur un milieu sans agent sélectif (Van Den Bulk, 1991). De même, la sélection peut être réalisée en une seule étape où l'agent sélectif est utilisé à une concentration deux ou trois fois supérieure à la concentration minimale inhibitrice, ou en plusieurs étapes par habitude en commençant avec une concentration réduite à augmenter successivement avec la durée de sélection (Bhojwani et Razdan, 1996). En général, le tissu le plus utilisé pour la sélection est le cal vu l'absence de cuticule ce qui facilite l'absorption des molécules de l'agent de sélection (Patiño Torres, 2010).

2.3.1.3. Variation somaclonale et olivier

Chez l'olivier, plusieurs études décrivent des variations phénotypiques spontanées affectant la floraison ainsi que le nombre, la forme, la phyllotaxie et les dimensions des feuilles, les pousses et les entre-nœuds des plantules obtenues par microbouturage et micropropagation (Leva, 2009 ; Yari et *al.*, 2011 ; Farahani et *al.*, 2011a et b ; Leva et Petruccelli, 2012 ; Farahani et *al.*, 2018) ou par germination d'embryons zygotiques (Haddadi et Yakoub-Bougdal, 2010). De même, Leva (2009) a caractérisé deux types de variants (nain et colonnaire) chez les plantes régénérées à partir des ES des cotylédons du cultivar 'Frangivento' après trois ans de maintien *in vitro*.

Récemment, Bradaï et al. (2016a et b) et Rugini et De Pace (2016) ont trouvé que les cultures embryogènes âgées génèrent des plantules de petite taille avec plusieurs anomalies morphologiques principalement le nombre de feuilles insérées par nœud, la forme du limbe ainsi que des fleurs malformées et une floraison perturbée dont l'effet se répercute directement sur la productivité du plant. Par ailleurs, peu d'études décrivent l'induction de variation génétique par l'usage d'agents d'induction ou de sélection. En effet, Roselli et Donini (1982), Pannelli et al. (1990) et Oražem et al. (2013) indiquent que la régénération de plantules, suite à une irradiation des tissus adultes (racines), montrent d'importantes variations génétiques telles que le nanisme, alors que Ozair et al. (2014) ont ajouté le mutagène chimique antimétabolite 'Oryzalin' au milieu de culture des pousses du cultivar 'Moraiolo' pour induire un développement significatif notamment sur la surface foliaire.

2.3.2. Transgénèse

2.3.2.1. Définition et objectifs de la transformation génétique

La transformation génétique ou "transgénèse" désigne la modification héréditaire d'un génome par l'intégration et/ou l'expression d'une ou plusieurs copies d'ADN d'origine interne ou externe pour exprimer un nouveau caractère recherché par le biais d'un procédé biologique indirect (infection par bactéries ou virus) ou physique (artificiel) direct (bombardement par micro-projection et électro-poration) (Galun et Breiman, 1997 ; Halford, 2003 ; Liang et Skinner, 2004 ; Ganeshan et Chibbar, 2010). Indépendamment de la méthode de transfert d'ADN, le processus de la transformation génétique inclut les étapes suivantes : (1) Préparation du transgène, (2) Induction et préparation des cultures, (3) Transfert de l'ADN proprement dit suivi d'une période de co-culture, (4) Sélection des tissus transformés avec confirmation de la nature transgénique et enfin (5) Régénération de plantules et (6) Vérification de la nature transgénique des plantules régénérées.

2.3.2.2. Processus de la transformation génétique

- **par *Agrobacterium* sp.**

Les bactéries du genre *Agrobacterium* sont des *Rhizobiacées* Gram- dont les plus connues sont *A. tumefaciens* et *A. rhizogenes* responsables respectivement des maladies de la galle du collet (*crown gall*) et du chevelu racinaire (*hairy root*) (Halford, 2003). Ces bactéries sont capables de transférer une partie de leur information génétique "ADN-T" contenue dans

un plasmide Ti (*Tumor inducing*) ou Ri (*Root inducing*) suite à l'activation de la région de virulence (*vir region*), vers le génome nucléaire d'une plante hôte (Gelvin, 2003). Par conséquent, *A. tumefaciens* par l'intégration de son ADN-T provoque la dédifférenciation des cellules colonisées en les incitant à proliférer pour former des tumeurs synthétisant des métabolites "opines" nécessaires à son développement, alors que l'expression des gènes *Rol* (*Root Locus*) A, B, C et D d'*A. rhizogenes* est nécessaire pour l'induction du chevelu racinaire (Tzfira et Citovsky, 2008).

Par ailleurs, l'efficacité de la transformation par *Agrobacterium* dépend de plusieurs facteurs incluant le type d'explant, l'approche de sélection des cellules transgéniques mais beaucoup plus de la souche bactérienne (Palomo-Ríos et al., 2021). En effet, la majorité des souches d'*Agrobacterium* notamment *tumefaciens* utilisées en transformation génétique portent des plasmides dont l'ADN-T est remplacé par une construction génétique incluant le gène d'intérêt et le gène marqueur. Il est évident que les deux bordures droite et gauche de l'ADN-T sont gardées pour permettre le transfert de la construction génétique, préalablement insérée. Le transfert se fera alors sous le contrôle des gènes *vir* (Gartland, 1995) lors de la co-culture de la bactérie ainsi transformée avec les cellules végétales cibles. Par ailleurs, des plasmides nommés "vecteurs binaires" plus simples à manipuler avec possibilité de multiplication même par *Escherichia coli* sont développés avec intégration de gènes permettant la sélection ou le marquage des cellules et tissus transgéniques (Halford, 2003).

- **Par biolistique**

'Biolistique' est l'abréviation du 'Balistique biologique' ; un processus à travers lequel de fines particules métalliques (du tungstène ou de l'or) recouvertes d'ADN ou d'ARN sont accélérées généralement avec de l'hélium gazeux sous pression jusqu'à une vitesse leur permettant de pénétrer la paroi cellulaire et regagner le génome d'où l'appellation 'Bombardement par micro-projectiles' (Galun et Breiman, 1997 ; Liang et Skinner, 2004 ; Ganeshan et Chibbar, 2010).

- **Par électroporation**

L'électroporation est une méthode de transfert de plusieurs molécules (protéines, acides nucléiques, etc.) par des impulsions électriques courtes et de haute intensité qui provoquent la formation transitoire de blessures et pores dans la membrane plasmique permettant la diffusion des molécules. Parmi plusieurs types de cellules ; les protoplastes

constituent le meilleur récepteur pour le transfert d'ADN par électroporation (Liang et Skinner, 2004 ; Ganeshan et Chibbar, 2010).

2.3.2.3. Transformation génétique de l'olivier

Chez l'olivier, la transformation génétique est probablement la technique la plus prometteuse pour résoudre les problèmes de la culture et accélérer le développement de nouveaux cultivars (Rugini et Baldoni, 2005 ; Baldoni et Belaj, 2009 ; Palomo-Ríos et *al.*, 2021) répondant aux besoins de développement de cette espèce économiquement très avantageuse notamment dans les régions où l'eau manque. En effet, plusieurs études ont décrit le transfert de gènes par bombardement à l'aide de micro-projectiles enrobés d'ADN (Lambardi et *al.*, 1999b ; Pérez-Barranco et *al.*, 2007 et 2009) et via infection par *Agrobacterium* sp. (Strobel et *al.*, 1988 ; Rugini, 1992 ; Mencuccini et *al.*, 1991 et 1999a et b ; Rugini et *al.*, 2000 ; Miano et *al.*, 2004 ; Torreblanca et *al.*, 2009 et 2010 ; Jafarzadeh-Bajestani et *al.*, 2011 ; Farzaneh Behelgardy et *al.*, 2012 ; Palomo-Ríos et *al.*, 2017 ; Cerezo et *al.*, 2019 ; Narváez et *al.*, 2018 et 2020). La transgénèse indirecte par *Agrobacterium* reste cependant la plus utilisée et la plus efficace (Rugini et Gutiérrez-Pesce, 2006).

L'efficacité de la transformation par *Agrobacterium* dépend de plusieurs facteurs notamment la souche bactérienne et la durée de co-culture, la compétence des cellules à transformer, la sélection des cellules transformées mais aussi de la méthode de régénération (Rugini et *al.*, 2000 ; Rugini et Gutiérrez-Pesce, 2006 ; Rugini et *al.*, 2008 ; Rugini et *al.*, 2016 ; Cardoso et *al.*, 2019). Pour ce faire, les cals embryogènes ont été les plus fréquemment utilisés dans la transformation génétique d'olivier (Rugini et *al.*, 2008) parce que leur texture cellulaire friable facilite le transfert de gènes notamment par *Agrobacterium* (Lambardi et *al.*, 1999a et b) ce qui permet d'éviter le brunissement des tissus qui peut perturber l'efficacité du processus (Rugini et *al.*, 2000).

Les caractéristiques recherchées par la transformation génétique de l'olivier sont principalement l'amélioration de la capacité de l'enracinement lors du bouturage (Rugini, 1986 ; Strobel et *al.*, 1988 ; Mencuccini et *al.*, 1991 ; Rugini, 1992 ; Mencuccini et *al.*, 1999a et b ; Rugini et *al.*, 2000 ; Miano et *al.*, 2004 ; Pirannezhad et *al.*, 2010), la tolérance au froid et à la sécheresse (D'Angeli et *al.*, 2001 ; D'Angeli et Altamura, 2007), la tolérance à la salinité (Jafarzadeh-Bajestani et *al.*, 2011 ; Farzaneh Behelgardy et *al.*, 2012), la tolérance aux maladies fongiques (Narváez et *al.*, 2018 et 2020), le raccourcissement de la période juvénile

improductive (Cerezo et *al.*, 2010 ; Haberman et *al.*, 2017) ainsi que la qualité sensorielle de l'huile (Cerezo et *al.*, 2015) alors que d'autres travaux sont consacrés beaucoup plus à l'optimisation de la sélection des cellules transformées (Lambardi et *al.*, 1999b ; Pérez-Barranco et *al.*, 2007 et 2009 ; Torreblanca et *al.*, 2009 et 2010 ; Cerezo et *al.*, 2019).

La majorité des études de transformation génétique sur l'olivier indiquent la régénération de plantes entières sans anomalies phénotypiques et avec des caractéristiques plus ou moins améliorées. Cependant, concernant l'amélioration de l'enracinement uniquement Rugini et *al.* (2000) et Miano et *al.* (2004) ont pu régénérer des plantules entières du cultivar 'Canino' transformées avec les gènes *RolABC* avec une capacité d'enracinement améliorée mais dont l'aspect morphologique est modifié (plusieurs ramifications et entrenœuds en plus d'un forte teneur en chlorophylle et réduction significative de la surface foliaire) (Rugini et *al.*, 2008).

En Algérie, l'application de la transformation génétique pour l'amélioration génétique de l'olivier est très peu étudiée. En effet, Allag (2008) indique une amélioration significative de la capacité d'enracinement des boutures herbacées de trois cultivars Algériens (Chemlal, Ferkani et Boukaila) après inoculation basale par une souche d'*Agrobacterium rhizogenes* tandis que les feuilles et les boutures uninodales en dépit de l'émission de racines ne développent pas des plants pouvant être acclimatés.

Partie II. Matériels et Méthodes

Partie II. Matériels et Méthodes

1. Rappel des objectifs du travail

L'objectif global du travail est d'élaborer une approche biotechnologique pour l'obtention de plants d'olivier (*Olea europaea* L.) tolérants aux pathogènes fongiques avec une capacité d'enracinement améliorée chez le principal cultivar en Algérie 'Chemlal'. Pour atteindre cet objectif, nous visons d'optimiser un protocole efficace de régénération *in vitro* de plantes entières par embryogenèse somatique induite à partir de radicules d'embryons zygotiques extraits de la semence de l'olivier. Par la suite, nous évaluerons l'effet de la présence du filtrat brut de la culture du *Verticillium dahliae* Kleb., agent causal de la verticilliose d'olivier, dans le milieu de prolifération en vue d'induire une variation somaclonale suivie d'une régénération de plants potentiellement résistants au *Verticillium*. Nous envisageons par la suite d'améliorer l'enracinement *in vitro* des microboutures issues des jeunes plantules issues de la germination des embryons somatiques d'olivier par transfection à l'aide de la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes*.

2. Matériel végétal et désinfection

La semence extraite des noyaux d'olivier (*Olea europaea* L., Cv. Chemlal) récoltés en pleine maturité est utilisée. Après élimination de l'endocarpe (partie ligneuse du noyau) à l'aide d'un coupe-tube (Planche 1 a-b et c), la semence (amande) extraite (Planche 1 d et e) est désinfectée comme suit : une stérilisation avec l'éthanol 70 % durant 1 mn puis l'hypochlorite de sodium (NaClO ou eau de javel commercial de 12°) à une concentration de 10 % (v/v) durant 10 à 15 mn. La semence désinfectée est rincée trois fois x 5 mn à l'eau distillée stérile puis gardée en immersion dans l'eau sous obscurité pendant 48 h à 25±2°C. Par la suite, la semence est stérilisée de nouveau de la même manière que précédemment et gardée sous conditions stériles (Planche 1 f), pour extraire avec précaution la radicule de l'embryon zygotique utilisée comme explant. Pour ce faire, la semence est tenue avec une pince et une incision est effectuée sur le côté gonflé de l'amande à l'aide d'un scalpel tranchant (Planche 1 g). Par la suite, l'incision est ouverte par la pince avec précaution pour diviser le tégument en deux parties (Planche 1 h). Ensuite, l'embryon zygotique est soulevé par le scalpel puis récupéré (Planche 1 i et j). A partir de ces embryons zygotiques, les radicules sont excisées des deux cotylédons (Planche 1 k et l) et mises en culture directement sur le milieu d'induction de callogenèse.

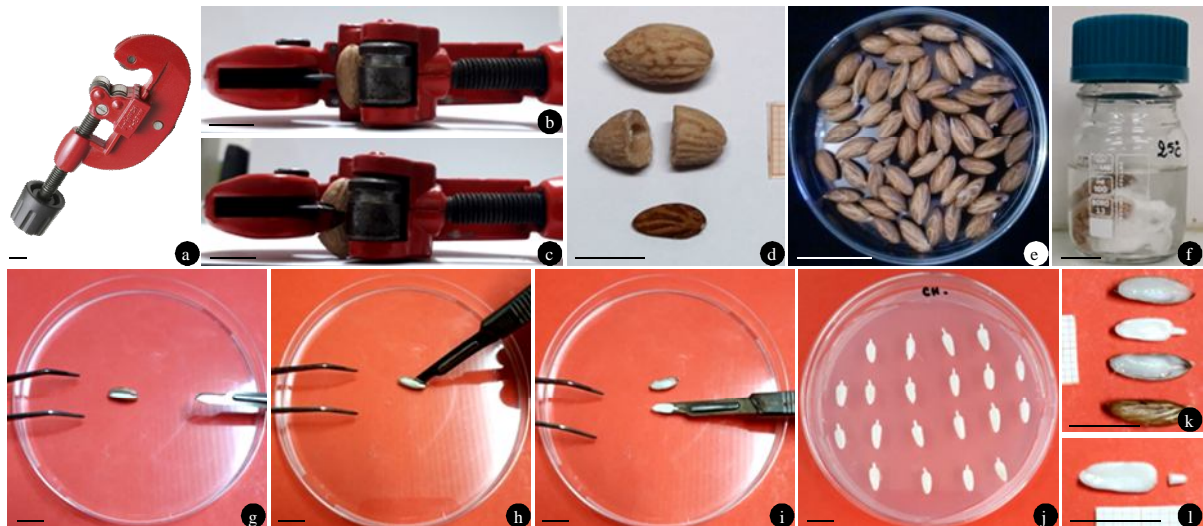


Planche 1 : Etapes de récupération et de désinfection de la semence d'olivier à partir des noyaux (a, b, c, d, e et f) du cultivar 'Chemlal' et procédé d'extraction des embryons zygotiques (g, h, i et j) puis isolement de la radicule (k et l) utilisée comme explant pour l'induction de cals embryogènes. (Barre correspond à 1 cm).

3. Embryogenèse somatique

Le protocole établi se réfère en partie à celui de Cerezo et *al.* (2011). La composition chimique des milieux de culture utilisés dans le travail est indiquée dans le tableau 1. Le pH de tous les milieux de culture est ajusté à 5.74 avec du NaOH ou HCl (1 N) avant l'addition de l'agent de gélification. Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage à 121°C et 0.1 MPa pendant 20 mn puis distribués après refroidissement dans des boîtes de Petri de 9 cm de diamètre, tandis que pour les tubes à essai, le milieu de culture est stérilisé après distribution. Toutes les étapes du processus sont réalisées sous obscurité à 25±2°C sauf la germination qui est réalisée sous photopériode de 16 h de lumière (35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Les étapes du protocole sont :

3.1. Induction de cals embryogènes

La callogenèse est induite selon la méthode d'Orinos et Mitrakos (1991) par culture de radicules d'embryons zygotiques du cultivar 'Chemlal' (Planche 2 a) sur le milieu OM (Rugini, 1984) modifié (OMc) par Cañas et Benbadis (1988) ou sur le milieu MS de Murashige et Skoog (1962) en présence de 0.5 mg l⁻¹ de Zéatine combinée avec 5 mg l⁻¹ d'acide indole-3-acétique (AIA), d'acide indole-3-butyrique (AIB), d'acide naphtylacétique (ANA) ou d'acide 2,4-dichloro-phénoxy-acétique (2,4-D).

Après 3 semaines de culture sous obscurité totale (Planche 2 b), tous les explants sont transférés pendant 4 semaines (Planche 2 c) sur les mêmes milieux (OMc et MS) dépourvus de Zéatine et avec 0.5 mg l^{-1} de l'auxine initialement additionné. Les cals ainsi obtenus sont maintenus en culture, par repiquage mensuel (Planche 2 d) jusqu'au développement des structures embryogènes, sur le milieu d'embryogenèse (ECO) solide (Pérez-Barranco *et al.*, 2007 ; Cerezo *et al.*, 2011) additionné de 0.1 mg l^{-1} de Zéatine, 0.1 mg l^{-1} de 6-Benzyl-Amino-Purine (BAP) et 0.05 mg l^{-1} d'auxine additionnée lors de la phase d'induction en plus de 0.55 g l^{-1} de glutamine et 1 g l^{-1} d'hydrolysate de caséine.

Au moins six racines sont mises en culture par boîte de Petri et au moins cinq boîtes par traitement sont incubées sous obscurité totale à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. L'évolution des cultures est ensuite suivie par des observations périodiques.

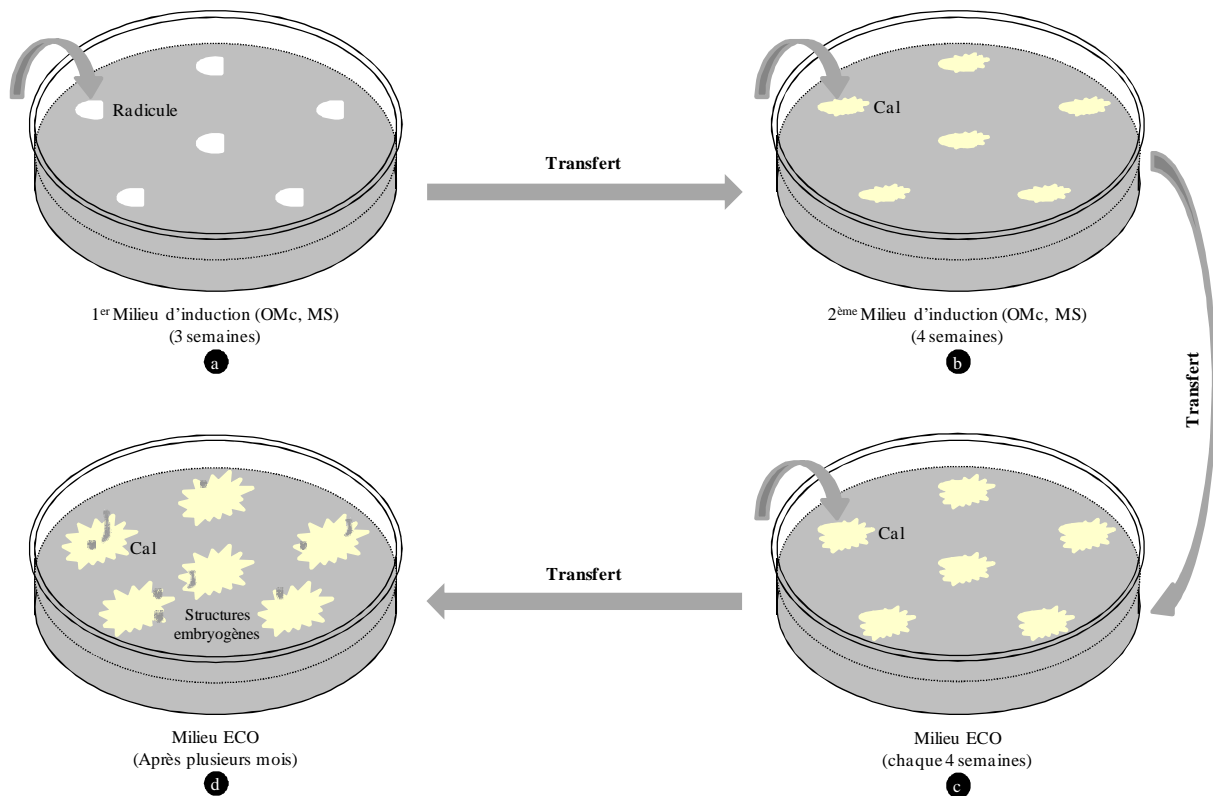


Planche 2 : Etapes de l'induction de cals embryogènes à partir de racines d'embryons zygotiques de l'olivier, Cv. Chemlal. **a.** Introduction des racines sur le premier milieu d'induction. **b.** Transfert des explants sur le deuxième milieu d'induction. **c.** Transfert des explants sur le milieu ECO. **d.** Maintien des cals sur le milieu ECO pendant plusieurs mois.

Tableau 1 : Composition chimique des différents milieux de culture utilisés.

Composants	Eléments chimiques	Milieux de culture				
		OM*	OMc*	MS*	ECO*	DKW*
Macroéléments (mg/l)	NH ₄ NO ₃	412	720	1650	103	1402.5
	KNO ₃	1100	950	1900	275	-
	CaCl ₂	440	166	440	110	145.2
	MgSO ₄ . 7 H ₂ O	1500	185	370	375	740
	KH ₂ PO ₄	340	68	170	85	250
	Ca (NO ₃). 4H ₂ O	600	-	-	150	-
	KCl	500	-	-	125	-
	K ₂ SO ₄	-	-	-	-	760
NaFe EDTA (mg/l)	Na ₂ EDTA (Tritiplex)	37.5	37.5	37.5	37.5	37.5
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
Source de carbone (g/l)**	Saccharose	20	20	20	+/- 20	20
Microéléments (mg/l)	MnSO ₄ . H ₂ O	22.3	22.3	22.3	22.3	33
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	14.3	14.3	8.6	8.6	-
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.25	0.25	0.025	0.025	0.25
	KI	0.83	0.83	0.83	0.83	-
	CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	-
	H ₃ BO ₃	12.4	12.4	6.2	6.2	2.4
	Na ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.38
	Zn (NO ₃). 6H ₂ O	-	8.6	-	-	8.6
Vitamines (mg/l)	Thiamine	0.5	0.5	0.1	0.5	2
	Pyridoxine	0.5	0.5	0.5	0.5	-
	Acide nicotinique	5	5	0.5	5	1
	Glycine	2	2	2	2	2
	Biotine	0.05	0.05	-	0.05	-
	Acide folique	0.5	0.5	-	0.5	-
Sucre alcool (mg/l)	Myo-Inositol	50/100	100	50/100	50/100	1000
Régulateurs de croissance (mg/l)**	Auxines	Plusieurs	+/-	+/-	+/-	+/-
	Cytokinines	Plusieurs	+/-	+/-	+/-	+/-
Acides aminés (g/l)	Glutamine	-	-	-	0.55	-
Autres additifs (g/l)	Hydrolysate de caséine	-	-	-	1	-
	Charbon Actif (CA)**	-	-	-	+/-	-
Agents de gélification (g/l)	Agar	6	6	6	6	6

* : **OM** : Olive Medium (Rugini, 1984) ; **OMc** : Olive Medium modified for callus induction and culture (Cañas et Benbadis, 1988); **MS** : Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962); **ECO** : medio de Embriogénesis Cíclica de Olivo ou milieu d'embryogénèse somatique cyclique d'olivier (Cerezo et al., 2011) ; **DKW** : Driver and Kuniyuki Walnut medium (Driver et Kuniyuki, 1984) modifié par Revilla et al. (1996)). Le pH de tous les milieux utilisés est de 5.74.

** : Le saccharose, le charbon actif et les régulateurs de croissance sont additionnés à différentes concentrations et combinaisons en fonction de l'étape du protocole.

3.2. Évaluation de la capacité embryogène de quelques lignées de cals

Après environ six mois de culture, plusieurs cals d'apparence embryogène (prolifération continue, aspect globulaire, structure friable, couleur blanc opaque) ont été obtenus. Le potentiel ou la capacité embryogène d'un cal est estimé principalement par sa capacité de prolifération (accroissement du poids frais), production d'embryons somatiques et degré de nécrose sur le milieu de culture (solide ou liquide), la maturation ainsi que la germination de ses embryons somatiques matures.

3.2.1. Estimation de la capacité de prolifération

La capacité de prolifération de trois lignées de cal, est mesurée par culture d'un inoculum d'au moins 0.1 g de cal dans 25 ml de milieu de culture liquide ou solide. Au minimum, trois boîtes de Pétri de 9 cm ou trois Erlenmeyers ou ballons de 100 ml contenant les cals sont incubés sous obscurité totale à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$. Les cultures liquides sont maintenues sous 100 tr/mn d'agitation.

Après quatre (04) semaines de culture sur milieu solide ou liquide, la totalité du cal est récupérée puis pesée et l'accroissement du poids frais en plus des traits morphologiques tels que la texture, la taille des structures embryogènes et le taux de friabilité en plus du taux de nécrose sont observés, et un nouvel inoculum est repris pour le repiquage suivant.

A la sortie du milieu liquide, le nombre d'embryons somatiques produits par la masse cellulaire initialement inoculée est chaque fois comptabilisé. De même, l'apparition des embryons somatiques de différents stades de développement sur les cals cultivés sur milieux solides est rapportée.

Le suivi est réalisé pendant au minimum trois repiquages successifs. Afin d'optimiser les conditions de la prolifération cellulaire dont les facteurs étudiés sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Facteurs étudiés pour l'évaluation de la capacité de prolifération et de production d'embryons somatiques de trois lignées de cals d'olivier (Cv. Chemlal).

Facteurs étudiés	Milieu solide	Milieu liquide	Nombre de traitements
Type de milieu	ECO – OM – MS		3
Balance hormonale	BH0 : Témoin (sans hormones) BH1 : AIB+Zéatine+BAP BH2 : AIB+Thidiazuron+BAP BH3 : ANA+Zéatine+BAP BH4 : ANA+Thidiazuron+BAP		5
Concentration du saccharose	Témoin (sans sucre), 5, 10, 20, 30 ou 40 g l ⁻¹ de saccharose		6
Addition du charbon actif (CA)	Témoin (sans CA), 0.5 ou 1 g l ⁻¹ de CA		3
Durée d'incubation (semaines)	2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 ou 16 semaines	1, 2, 3, 4, 5 ou 6 semaines	8 pour solide 6 pour liquide

3.2.1.1. Effet du type de milieu de prolifération

Trois (03) types de milieux sont testés (ECO-OM-MS) sous deux formes différentes : liquide ou solide avec 6 g l⁻¹ d'agar. Les trois milieux testés sont additionnés de 20 g l⁻¹ de saccharose, 50 mg l⁻¹ de Myo-Inositol et une balance hormonale composée de 0.1 mg l⁻¹ de Zéatine, 0.1 mg l⁻¹ de BAP et 0.05 mg l⁻¹ d'AIB en plus de 0.55 g l⁻¹ de glutamine et 1 g l⁻¹ d'hydrolysate de caséine. Les cultures dans les boîtes ou Erlenmeyers ou ballons sont incubées sous obscurité totale.

3.2.1.2. Effet de la balance hormonale

En plus du témoin (sans hormones), quatre balances hormonales sont considérées : auxines (AIB ou ANA) et cytokinines (Zéatine ou Thidiazuron) sont additionnées au milieu de culture de base ECO (liquide ou solide) contenant 20 g l⁻¹ de saccharose, 50 mg l⁻¹ de Myo-Inositol en plus de 0.55 g l⁻¹ de glutamine et 1 g l⁻¹ d'hydrolysate de caséine. Les cultures sont incubées sous obscurité totale.

3.2.1.3. Effet de la concentration du saccharose

Le saccharose est additionné à tous les milieux de culture de base ECO (liquide et solide) à une concentration de 0, 5, 10, 20, 30 ou 40 g l⁻¹. Les cultures sont incubées sous obscurité totale.

3.2.1.4. Effet de l'addition du charbon actif (CA)

En plus du témoin (sans CA), le charbon actif est additionné à une concentration de 0.5 ou 1 g l⁻¹ au milieu de culture de base ECO (liquide ou solide) après ajustement du pH. Les cultures sont incubées sous obscurité totale.

3.2.1.5. Effet de la durée d'incubation des cultures

Les cals sont cultivés sur le milieu de culture de base ECO (liquide ou solide). L'incubation des cultures sous obscurité totale dure une à six semaines sur milieu liquide et de 2 à 16 semaines sur milieu solide.

3.2.2. Production d'embryons somatiques

Vu que la capacité de prolifération et de production d'embryons somatiques diffèrent fortement d'une lignée de cal à une autre ; il est indispensable d'homogénéiser les conditions de culture pour la production d'embryons somatiques destinés aux étapes suivantes de l'étude. De ce fait, la production d'ES est réalisée en cultivant 1 g de masse cellulaire des trois lignées évaluées dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu de culture de base ECO liquide. Les cultures sont incubées entre 3 et 4 semaines sous obscurité totale et 100 tr/mn d'agitation. A la sortie du milieu liquide, le cal est récupéré par filtration et l'ensemble des embryons somatiques produits, qui sont aux stades globulaire, cordiforme ou torpide sont récupérés et utilisés pour la suite du travail (maturation) tandis que les ES du stade cotylédonaire sont directement mis en germination.

3.2.3. Différenciation et maturation des embryons somatiques

Les embryons somatiques précédemment produits sont transférés sur un milieu solide de maturation sans régulateurs de croissance. Le milieu de culture de base ECO est additionné de 20 g l⁻¹ de saccharose, 50 mg l⁻¹ de Myo-Inositol, 1 g l⁻¹ de charbon actif en plus de 0.55 g l⁻¹ de glutamine et 1 g l⁻¹ d'hydrolysate de caséine et solidifiés avec 6 g l⁻¹ d'agar. Au minimum, trois boîtes de Petri, contenant au moins neuf pro-embryons ou embryons immatures chacune, sont incubées pendant deux mois sous obscurité totale à 25±2°C. Après huit semaines de culture sur le milieu de maturation, la nécrose, la prolifération cellulaire (formation de cal), la différenciation (formation d'embryons au stade cotylédonaire) ainsi que le nombre d'embryons somatiques matures prêts à la mise en germination sont enregistrés.

3.2.4. Germination des embryons somatiques et régénération de plantules

Les embryons somatiques matures présentant une structure cotylédonaire ou bi-polaire des deux lignées retenues (C2 et C3) sont mis en germination sur deux milieux différents : (OM et MS) solidifiés avec 6 g l⁻¹ d'agar ou liquide sur lequel les embryons sont placés sur du papier filtre en forme de "M" préalablement stérilisé par autoclavage (Planche 3 a). Ainsi, l'effet de l'addition de 1 mg l⁻¹ de BAP et 0.1 mg l⁻¹ d'AIB est testé sur les deux milieux additionnés de 20 g l⁻¹ de saccharose et 100 mg l⁻¹ de Myo-Inositol.

Au moins, 16 embryons somatiques matures sont placés en germination individuellement dans des tubes à essai pendant au moins huit semaines sous photopériode de 16 h de lumière (35 μmol m⁻² s⁻¹) à une température de 25±2°C. Les observations ont porté sur le pourcentage de germination, l'émergence de la racine, la taille de la pousse ainsi que le nombre de feuilles par vitroplant obtenu après huit semaines de culture (Planche 3 b et c).

3.3. Micropropagation des pousses issues des embryons somatiques

Afin de maintenir le maximum de plants *in vitro* ; une micropropagation des pousses issues de la germination des embryons somatiques est appliquée. Pour ce faire, les embryons somatiques des deux lignées retenues (C2 et C3) sont mis en germination sur le milieu OM solidifiés avec 6 g l⁻¹ d'agar additionné de 20 g l⁻¹ de saccharose, 100 mg l⁻¹ de Myo-Inositol ainsi qu'une balance hormonale de 1 mg l⁻¹ de BAP et 0.1 mg l⁻¹ d'AIB.

Après plus de huit semaines de culture, les pousses obtenues (Planche 3 c) sont divisées en microboutures uninodales et mises en culture sur deux milieux de culture solides différents (Planche 3 d) contenant plusieurs balances hormonales à base de cytokinines (BAP/Zéatine) combinées avec une auxine (AIB). Pour ce faire, deux types de milieux sont testés (OM et DKW). Les deux milieux de culture sont additionnés de 20 g l⁻¹ de saccharose, 100 mg l⁻¹ de Myo-Inositol en plus de balances hormonales composées de 2 mg l⁻¹ de BAP ou Zéatine combinés avec 0.1 mg l⁻¹ d'AIB puis solidifiés avec 6 g l⁻¹ d'agar.

Au moins, 16 microboutures portant deux feuilles sont mises séparément en culture dans des tubes à essai contenant 15 ml du milieu de micropropagation pendant six semaines sous photopériode de 16 h de lumière (35 μmol m⁻² s⁻¹) à une température de 25±2°C. Les observations ont porté sur la réactivité ou le débourrement, le nombre de bourgeons débourrés

par micro-bouture, la taille de la pousse, le nombre de feuilles ainsi que le nombre de racines émises (Planche 3 e).

3.4. Acclimatation des plantules régénérées

Les vitroplants ayant atteint une taille acceptable (plus de 2 cm) avec plusieurs feuilles (plus de 4 feuilles) et présentant des racines bien développées sont acclimatés au niveau du laboratoire pendant environ deux mois. Les vitroplants sont retirés du milieu de culture, débarrassés de la gélose puis leurs racines sont bien rincées avec de l'eau distillée stérile afin d'éviter toute prolifération de pathogènes. Par la suite, les vitroplants sont plantés dans des pots avec un mélange de sable/terreau/perlite à raison de 2/2/1 (v/v/v) humidifié (Planche 3 f). Les pots sont percés à leur base pour assurer un bon drainage et gardés dans un conteneur transparent couvert par du cellophane. Un niveau élevé d'humidité à l'intérieur du conteneur est maintenue par une lame d'eau d'environ 1 cm (Planche 3 f). L'ensemble est gardé sous photopériode de 16 h de lumière ($35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

Après 10 jours d'incubation, on procède à la diminution graduelle de l'humidité relative à l'intérieur du dispositif par la création de petites perforations sur le cellophane après chaque semaine afin que les vitroplants s'acclimatent progressivement aux conditions moins humides (Planche 3 f). L'humidité du substrat est maintenue stable avant et après l'élimination complète du cellophane. Après environ deux mois, les plantules montrant une bonne reprise et une croissance indiquant une réactivation de leurs racines sont transférées en conditions naturelles sous serre sur un mélange de terre riche en matière organique et du terreau à raison de 2/1 (v/v). Les plants sont irrigués périodiquement jusqu'à leur transfert en plein champ (Planche 3 g).

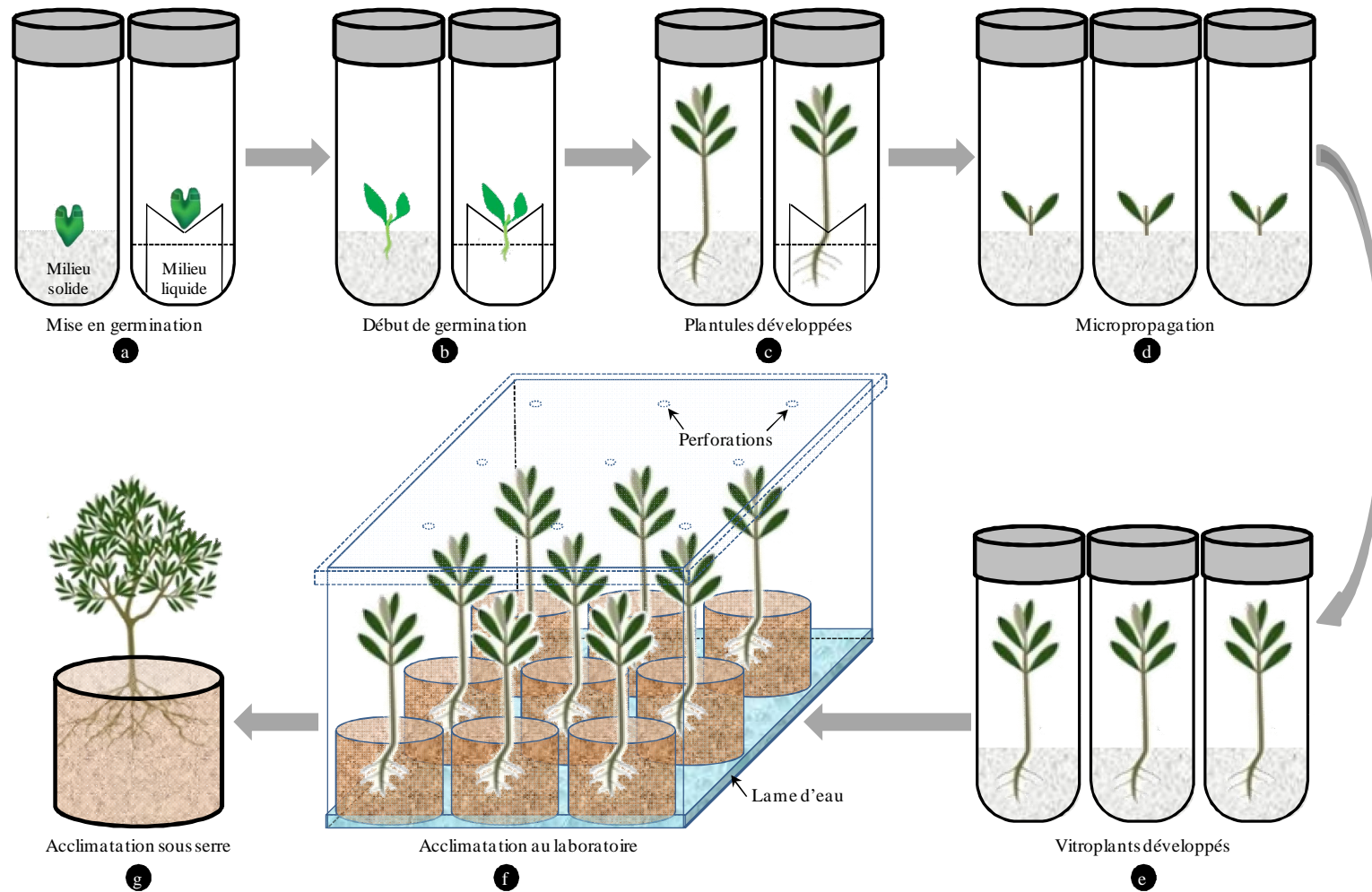


Planche 3 : Protocole de germination des embryons somatiques (ES) matures, micropropagation et acclimatation des plantules régénérées. **a.** Mise en germination des ES sur milieu solide et liquide. **b.** Germination des ES. **c.** Plantules régénérées après huit semaines de germination des ES. **d.** Micropropagation des plantules obtenues sur milieu solide. **e.** Plantules obtenues après micropropagation sur milieu solide. **f.** Acclimatation des vitroplants au laboratoire. **g.** Acclimatation des plantules sous serre.

4. Variation somaclonale : Induction par pression sélective

L'induction de la variation somaclonale sur les cals de trois lignées embryogènes est réalisée selon les protocoles établis par Jayasankar et Litz (1998) et Jayasankar et al. (2000) en utilisant comme agent de sélection (pression sélective) le filtrat brut du milieu de culture de *Verticillium dahliae* Kleb. (Agent causal de la verticilliose de l'olivier). L'essai est réalisé par sélection continue sur un milieu solide ou discontinue sur un milieu liquide contenant différentes concentrations du filtrat fongique.

4.1. Souches de *Verticillium* utilisées

Les deux souches de *Verticillium dahliae* Kleb. utilisées pour produire le filtrat brut de la culture, ont été gracieusement mise à notre disposition par Dr. Tihar-Benzina Farida du Laboratoire de **Valorisation et Conservation des Ressources Biologiques (VALCORE)** de l'Université de Boumerdès. La souche S1 caractérisée par son action défoliante et la souche S2 est non-défoliante (Planche 4 a et b). Les deux souches sont isolées à partir d'oliviers atteints de la verticilliose dans la région de M'chedallah, wilaya de Bouira.

4.2. Production du filtrat brut de la culture de *Verticillium*

La production du filtrat est réalisée comme suit : 5 à 6 morceaux (0.5 x 1 cm) du milieu PDA (Potato Dextrose Agar) solidifié avec 15 g l⁻¹ d'agar (Tableau 3), sur lequel le mycélium des deux souches de *Verticillium* est cultivé, sont introduits dans des Erlenmeyers de 250 ml (Planche 4 c) contenant 100 ml du milieu Czapek (Czapek, 1901) (Tableau 3). Les flacons sont incubés sous agitation de 125 tr/mn à 25±2°C en obscurité totale pendant au moins 7 jours (Planche 4 d). Par la suite, le filtrat "sans cellules fongiques" est réalisé en filtrant le milieu de culture précédent contenant le mycélium développé à travers une passoire métallique couverte avec trois couches de bonde-à-gaz stérile (Planche 4 e) avant d'être centrifugé deux fois consécutives pendant 2 minutes à 3000×g sur un rotor libre (Planche 4 f). Le surnageant résultant après centrifugation est filtré sous vide sur du papier Whatman N°1 préalablement stérilisé (Planche 4 g). L'absence de cellules fongiques est confirmée par la culture de 0,5 ml du filtrat sur un milieu PDA à 25±2°C pendant au moins 7 jours pendant lesquels aucun développement fongique n'est observé. Le filtrat stérilisé par microfiltration sur des filtres millipores de type sartorius (diamètre 0.22 µm) est ensuite stocké à -4°C (Planche 4 h). Le pH du filtrat est ajusté à 5.74 avant d'être ajouté au milieu de sélection (Planche 4 i).

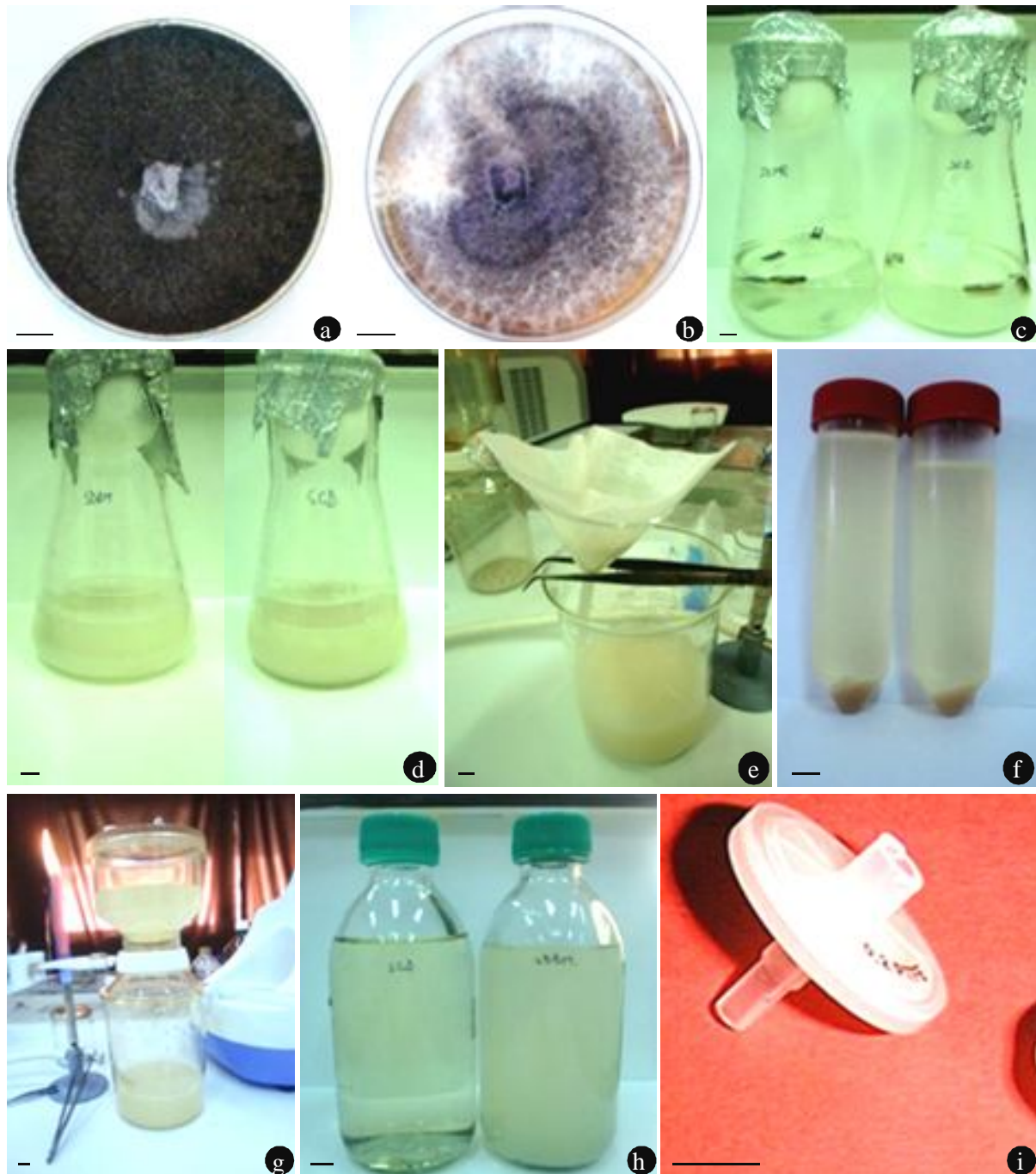


Planche 4 : Production du filtrat brut de la culture de *Verticillium dahliae* Kleb. utilisé pour la sélection *in vitro* des cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal. **a.** et **b.** Souches de *Verticillium* utilisées. **c.** Introduction du mycélium en milieu Czapek liquide. **d.** Aspect des cultures mycéliennes après une semaine. **e.** Filtration du milieu de culture du champignon. **f.** Centrifugation du filtrat et récupération du surnageant. **g.** Filtration sous vide. **h.** Filtrats bruts. **i.** Filtre millipore pour la stérilisation. (Barre correspond à 1 cm).

Tableau 3 : Composition chimique des milieux utilisés pour la culture de *Verticillium dahliae* Kleb.

Composants des milieux		Milieux de culture	
		PDA	Czapek _m
Eléments chimiques (g l ⁻¹)	NaNO ₃	-	2
	K ₂ HPO ₄	-	1
	KCl	-	0.5
	MgSO ₄ . 7 H ₂ O	-	0.5
	FeSO ₄ . 7H ₂ O	-	0.01
	MnSO ₄ . H ₂ O	-	0.01
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	-	0.01
	Additifs (g l ⁻¹)	Saccharose	-
Dextrose		20	-
Bouillon de pomme de terre		4	-
Agar (g l ⁻¹)		15	-
pH		5.6	6.1

4.3. Sélection en présence du filtrat brut de la culture de *Verticillium*

La sélection est effectuée sur les cals embryogènes de trois lignées cellulaires (C1, C2 et C3) en milieu liquide ou solide contenant différentes concentrations de filtrat brut de deux souches de *Verticillium dahliae* Kleb. agent causal de la verticilliose de l'olivier.

4.3.1. Sélection en milieu liquide (sélection discontinue)

La sélection discontinue en milieu liquide consiste à soumettre des cultures embryogènes à la pression sélective par un agent sélectif durant une certaine durée (trois semaines) ensuite permettre aux cellules de proliférer de nouveau sur un milieu dépourvu de l'agent de sélection. Après la reprise des cellules, celles-ci seront soumises de nouveau à une pression sélective plus élevée. Le cycle de pression discontinue est répétée jusqu'à l'adaptation des cellules aux conditions du stress sélectif.

Pour ce faire, une masse embryogène de 0.2 g du cal de trois lignées (C1, C2 et C3) est cultivée dans un Erlenmeyer de 100 ml avec 25 ml du milieu de base ECO contenant 0, 20, 40 ou 60 % du filtrat brut de la culture de deux souches du champignon.

Trois Erlenmeyers par traitements sont incubés sous obscurité à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ et une agitation de 100 tr/mn durant trois semaines. Le filtrat est additionné au milieu de culture après stérilisation à travers un filtre millipore, et ce, lorsque la température du milieu stérilisé par autoclavage descend à moins de 40°C .

Après trois semaines de culture sous agitation, les cals sont récupérés sur une grille métallique de 0.5 mm et l'accroissement du poids frais est évalué. Par la suite, les cals sont étalés sur un milieu ECO solide de base sans filtrat pour estimer le degré de brunissement des amas cellulaires (Planche 5) et permettre la prolifération des cellules embryogènes pendant au moins trois mois avec un renouvellement mensuel du milieu de culture. L'évaluation de l'accroissement du poids frais des cals est réalisée à chaque repiquage.

4.3.2. Sélection sur milieu solide (sélection continue)

La sélection continue sur milieu solide consiste à maintenir des cultures embryogènes en présence de l'agent sélectif pendant une durée maximale (quinze semaines) pour permettre aux cellules de s'habituer à la présence de l'agent de sélection dans le milieu de prolifération. De même que pour la sélection en milieu liquide, après plusieurs cycles de culture sur une concentration donnée de l'agent sélectif ; les masses cellulaires sont transférées sur un milieu contenant une concentration plus élevée afin de maintenir la pression sélective sur les cellules jusqu'à l'adaptation des celles-ci à la présence du filtrat fongique.

En effet, une masse de cal embryogène de 0.2 g des trois lignées est cultivée dans des boîtes de Petri de 5.5 cm contenant 15 ml du milieu de base ECO solidifié avec 6 g l^{-1} d'agar additionné de 0, 20, 40 ou 60 % du filtrat brut de la culture des deux souches du champignon. Par traitement, trois boîtes de Petri contenant les explants des trois lignées de cals exposés aux différentes concentrations du filtrat fongique sont incubées sous obscurité à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ durant trois semaines. L'addition du filtrat au milieu de culture est réalisée à travers un filtre millipore lorsque la température du milieu descend à moins de 40°C .

Après trois semaines d'incubation, l'accroissement du poids frais ainsi que le degré de brunissement sont évalués avant que le cal ne soit transféré de nouveau sur un milieu frais contenant la même concentration de départ de filtrat. Le renouvellement du milieu de culture est réalisé toutes les trois semaines pendant environ trois mois avec l'évaluation de l'accroissement du poids frais des cals avant chaque transfert.

4.4. Estimation du degré de brunissement des amas cellulaires

Le degré de brunissement du cal est évalué à l'aide du logiciel ImageJ[®] 1.47v par la différence de la densité de couleur par rapport à l'état initial du cal. Toutes les images sont prises sur un fond rouge. Au début, l'image initiale du cal prise juste après son étalement sur le milieu de sélection (Planche 5 a) est traitée par le logiciel ADOBE[®] PHOTOSHOP[®] CS5 EXTENDED Version 12.0 x64 pour éliminer le fond (en rouge) et garder uniquement les masses cellulaires étalées (Planche 5 b). Par la suite, à l'aide du logiciel ImageJ[®] l'image résultante est convertie vers le type "8-bit" (Planche 5 c) afin de déterminer les seuils limites des couleurs binaires (nuance de gris) (Planche 5 d).

Après trois semaines de culture, l'image correspondante montrant l'aspect du cal est traitée de la même manière précédente (Planche 5 e-f et g) mais sans prendre en considération les seuils limites afin de déterminer la surface entière du cal lors de la transformation de l'image en mode binaire en noir et blanc (Planche 5 h). Enfin, l'introduction des seuils limites dans les caractéristiques de l'image permettront de délimiter les parties en prolifération de celles présentant un brunissement (Planche 5 i) et déterminer, ainsi, leurs surfaces respectives (Planche 5 j).

4.5. Régénération de plantules après sélection en présence du filtrat fongique

Après quatre mois de sélection sur le milieu solide avec ou sans filtrat, les embryons somatiques globulaires ou pro-embryons sont récupérés à partir de quelques traitements (notamment de 20 et 40% de filtrat) ayant montré une certaine prolifération cellulaire, et mis en germination sur un milieu OM solidifiés avec 6 g l⁻¹ d'agar et additionné de 20 g l⁻¹ de saccharose, 100 mg l⁻¹ de Myo-Inositol ainsi qu'une balance hormonale composée de 1 mg l⁻¹ de BAP et 0.1 mg l⁻¹ d'AIB. Après plus de six semaines de culture, la multiplication des plantules issues des embryons somatiques est réalisée sur un milieu OM solidifiés avec 6 g l⁻¹ d'agar et additionné de 20 g l⁻¹ de saccharose, 100 mg l⁻¹ de Myo-Inositol ainsi qu'une balance hormonale composée de 2 mg l⁻¹ de Zéatine et 0.1 mg l⁻¹ d'AIB.

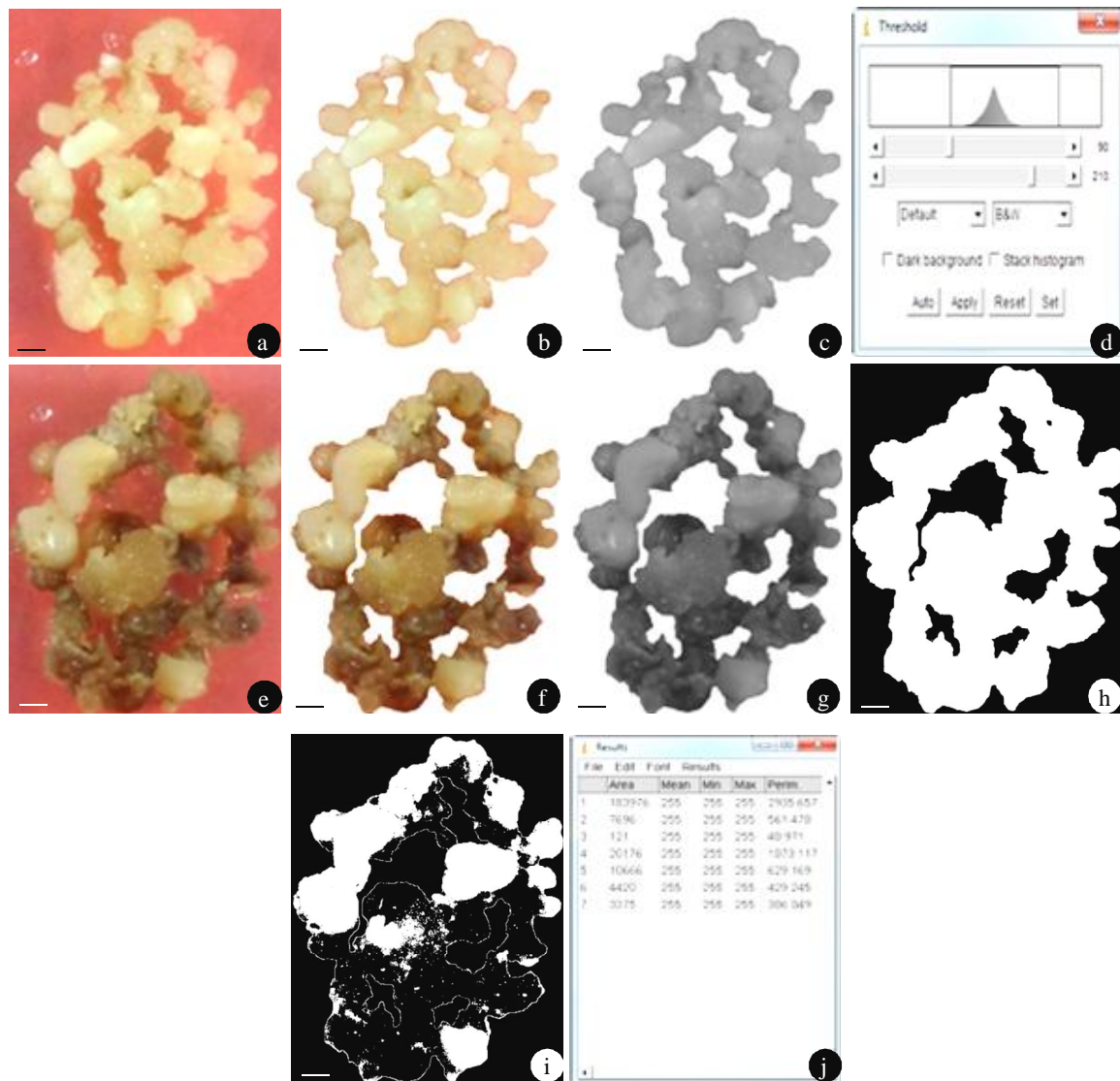


Planche 5 : Estimation du degré de brunissement des amas cellulaires du cal embryogène d'olivier après sélection en présence du filtrat brut de culture de *Verticillium dahliae* Kleb. **a.** Amas cellulaires initialement étalés sur le milieu de sélection. **b.** Suppression du fond rouge par ADOBE® PHOTOSHOP® CS5 EXTENDED. **c.** Image transformée en type '8-bit' par ImageJ®. **d.** Détermination des seuils limites de couleurs binaires. **e.** Aspect des amas cellulaires après trois semaines en présence du filtrat du champignon. **f.** Suppression du fond rouge. **g.** Transformation de l'image en type '8-bit'. **h.** Détermination de la surface totale de la culture après application du mode binaire 'noir et blanc'. **i.** Détermination des surfaces brunies et celles en prolifération via les seuils limites. **j.** Exemple de résultats obtenus. (Barre correspond à 1 cm).

5. Transformation génétique : Enracinement par inoculation bactérienne

Dans l'objectif d'améliorer l'enracinement des boutures prélevées à partir de plants issus de la germination des embryons somatiques, l'effet de l'infection bactérienne (IB) par une souche d'*Agrobacterium rhizogenes* combiné avec la présence d'une auxine est étudié. L'acclimatation des pousses enracinées est ainsi testée.

5.1. Souche bactérienne, inoculation des microboutures et co-culture

La souche bactérienne "A₄" d'*Agrobacterium rhizogenes* utilisée dans le présent travail est activée par ensemencement sur un milieu YEM (Yeast Extract Mannitol) (Vincent, 1970) (Tableau 4). Après 48 h d'incubation sous obscurité à une température de 28±1°C ; la souche est suspendue dans le milieu YEM liquide et mise en culture sous 80 tr/mn d'agitation pendant 72 h jusqu'à l'obtention d'une densité optique entre 0.5 et 0.6 à une longueur d'onde $\lambda = 600$ nm.

Les microboutures prélevées des vitroplants issus de la germination des embryons somatiques des deux lignées de cals (C2 et C3) sont infectées par immersion de leurs bases dans la suspension bactérienne pendant quelques secondes avant d'être placées en co-culture dans des boîtes de Petri sur un milieu OM de base solide sans hormones. Les boutures des vitroplants témoins sont traitées de la même manière que les autres traitements néanmoins avec un milieu YEM sans bactéries. Les microboutures infectées et celles du témoin sont incubées sous obscurité à une température de 25±2°C pendant 48 h.

Tableau 4 : Composition chimique du milieu YEM utilisé pour la culture d'*Agrobacterium rhizogenes*.

Composants du milieu YEM		Quantité (g L ⁻¹)
Eléments chimiques (g l ⁻¹)	K ₂ HPO ₄	0.5
	NaCl	0.1
	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.2
Additifs (g l ⁻¹)	Mannitol	10
	Extrait de levure	0.4
Agar (g l ⁻¹)		0 ou 6
pH		6.1

5.2. Mise en culture des microboutures

Après 48 h de co-culture, les microboutures infectées et celles du témoin sont introduites séparément dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml d'un milieu OM de base additionné de 20 g l⁻¹ de saccharose, 100 mg l⁻¹ de Myo-Inositol en plus d'une balance hormonale composée de 2 mg l⁻¹ de Zéatine et 0.1 mg l⁻¹ d'AIB et solidifié avec 6 g l⁻¹ d'agar. Afin d'empêcher le développement de la bactérie dans le milieu de culture, ce dernier est additionné de 250 mg l⁻¹ de céfotaxime après autoclavage lorsque la température descend à 40°C.

Trois Erlenmeyers par traitement contenant chacun cinq boutures sont incubés pendant six semaines sous photopériode de 16 h de lumière ($35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Tout au long de la culture, les observations ont porté sur la formation de cal à la base des boutures, la réactivité ou le débourrement, le nombre de bourgeons débourrés par bouture, la taille moyenne de la pousse, le nombre moyen de feuilles, l'apparition des racines, le nombre et la longueur des racines émises ainsi que le nombre de microboutures récupérées après six semaines de culture.

5.3. Acclimatation des plantules développées

Les vitroplants ayant atteint une taille de 5 cm ou plus avec plusieurs feuilles et présentant des racines sont acclimatés comme cela a été décrit précédemment. Toutefois, afin d'éviter tout risque de prolifération bactérienne ; la partie racinaire des vitroplants débarrassée de la gélose est immergée dans une solution de 500 mg l^{-1} de céfotaxime pendant environ une heure avant de procéder à l'acclimatation.

6. Analyse statistique des données

Les essais sont effectués selon le dispositif de randomisation totale. Toutes les analyses statistiques des données (Analyse de la variance et tests) sont effectuées à l'aide du programme "XLSTAT" version 2016.02.27444. En cas d'effet significatif, le classement des moyennes est réalisé par le test PPDS (Plus Petite Différence Significative) de Fisher. Les pourcentages et les proportions sont analysés par le test Khi-Deux. Dans toutes les analyses, un niveau de signification de 5% est considéré. Les résultats obtenus sont représentés graphiquement en utilisant le programme Excel de Microsoft Office 2007. Les lettres sur les graphiques et tableaux indiquent les groupes homogènes.

Partie III. Résultats et Interprétation

Partie III. Résultats et Interprétation

1. Établissement des cultures embryogènes

Cette partie du travail a comme objectif d'établir et d'optimiser les différentes étapes du protocole de régénération *in vitro* de plants d'olivier par embryogenèse somatique. Les radicules des embryons zygotiques extraits de la semence du cultivar Algérien 'Chemlal' sont utilisées comme explants primaires pour l'induction de cals embryogènes. Les facteurs majeurs influençant l'induction de cals, leur prolifération cellulaire, production et maturation ainsi que la germination des embryons somatiques et multiplication *in vitro* des plants obtenus suivie d'une acclimatation aux conditions naturelles sont étudiés.

1.1. Induction des cals embryogènes

Les résultats obtenus indiquent que l'induction de cals embryogènes à partir de radicules d'embryons zygotiques du cultivar 'Chemlal' est fortement influencée par la composition chimique du milieu d'induction ainsi que le type de régulateurs de croissance utilisés particulièrement l'auxine.

Après trois semaines de culture, un plus grand nombre de cals est observé sur le milieu OMc que sur le milieu MS, et ce, indépendamment de la combinaison hormonale ajoutée sauf pour le 2,4-D. En effet, le meilleur taux de callogenèse (100%) est obtenu sur le milieu OMc additionné de 0.5 mg de Zéatine et 5 mg d'AIB tandis que moins de 13% de callogenèse est obtenue sur les milieux témoins et 26.7% sur OMc avec 0.5 mg de 2,4-D. Toutefois, lorsque le 2,4-D est utilisé dans MS, la formation de cals est significativement améliorée avec 43.3% (Figure 1). En outre, les radicules cultivées en absence de régulateurs de croissance ou en présence de l'ANA tendent à s'allonger avec, dans certains cas, une formation de cal. Des taux d'élongation de 76.7% et 93.3% sont enregistrés sur les milieux témoins contre 40 et 63.3% en présence de l'ANA respectivement sur OMc et MS (Tableau 5, Planches 6 et 7, Annexe 1a).

Le transfert des cals sur des milieux de culture dépourvus de Zéatine et une concentration d'auxine réduite à $1/10^{\text{ème}}$ affecte significativement leur prolifération en induisant la nécrose des cals. Cependant, 53.3 et 56.7% des cals induits sur OMc contenant respectivement l'AIA et AIB continuent à proliférer tandis que 76.7 et 86.7% des cals obtenus respectivement sur OMc et MS additionnés de 2,4-D montrent une forte nécrose avec une très

faible callogenèse (6 à 10%) proche du témoin permettant 6.7% de prolifération (Tableau 5, Figure 1, Planches 6 et 7, Annexe 1a).

Le passage des cultures sur le milieu ECO additionné de la combinaison hormonale appropriée indique que l'obtention de cals embryogènes présentant une prolifération permanente avec l'apparition de structures embryogènes (nodules) est plus déterminée par le type d'auxine utilisée durant la callogenèse que par la composition chimique du milieu d'induction. En effet, la combinaison de la Zéatine avec de l'AIB permet d'obtenir les meilleurs taux d'embryogenèse avec 13.3 et 10% respectivement sur les milieux OMc et MS. Cependant, près de 7% des cals obtenus en présence de l'ANA sur les deux milieux testés et 3.3% avec l'AIA sur MS étaient embryogènes alors qu'aucune embryogenèse n'est obtenue sur les milieux témoins ou additionnés de 2,4-D (Figure 1, Annexe 1a).

En effet, en absence d'auxine (témoins) ; l'élongation des explants sans formation de cal est suivie d'une nécrose apicale induisant la mort des explants sur le milieu ECO (Planche 8 a-b-c et d). Inversement, en présence de l'ANA l'élongation des radicules est accompagnée d'une formation de cals blanchâtres particulièrement sur la partie basale (Planche 8 m et n) suivie de l'apparition de structures embryogènes après leur transfert sur le milieu dépourvu de Zéatine ainsi que le milieu ECO (Planche 8 o et p). Néanmoins, en présence de l'AIA ou de l'AIB la callogenèse débute souvent à partir de la base des explants avec un léger gonflement de la partie apicale avant de se propager sur l'ensemble de l'explant en absence de cytokinine (Planche 8 e-f-g et i-j-k) conduisant par la suite à l'apparition de masses embryogènes, et ce, en dépit d'un certain brunissement (Planche 8 h et l). Par contre, le 2,4-D induit un gonflement suivi d'un brunissement marqué provoquant par la suite une nécrose totale des explants sans apparition de structures embryogènes (Planche 8 q-r-s et t).

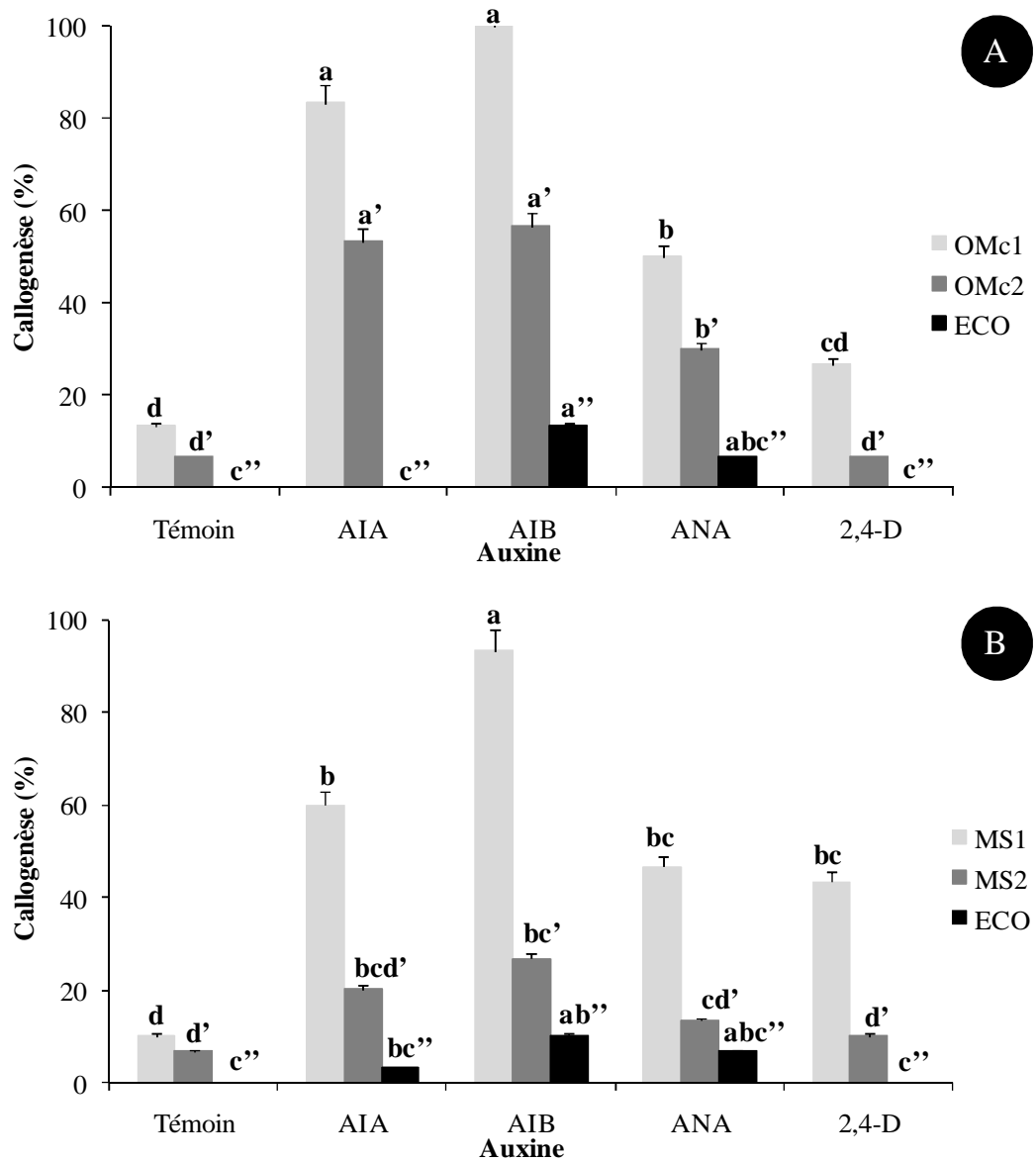


Figure 1. Effet du type de milieu de culture (A et B) et du type de d'auxine additionné sur le taux de callogénèse et d'induction de l'embryogenèse somatique à partir d'explants de racicules d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal.

Tableau 5 : Effet du type de milieu d'induction de l'embryogenèse somatique sur l'élongation des racicules et la nécrose des cals obtenus à partir d'explants de racicules d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal*.

Milieu d'induction	Auxines additionnées	Elongation (%)	Nécrose (%)	
			1 mois / Milieu sans Zéatine	+ 2 mois / Milieu ECO
OMc	Témoin	76.6 b	10.0 ef	23.3 de'
	AIA	0.0 d	73.3 ab	90.0 ab'
	AIB	0.0 d	70.0 ab	83.3 ab'
	ANA	40.0 c	30.0 de	60.0 c'
	2,4-D	0.0 d	86.7 a	100.0 a'
MS	Témoin	93.3 a	6.7 f	20.0 e'
	AIA	0.0 d	56.7 bc	73.3 bc'
	AIB	0.0 d	43.3 cd	63.3 c'
	ANA	63.3 b	16.7 ef	40.0 d'
	2,4-D	0.0 d	76.7 ab	100.0 a'

* : les différentes lettres en minuscule du même format (Non gras sans accent « a », Non gras avec un seul accent « a' », En gras sans accent « a ») indiquent les groupes homogènes d'une différence significative à un seuil de 5%.

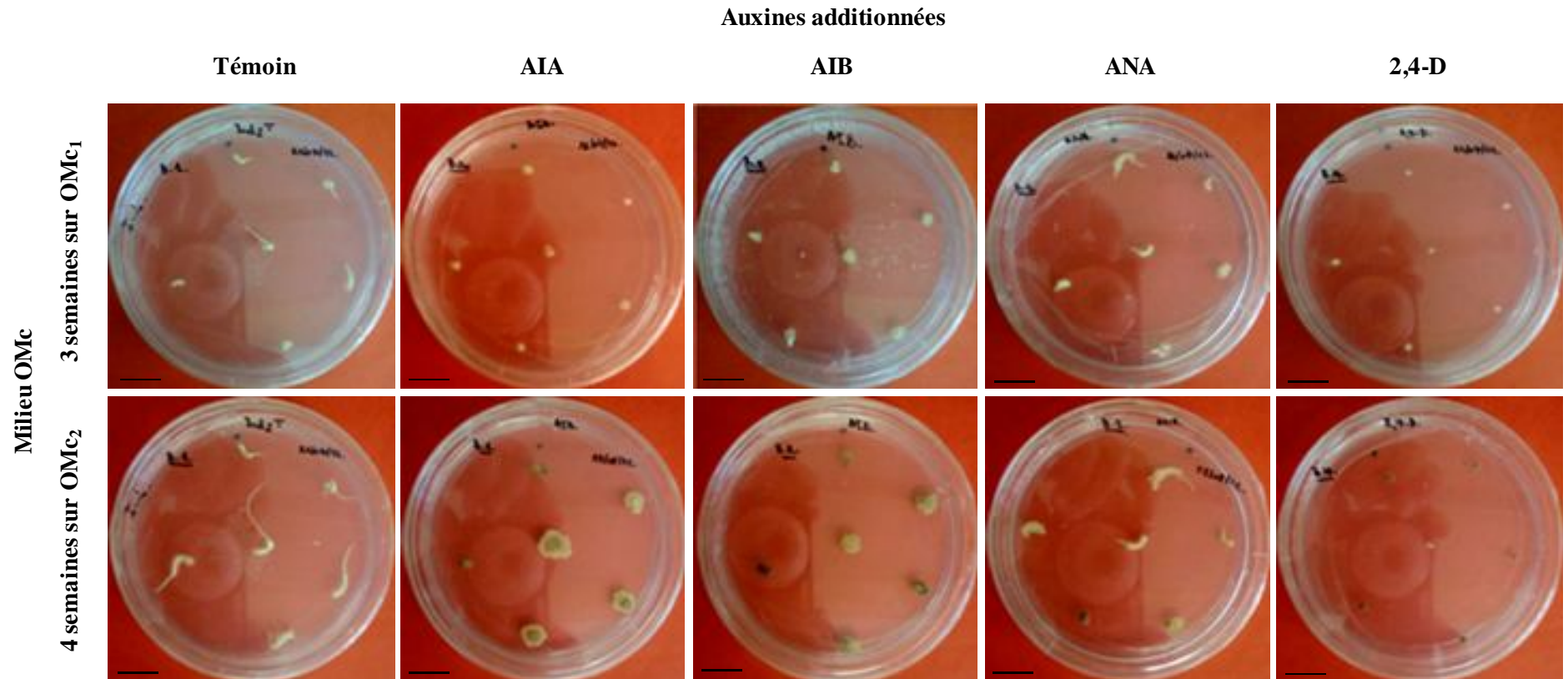


Planche 6 : Aspect des racines des embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, cultivées sur le milieu de culture OMc additionné de différentes auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D) après 3 semaines et 4 semaines d'induction de l'embryogenèse somatique. (Barre correspond à 1 cm).

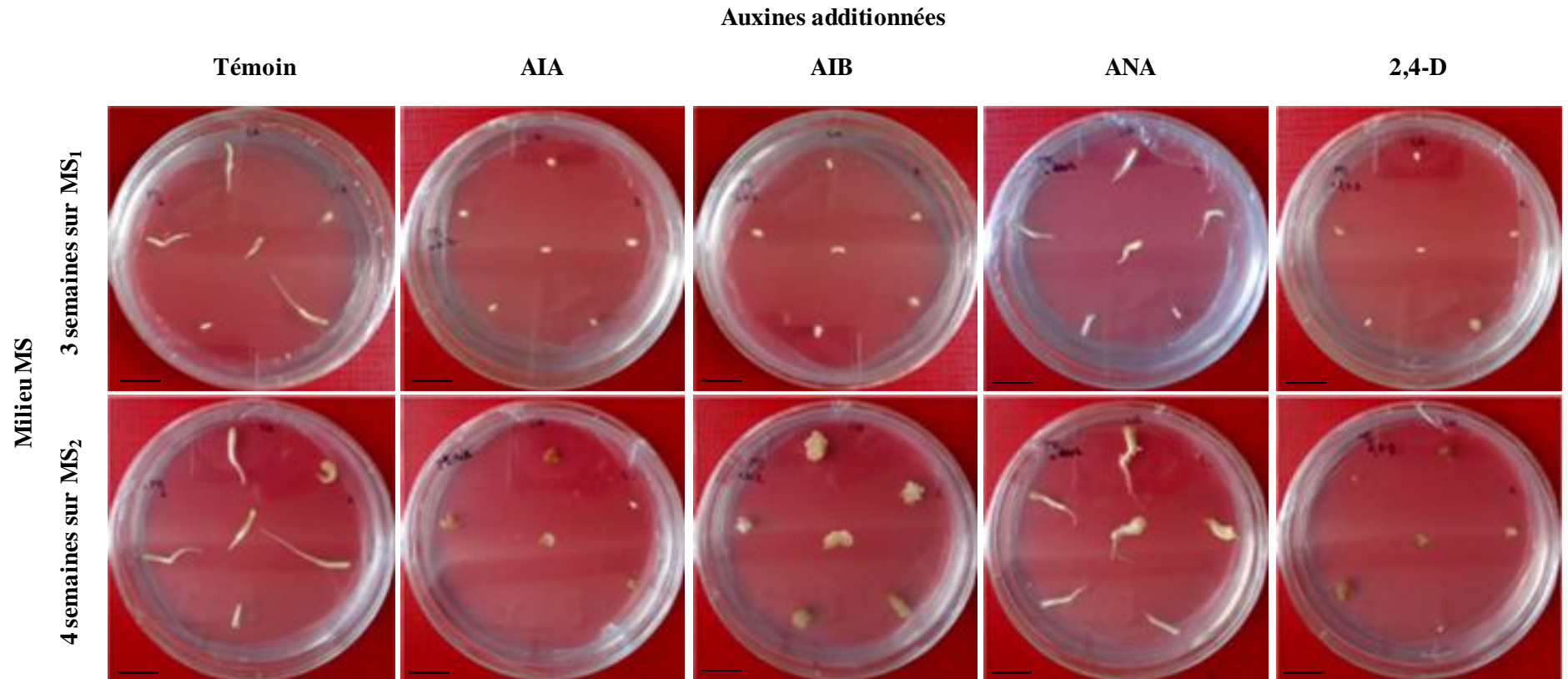


Planche 7 : Aspect des racines des embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, cultivées sur le milieu de culture MS additionné de différentes auxines (AIA, AIB, ANA et 2,4-D) après 3 semaines et 4 semaines d'induction de l'embryogenèse somatique. (Barre correspond à 1 cm).

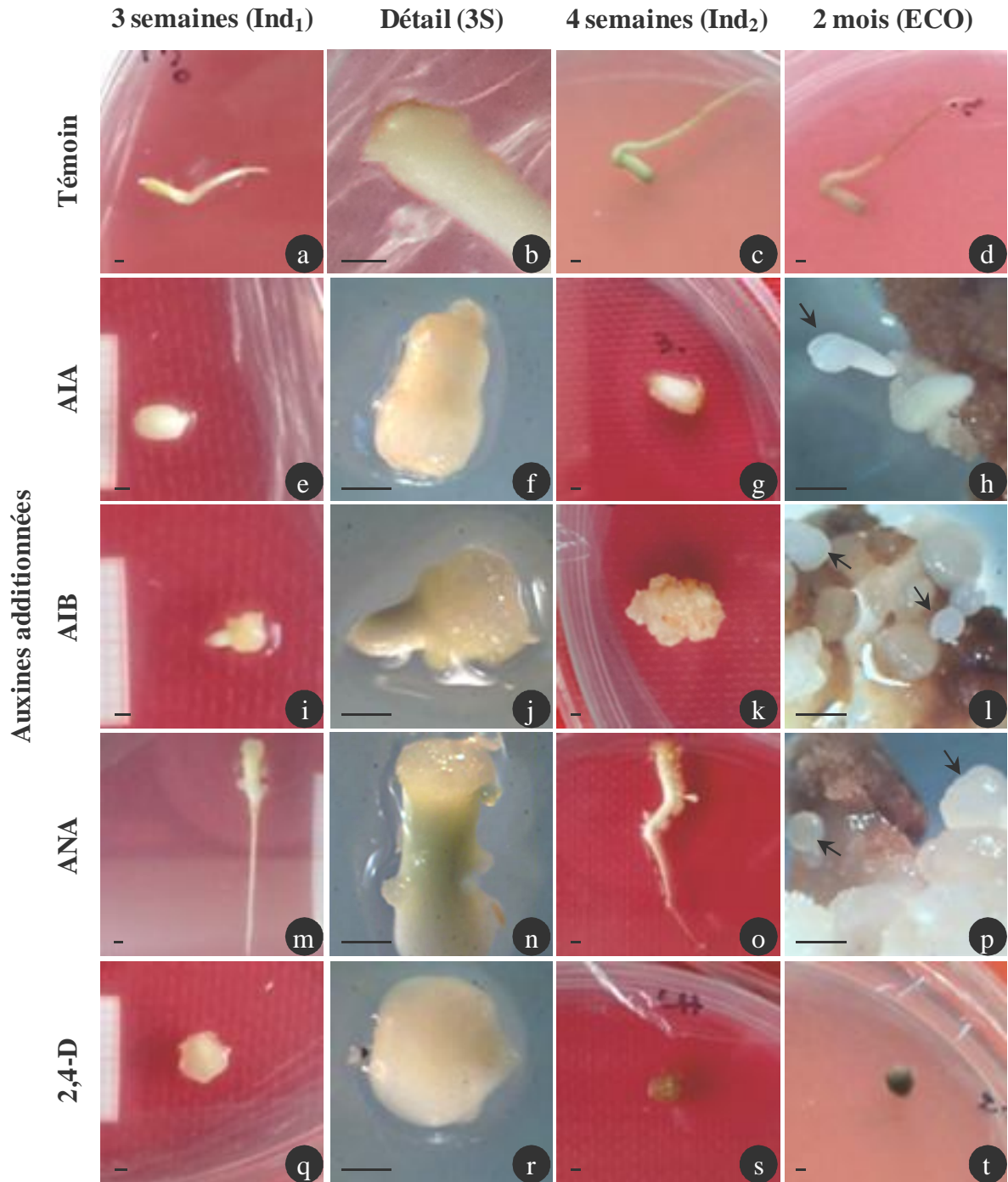


Planche 8 : Evolution des explants de racines d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, mises en culture en présence de différentes auxines après 3 semaines sur les premiers milieux d'induction OMc ou MS (Ind₁), 4 semaines sur les deuxièmes milieux OMc ou MS (Ind₂) d'induction de l'embryogenèse somatique et début d'apparition des structures embryogènes après transfert sur le milieu ECO. (→ : les flèches indiquent les structures embryogènes, Barre correspond à 1 cm sauf pour **b, f, h, j, l, n, p** et **r** la barre correspond à 0.1 cm).

Au total, douze (12) lignées de cals sont obtenues. Elles sont caractérisées par une certaine prolifération plus ou moins maintenue avec la présence de structures embryogènes (nodules de différentes tailles et embryons somatiques de différents stades de développement) (Tableau 6, Planche 9).

La majorité des lignées obtenues présentent des amas cellulaires de structures nodulaires de différentes tailles (Planche 9) tandis que chez certaines lignées ; les masses cellulaires sont amorphes (Planche 9 C10) et présentant peu de nodules ou de très petites nodules en surface.

Les cals présentent une friabilité variant d'une structure composée de masses cellulaires facilement séparables (Planche 9 C1-C3-C4 et C6) à une structure plus ou moins compacte (Planche 9 C2-C5-C7-C8-C9 et C10). Toutefois, les cals des lignées C11 et C12 présentent des nodules fortement collés entre eux. Ils sont caractérisés par une forte nécrose et une prolifération très lente avec peu de pro-embryons somatiques qui apparaissent à la surface des cals (Planche 9 C11 et C12).

La prolifération cellulaire, la nécrose des lignées ainsi que la production de masses pro-embryogènes sont en relation directe avec la texture du cal. Les textures nodulaires friables présentent souvent une bonne prolifération et une nécrose faible ou moyenne avec l'apparition précoce de structures embryogènes sur la surface des cals (Planche 9 C1-C2 et C3) alors que les amas cellulaires fortement compactés ont une faible capacité de prolifération et de production de pro-embryons avec une nécrose marquée (Tableau 6, Planche 9).

De même, la couleur du cal dépend fortement de la friabilité des masses cellulaires. En effet, les lignées nodulaires friables sont de couleur blanc-jaunâtre (Planche 9 C1-C2-C3-C4 et C6) tandis que les lignées fortement compactes (Planche 9 C11 et C12) sont de couleurs foncées et présentent un taux de nécrose élevé.

Au final, six lignées embryogènes classées sur la base de leurs caractéristiques morphologiques sont obtenues (Planche 9 de C1 à C6). Elles sont retenues et maintenues pour la suite du travail. Toutefois, uniquement trois lignées ont fait l'objet de l'évaluation de leur capacité embryogène et de régénération de plantules parfaitement constituées.

Tableau 6 : Caractéristiques des lignées de cals embryogènes obtenues à partir de radicules d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, en présence de différentes auxines et sur deux milieux de culture (OMc et MS).

Lignées	Milieu/Auxine d'induction	Texture*	Taille des nodules	Prolifération	Nécrose	Expression embryogène**
C1	OMc / ANA	Nodulaire friable	Moyenne	Très bonne	Faible	Moyenne
C2	OMc / ANA	Nodulaire peu friable	Moyenne	Bonne	Faible	Très bonne
C3	MS / AIB	Mixte friable	Petite/Moyenne	Bonne	Faible	Bonne
C4	OMc / AIB	Nodulaire friable	Variable	Bonne	Moyenne	Faible
C5	OMc / AIB	Nodulaire compacte	Variable	Bonne	Forte	Très faible
C6	OMc / AIB	Mixte friable	Variable	Bonne	Moyenne	Très faible
C7	OMc / AIB	Nodulaire peu friable	Variable	Moyenne	Moyenne	Très faible
C8	MS / ANA	Mixte compacte	Variable	Moyenne	Moyenne	Très faible
C9	MS / ANA	Mixte compacte	Variable	Moyenne	Moyenne	Très faible
C10	MS / AIA	Granuleuse compacte	Très petite	Faible	Forte	Très faible
C11	MS / AIB	Nodulaire très compacte	Grande	Très faible	Forte	Très faible
C12	MS / AIB	Nodulaire très compacte	Variable	Très faible	Forte	Faible

Nodulaire : masses cellulaires en forme de nodules, **Granuleuse** : masses cellulaires amorphes, **Mixte** : masses cellulaires amorphes avec présence de quelques nodules en surface.

* : **Friable** : la séparation des masses et nodules est facile et sans effort, **Peu friable** : la séparation des amas cellulaires nécessitent un certain effort avec la pince uniquement, **Compacte** : la séparation est difficile et nécessite plus d'effort avec la pince, **Très compacte** : la séparation est très difficile et nécessite l'utilisation de la pince et du scalpel.

** : l'expression embryogène est relative à l'apparition des structures embryogènes (embryons somatiques des stades torpide, cordiforme et cotylédonaire) après plus de deux mois de culture sur milieu solide.



Planche 9 : Aspect des lignées de cals embryogènes obtenues à partir des racines d'embryons zygotiques d'olivier, Cv. Chemlal, après plusieurs mois d'induction en présence de différentes auxines sur deux milieux de culture (OMc et MS) et apparition des structures embryogènes après transfert sur le milieu ECO. (→ : les flèches indiquent les structures embryogènes, Barre des premières images de chaque groupe correspond à 1 cm et 0.1 cm pour les autres). (Abréviations : **Cor** : Embryon somatique au stade **cordiforme**, **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**, **ME** : Masse embryogène, **Nod** : Nodule, **Tor** : Embryon somatique au stade **torpide**).

Conclusion partielle (Induction des cals embryogènes)

L'induction de cals embryogènes d'olivier est initiée par la culture de radicules d'embryons zygotiques isolés des noyaux d'olives matures du cultivar 'Chemlal' puis cultivées sur deux milieux différents (OMc ou MS) solides contenant diverses combinaisons hormonales à base d'auxines et cytokinines. Les résultats obtenus indiquent que :

- L'induction de l'embryogenèse somatique est fortement influencée par la composition chimique du milieu d'induction de la callogenèse, la balance hormonale utilisée et surtout le type d'auxine additionnée.
- La formation de cals après trois semaines d'incubation est plus importante chez les explants de radicules mis en culture sur le milieu OMc que sur le milieu MS. De plus, la balance hormonale composée d'AIB et de Zéatine permet d'obtenir plus de callogenèse par rapport aux autres balances hormonales. En outre, le meilleur taux de callogenèse (100%) est obtenu sur le milieu OMc en présence de l'AIB en combinaison avec la Zéatine tandis que les autres auxines notamment le 2,4-D ne donnent que de faibles résultats.
- Le maintien des cals pendant un mois sur les mêmes milieux dépourvus de Zéatine et avec une concentration d'auxine réduite à $1/10^{\text{ème}}$ provoque une forte nécrose des masses cellulaires induites particulièrement sur le milieu OMc additionné de 2,4-D ou d'AIA. Néanmoins, les cals induits en présence d'AIB ont maintenu une certaine prolifération cellulaire en dépit du brunissement prononcé observé.
- Le transfert des cals obtenus sur le milieu ECO contenant l'auxine correspondante (à celle utilisée pour la callogenèse) en plus de la Zéatine et de la BAP s'est traduit par l'obtention de plusieurs lignées de cals embryogènes dont la majorité (7 lignées sur 12) est obtenue suite à une induction sur les milieux contenant l'AIB.

1.2. Évaluation de la capacité embryogène de quelques lignées de cals

Après l'obtention de plusieurs lignées de cals ayant maintenus une certaine prolifération cellulaire avec apparition de structures embryogènes (nodules ou globules, pro-embryons et embryons somatiques) d'une couleur blanc-opaque et une texture nodulaire friable ; nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet des facteurs influençant la capacité embryogène (prolifération ainsi que la production, maturation et germination des embryons somatiques) de nos lignées.

1.2.1. Estimation de la capacité de prolifération

La capacité de prolifération des trois lignées de cals retenues (C1, C2 et C3) est estimée par l'accroissement du poids frais obtenu suite à la culture d'une masse de cal sur un milieu de culture solide ou liquide pendant un mois sous obscurité totale. De plus, l'aspect morphologique des cals obtenus ainsi que l'apparition des structures embryogènes et la nécrose des masses cellulaires sont considérées. L'effet de certains facteurs considérés les plus influençant est étudié.

1.2.1.1. Effet du type de milieu de prolifération

L'accroissement du poids frais des cals est significativement influencé par la lignée de cal, le type et la nature (liquide ou solide) du milieu de culture (Figure 2, Planche 10, Annexe 1b). En effet, la culture en suspension permet un accroissement du poids frais plus élevé par rapport au milieu solide.

La prolifération des lignées C1 et C3 est supérieure sur le milieu ECO liquide avec 0.29 et 0.26 g respectivement que sur les deux autres milieux testés (OM et MS), tandis que le milieu OM était plus bénéfique pour la prolifération de la lignée C2 avec 0.2 et 0.3 g/mois d'accroissement du poids frais respectivement en milieu solide et liquide. Cependant, la lignée C1 est moins influencée par la nature du milieu de prolifération du fait que les accroissements du poids frais enregistrés étaient presque les mêmes essentiellement sur ECO et MS avec 0.29 et 0.2 g respectivement (Figure 2). Inversement, la prolifération de la lignée C2 n'est pas significativement influencée par le type du milieu de culture particulièrement solide permettant un accroissement entre 0.16 et 0.18 g/mois sur les trois milieux testés (Figure 2 A).

Par ailleurs, le meilleur accroissement du poids frais obtenu est d'environ 0.3 g avec la lignée C2 après un mois de culture sur OM liquide (Figure 2 B) alors que la lignée C3 prolifère faiblement sur les milieux OM et MS notamment ceux solides avec 0.08 g/mois d'accroissement de poids frais (Figure 2 A).

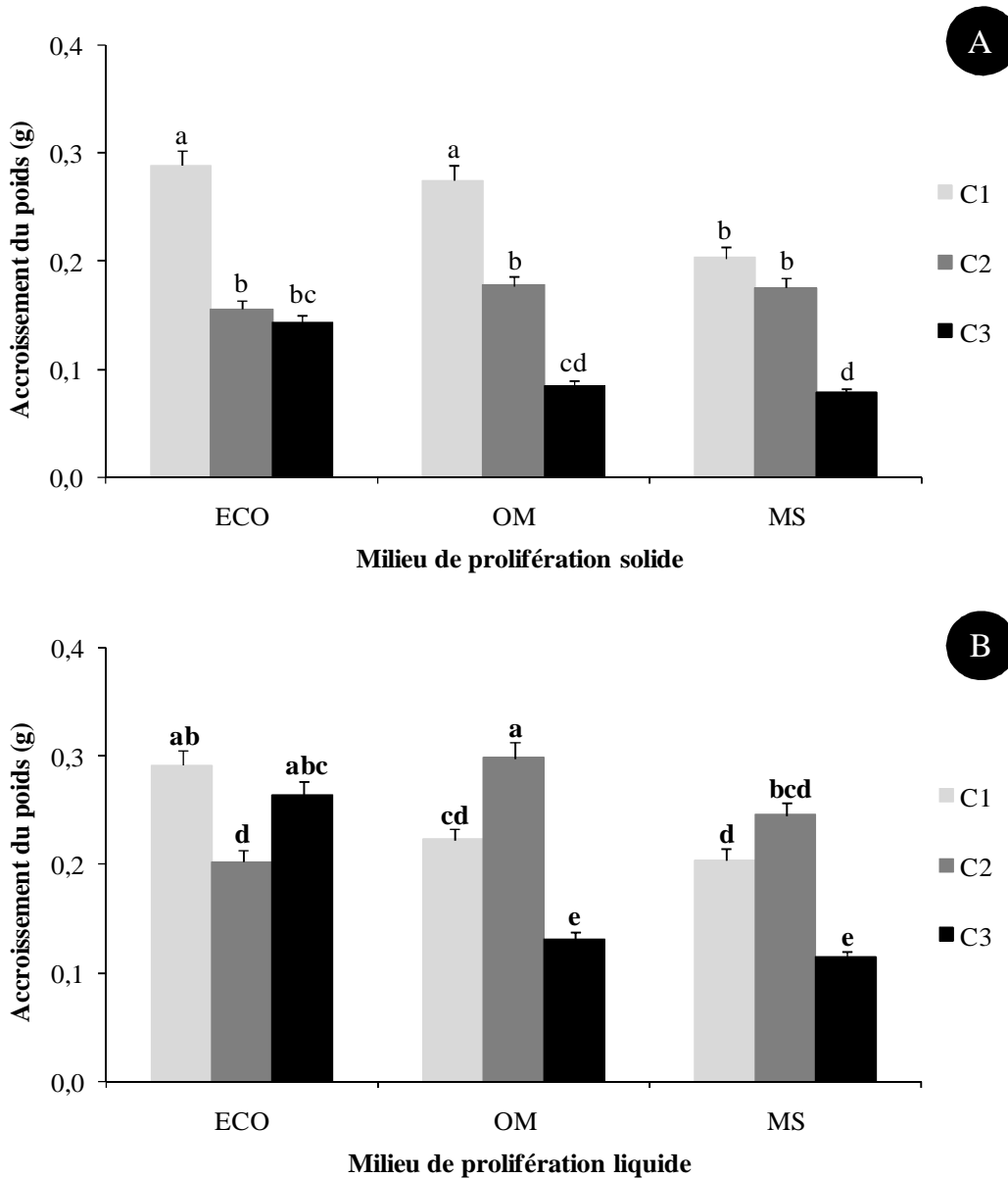


Figure 2. Effet du type de milieu de prolifération solide (A) et liquide (B) sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal.

La faible prolifération des lignées de cals C1 et C3 sur les milieux OM et MS solides est accompagnée souvent d'un brunissement intense des masses cellulaires initialement introduites en culture, ce qui se traduit par un faible accroissement du poids frais tandis que l'inverse est observé chez la lignée C2 notamment sur les milieux liquides où la prolifération aboutit à des masses cellulaires de grandes tailles moins nécrosées (Planche 10).

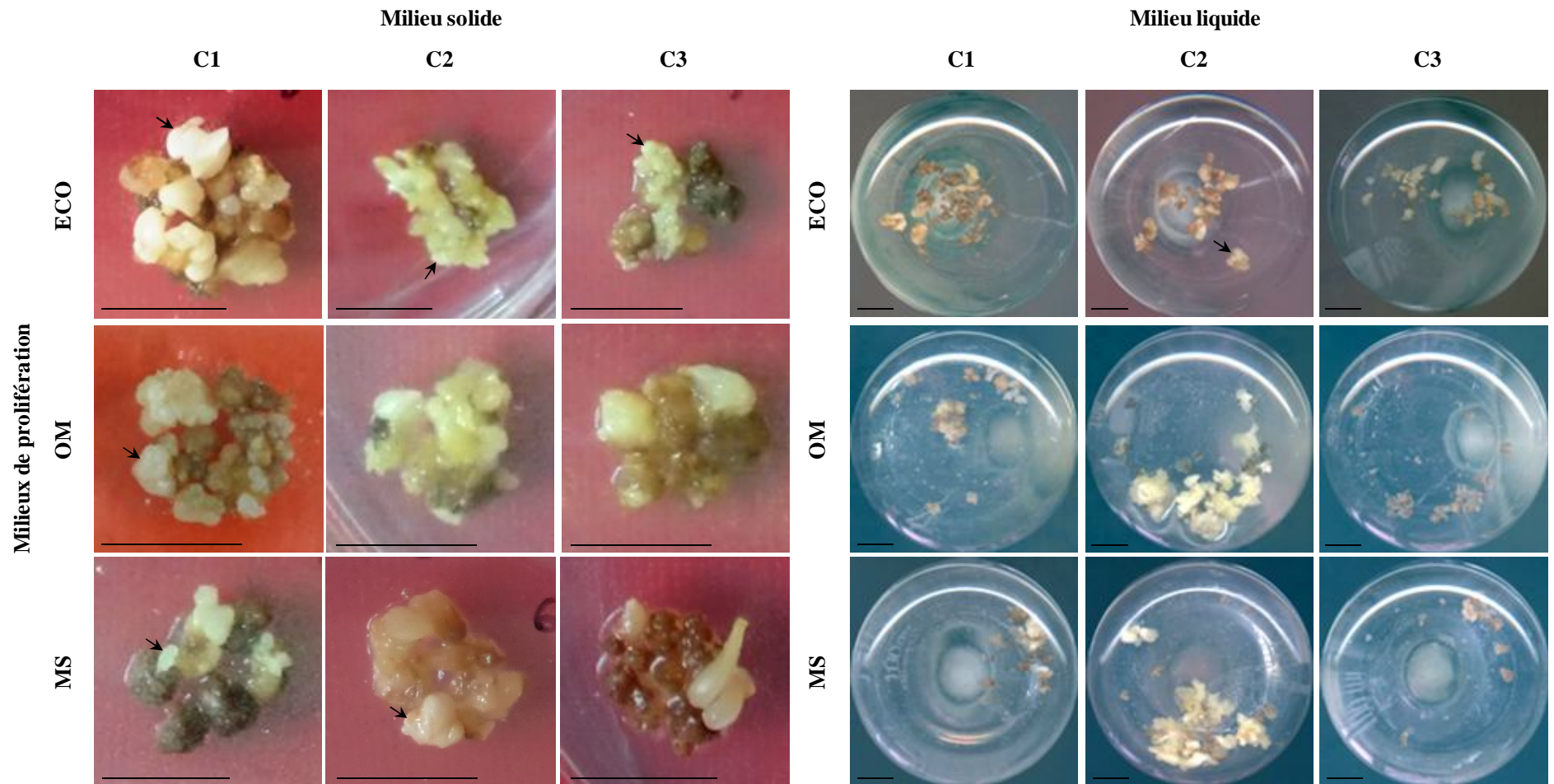


Planche 10 : Aspect des différents lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur trois milieux de prolifération (MS, OM et ECO) solides et liquides. (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires, Barre correspond à 1 cm).

Le milieu ECO permet une meilleure prolifération cellulaire des cals des différentes lignées avec la formation de structures pro-embryogènes, tandis que les milieux OM et MS aboutissent à la formation de masses cellulaires compactes peu friables avec des nodules de grande taille, ce qui se traduit par des structures embryogènes imbriquées en couronne notamment sur le milieu MS (Planche 11).

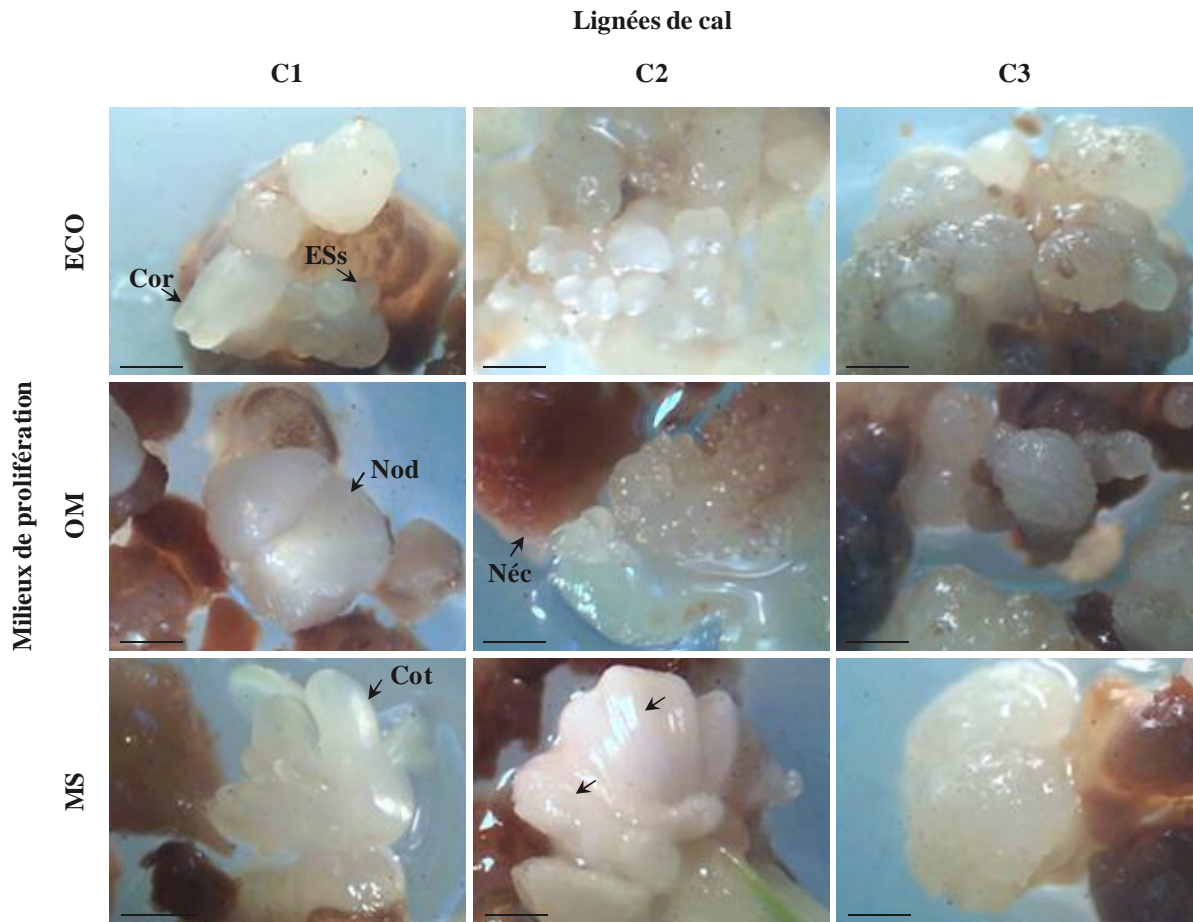


Planche 11 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur trois milieux de prolifération (MS, OM et ECO). (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires, Barre correspond à 0.1 cm). (Abréviations : **Cor** : Embryon somatique au stade **cordiforme**, **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**, **ESs** : Embryogenèse somatique secondaire, **Néc** : Nécrose, **Nod** : Nodule).

1.2.1.2. Effet de la balance hormonale

Les résultats obtenus indiquent que la présence des régulateurs de croissance dans le milieu de culture est indispensable pour le maintien de la prolifération cellulaire des cals des différentes lignées évaluées dont la réaction diffère selon la composition de la balance

hormonale et en relation directe avec la nature (liquide ou solide) du milieu de prolifération (Figure 3, Planches 12 et 13, Annexe 1b).

En effet, les meilleurs résultats d'accroissement de poids frais avec la formation de masses cellulaires moins nécrosées sont observés en présence d'AIB et de Zéatine particulièrement en culture liquide avec 0.29, 0.2 et 0.26 g respectivement pour les trois lignées (C1, C2 et C3), tandis que sur milieu solide l'accroissement du poids frais était respectivement de 0.29, 0.16 et 0.14 g (Figure 3).

Par ailleurs, les plus faibles capacités de prolifération obtenues avec la formation de masses cellulaires fortement nécrosées sont enregistrées sur les milieux témoins ainsi qu'en milieu liquide additionné de l'ANA combinée avec la Zéatine pour C1 et sur milieu solide pour C2 et C3 avec respectivement 0.04, 0.06 et 0.1 g d'accroissement de poids frais. Toutefois, la lignée C3 en milieu solide prolifère mieux en présence de l'ANA et du TDZ avec 0.17 g d'accroissement de poids frais après un mois de culture (Figure 3, Planche 12).

En outre, la combinaison de l'AIB avec de la Zéatine permet une forte embryogenèse somatique secondaire aboutissant à la formation de structures embryogènes à des stades de développement très avancés alors qu'une faible expression embryogène est observée en présence des autres balances hormonales testées notamment celles contenant TDZ comme cytokinine (Planche 14).

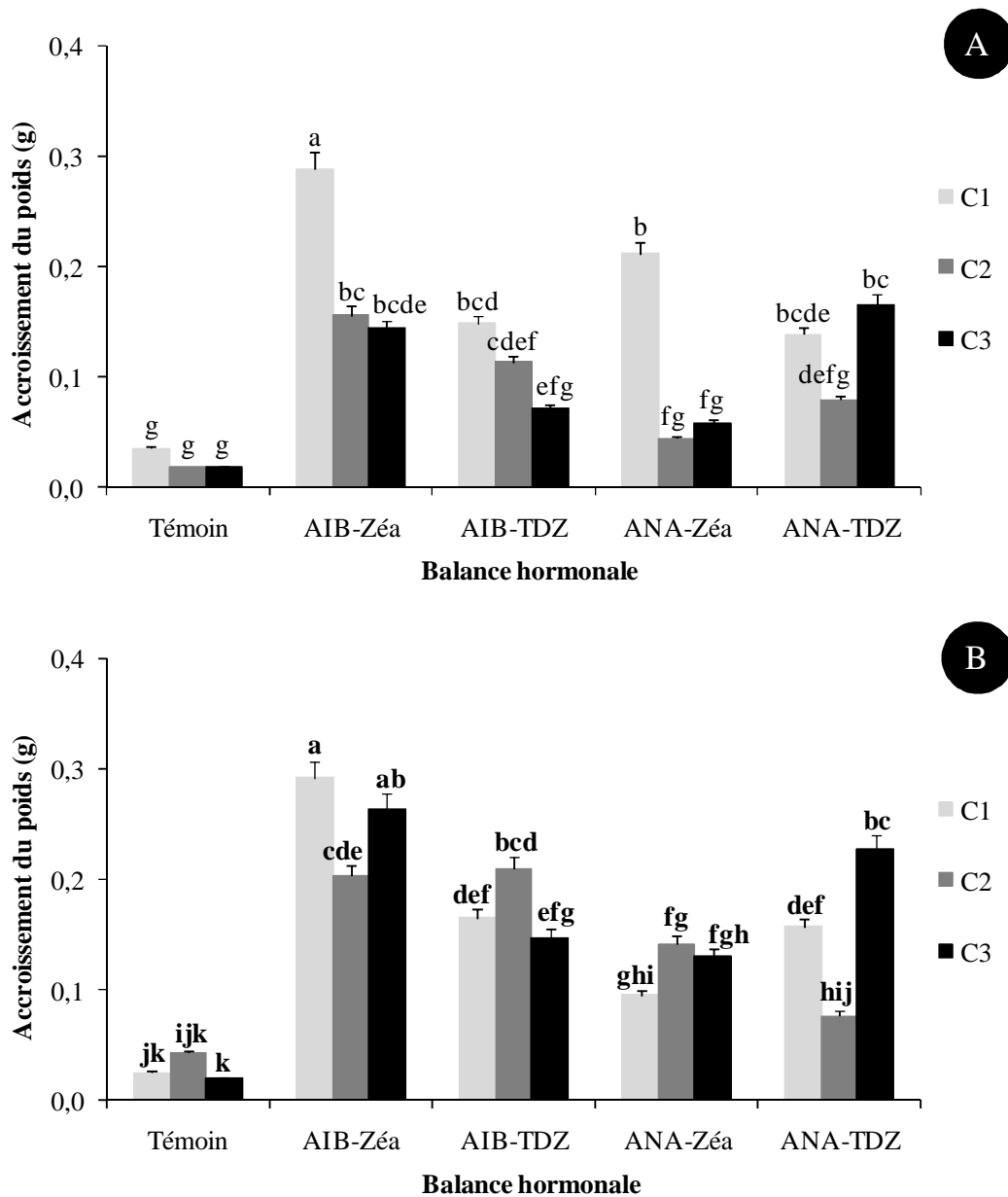


Figure 3. Effet de la balance hormonale additionnée au milieu de prolifération ECO solide (A) et liquide (B) sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal.

Balances hormonales additionnées au milieu de prolifération solide

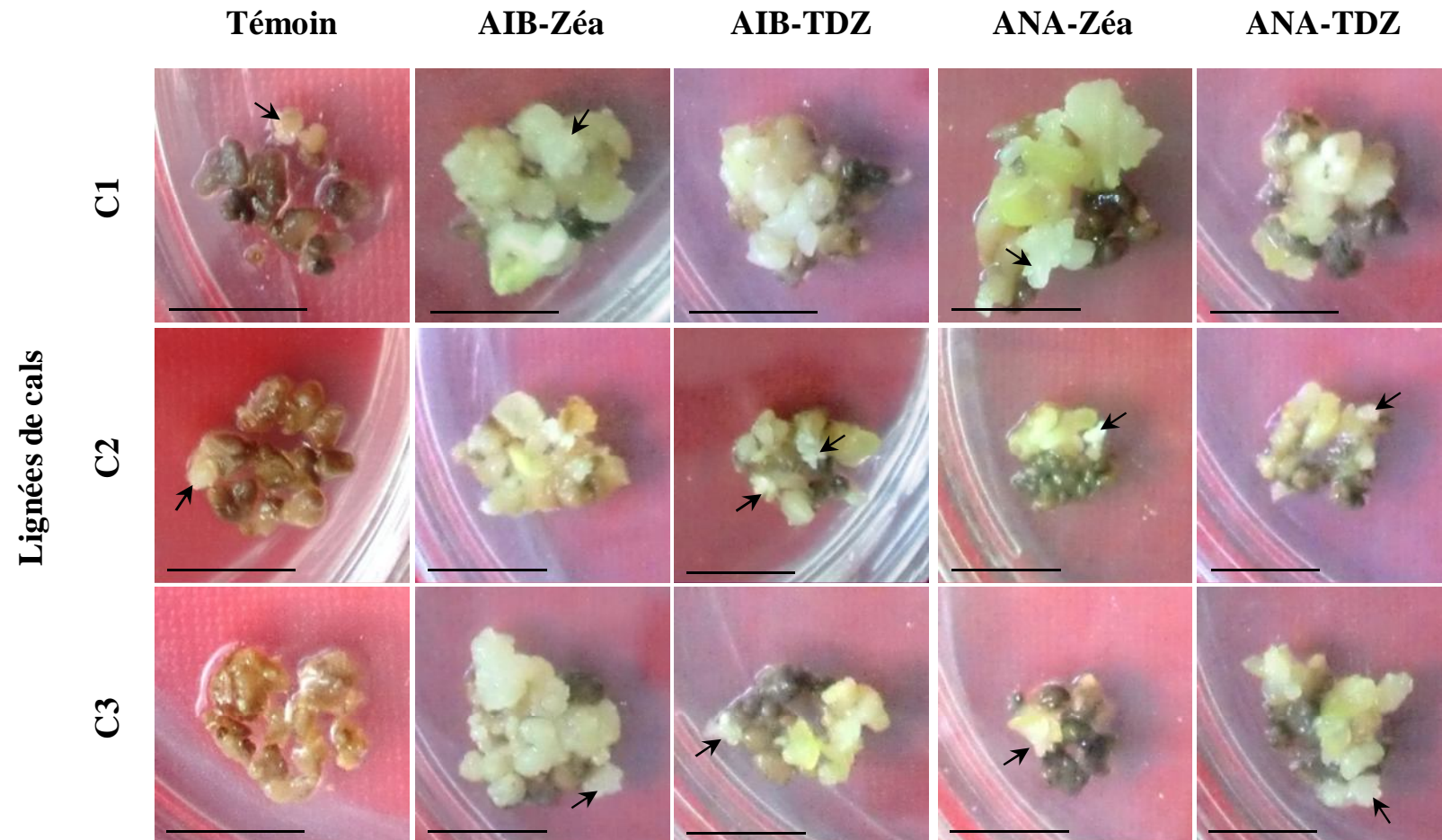


Planche 12 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO solide en présence de différentes balances hormonales à base d'auxines (AIB ou ANA) et de cytokinines (Zéatine ou Thidiazuron). (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires, Barre correspond à 1 cm).

Balances hormonales additionnées au milieu de prolifération liquide

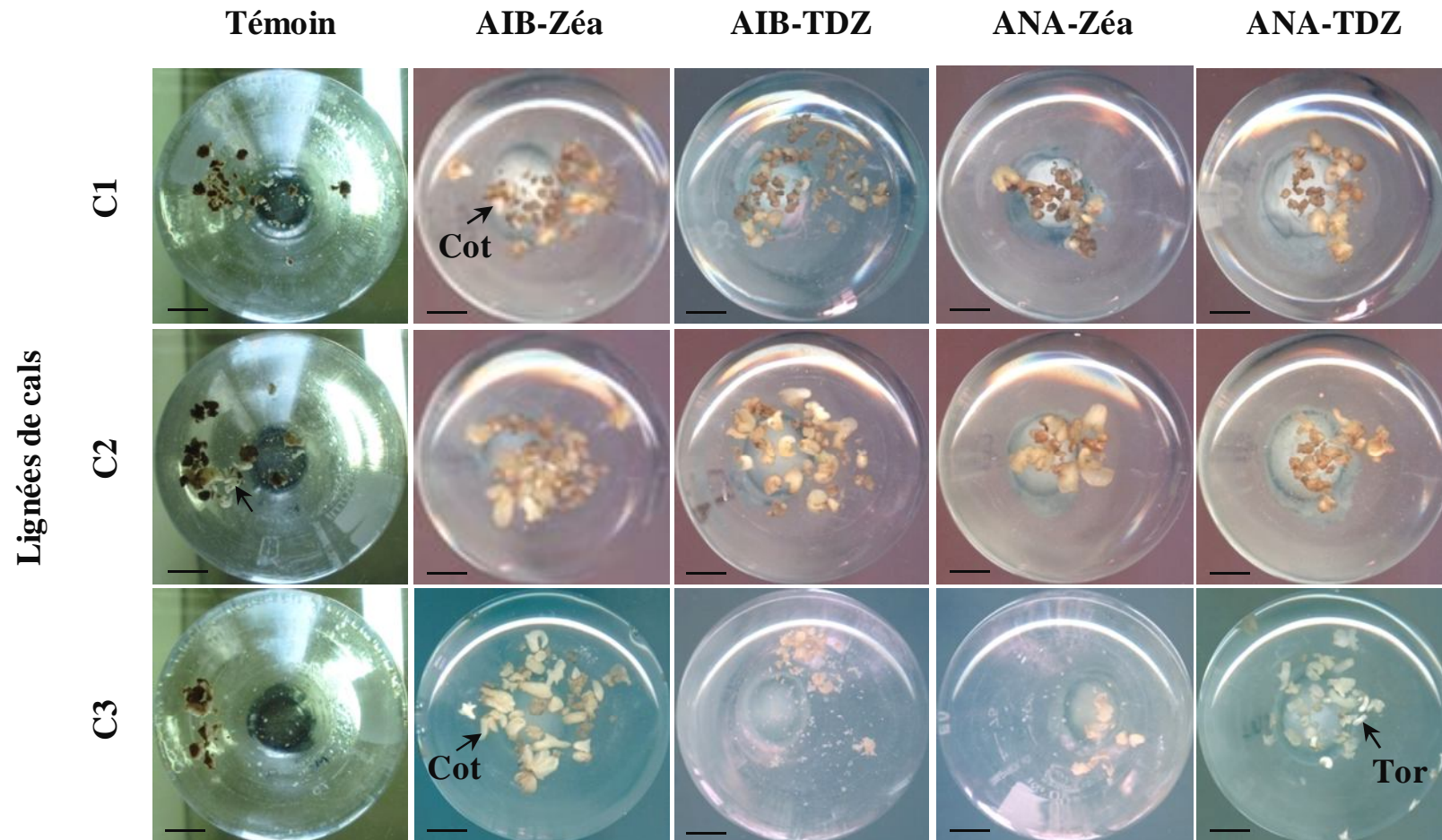


Planche 13 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO liquide en présence de différentes balances hormonales à base d'auxines (AIB ou ANA) et de cytokinines (Zéatine ou Thidiazuron). (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires, Barre correspond à 1 cm). (Abréviations : **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**, **Tor** : Embryon somatique au stade **torpide**).

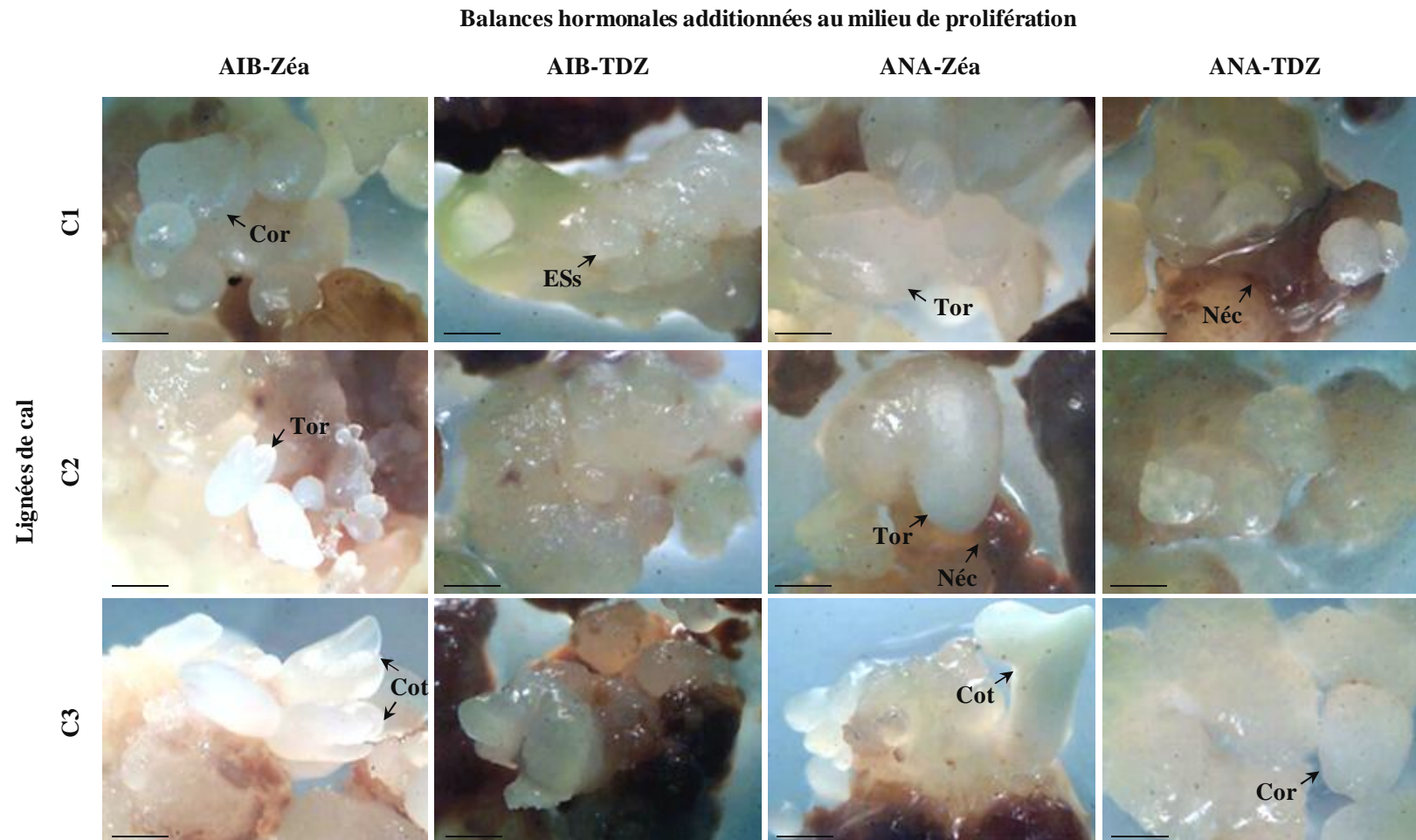


Planche 14 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO en présence de différentes balances hormonales à base d'auxines (AIB ou ANA) et de cytokinines (Zéatine ou Thidiazuron). (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires, Barre correspond à 0.1 cm). (Abréviations : **Cor** : Embryon somatique au stade **cordiforme**, **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**, **ESs** : Embryogenèse somatique secondaire, **Tor** : Embryon somatique au stade **torpide**, **Néc** : Nécrose).

1.2.1.3. Effet de la concentration du saccharose

La concentration du saccharose dans le milieu de prolifération influence significativement l'accroissement du poids frais du cal des différentes lignées embryogènes testées (Figure 4, Annexe 1b). En effet, l'accroissement du poids frais augmente proportionnellement avec la concentration du saccharose, et ce, particulièrement en culture liquide alors que des doses dépassant 20 g l⁻¹ n'améliorent pas considérablement la prolifération notamment sur le milieu solide (Figure 4), malgré qu'elles accélèrent l'apparition et la différenciation des structures embryogènes assez développées (Planche 15). Par conséquent, les meilleurs résultats d'accroissement du poids frais obtenus sur le milieu solide sont enregistrés en présence de 40 g l⁻¹ de saccharose pour C1 et C3 avec 0.29 et 0.15 g respectivement, tandis que 30 g l⁻¹ de sucre permet d'obtenir plus de 0.16 g d'accroissement chez la lignée C2 (Figure 4 A, Planche 15). De même, une corrélation positive ($r = 0.98$) est observée entre l'accroissement du poids frais et la concentration du sucre en milieu liquide de telle sorte que les meilleurs accroissements du poids frais de 0.33, 0.21 et 0.32 g respectivement pour les trois lignées sont enregistrés en présence de 40 g l⁻¹ de saccharose (Figure 4 B, Planche 16).

La concentration minimale en sucre indispensable pour la prolifération cellulaire diffère d'une lignée à une autre et selon la nature du milieu de culture. En effet, les lignées C1 et C2 sont capables de proliférer et produire de nouvelles masses cellulaires sur milieu solide même en présence d'une faible concentration de saccharose (5 g), tandis qu'une bonne prolifération chez la lignée C3 n'est observée qu'avec une concentration de saccharose supérieure à 10 g (Figure 4 A, Planches 15 et 16). Par ailleurs, l'effet de l'addition du saccharose au milieu liquide est nettement significatif (Figure 4 B, Planche 16).

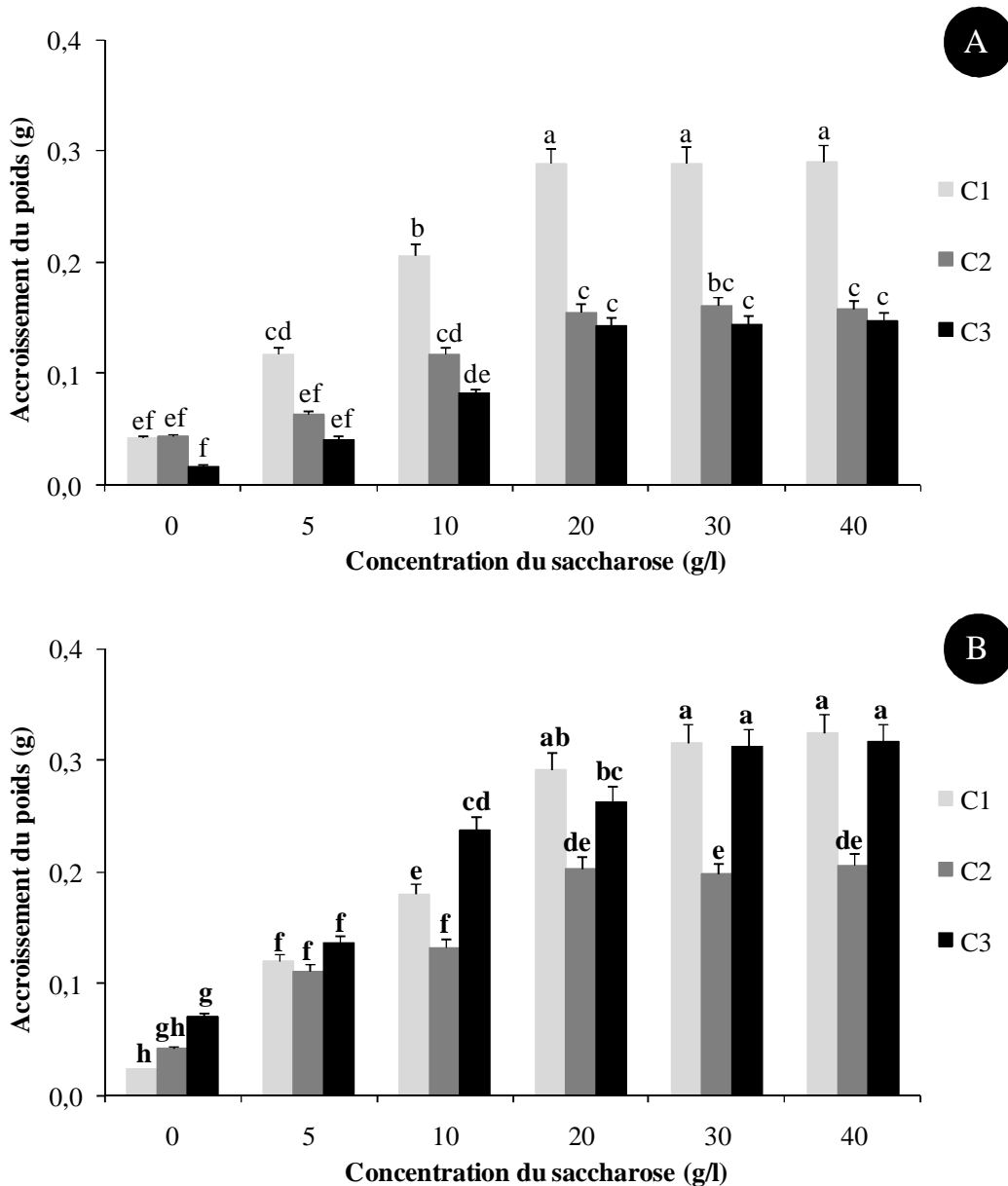


Figure 4. Effet de la concentration du saccharose dans le milieu de prolifération ECO solide (A) et liquide (B) sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal.

En outre, la nécrose des cals mis en culture diminue avec l'augmentation de la teneur en sucre dans le milieu. De plus, en présence de faibles concentrations (moins de 20 g) de sucre dans le milieu de maintien ; les lignées de cals ont tendance à proliférer en produisant peu de masses cellulaires nécrosées générant des embryons somatiques aux stades globulaires ou cordiformes tandis que des concentrations plus élevées de saccharose dans le milieu de culture favorisent la différenciation cellulaire et l'apparition d'embryons somatiques assez bien développés (stade torpide et cotylédonaire) avec une forte capacité d'embryogenèse somatique secondaire (Planche 15).

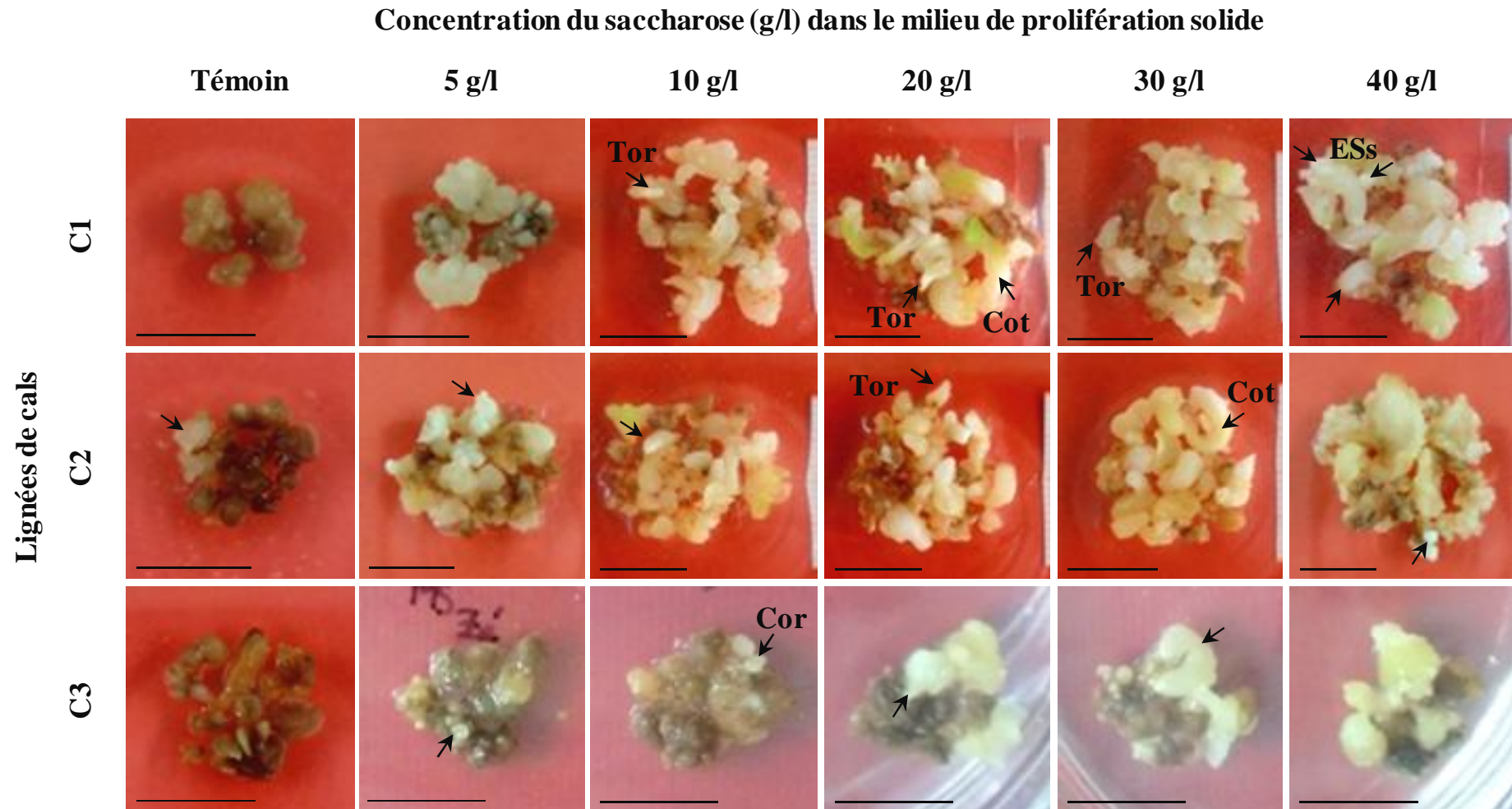


Planche 15 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO solide en présence de différentes concentrations de saccharose. (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires et les structures embryogènes, Barre correspond à 1 cm). (Abréviations : **Cor** : Embryon somatique au stade **cordiforme**, **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**, **ESs** : Embryogenèse somatique secondaire, **Tor** : Embryon somatique au stade **torpide**).

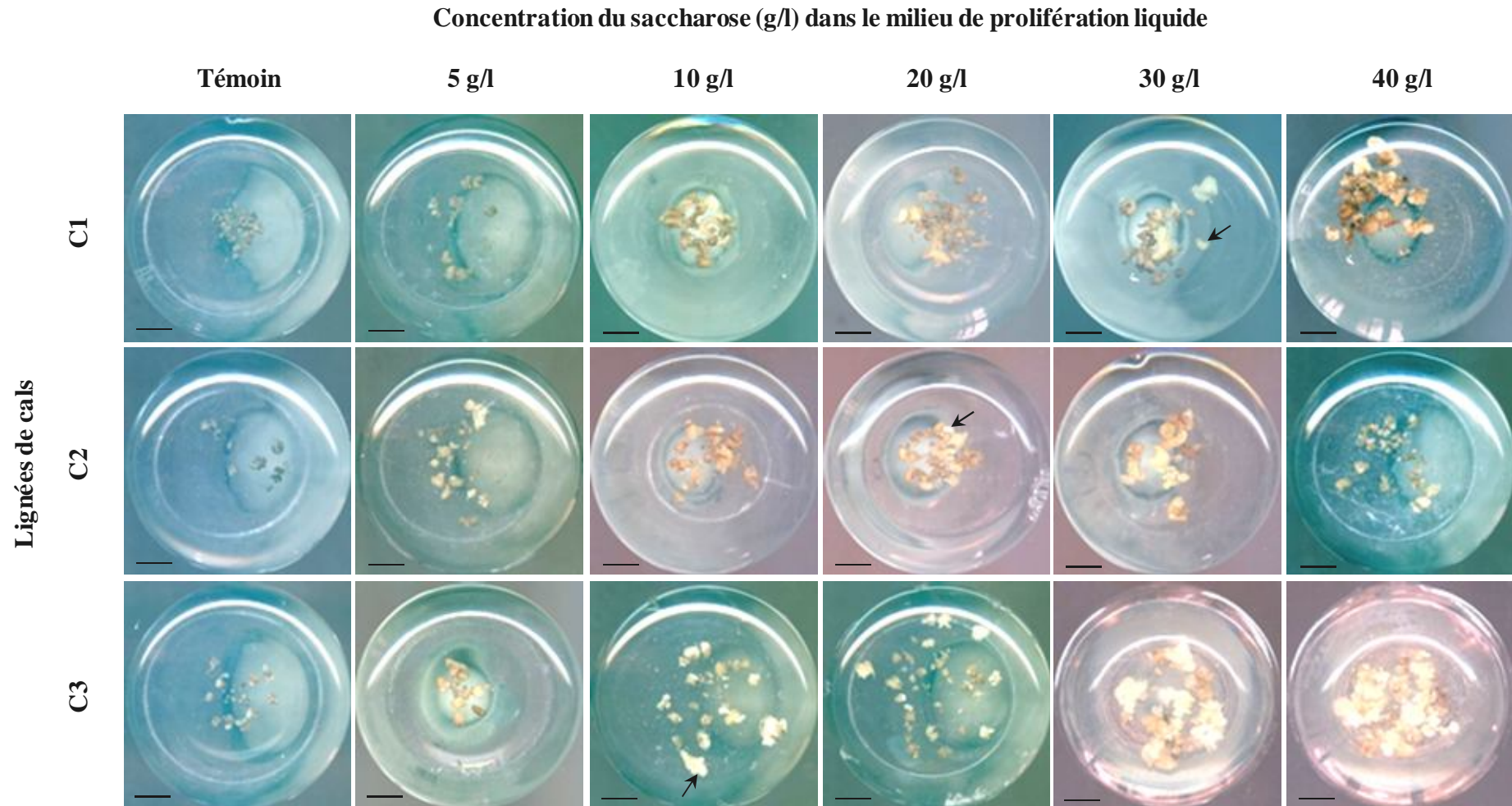


Planche 16 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur le milieu ECO liquide en présence de différentes concentrations de saccharose. (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires et les structures embryogènes, Barre correspond à 1 cm).

1.2.1.4. Effet de l'addition du charbon actif (CA)

La présence du charbon actif dans le milieu de culture améliore significativement la prolifération cellulaire du cal embryogène d'olivier. En effet, l'accroissement du poids frais des cals des trois lignées cultivées en présence du charbon actif est nettement amélioré par rapport au témoin sans CA et ce indépendamment de la nature du milieu de prolifération. Toutefois, la culture en suspension favorise une meilleure prolifération que sur le milieu solide (Figure 5, Annexe 1b).

Sur le milieu solide, les meilleurs résultats de croissance des cals sont obtenus en présence de 0.5 g de CA pour C1 et C2 avec 0.34 et 0.25 g d'accroissement respectivement, alors que l'addition de 1 g de CA permet plus de prolifération pour C3 avec 0.19 g (Figure 5 A). De même, une corrélation positive ($r = 0.90$) est révélée entre l'accroissement du poids frais et la concentration du CA dans le milieu liquide permettant 0.35, 0.25 et 0.32 g d'accroissement respectivement pour les trois lignées en présence de 1 g de CA (Figure 5 B).

Par ailleurs, l'addition du charbon actif au milieu de culture améliore non seulement la capacité de prolifération (accroissement du poids frais) du cal (Figure 5) mais aussi ses caractéristiques qualitatives essentiellement sa capacité d'expression embryogène (Planche 17). En effet, la présence du CA réduit nettement la nécrose des masses embryogènes à un léger brunissement particulièrement sur milieu solide. De même, la friabilité du cal et l'apparition de structures embryogènes assez développées (embryons somatiques aux stades torpide et cotylédonaire) sont significativement améliorés. Toutefois, le CA additionné en culture liquide tend à se coller aux amas cellulaires nouvellement produites (Planche 17 Milieu liquide).

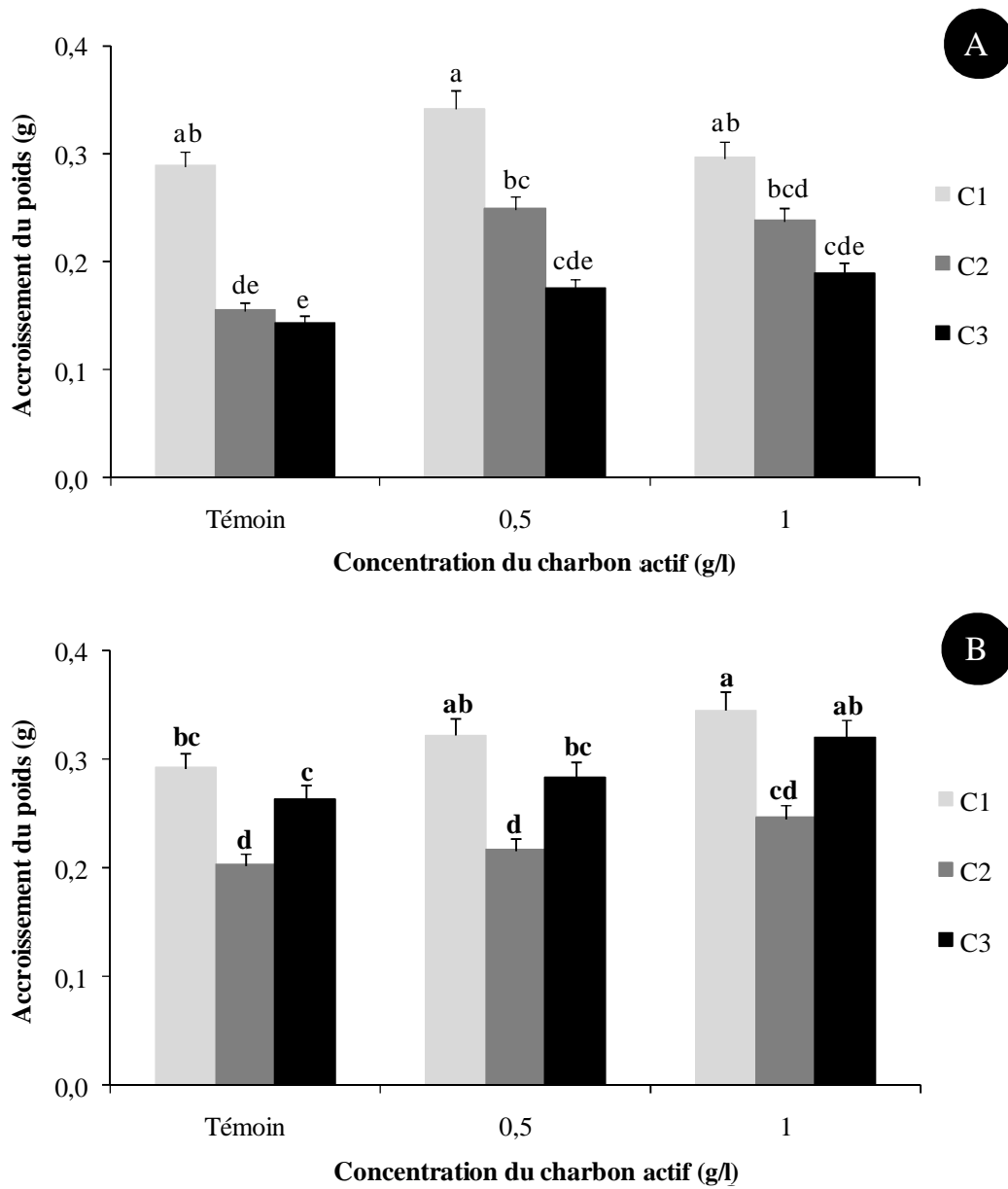


Figure 5. Effet de l'addition du charbon actif au milieu de prolifération ECO solide (A) et liquide (B) sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal.

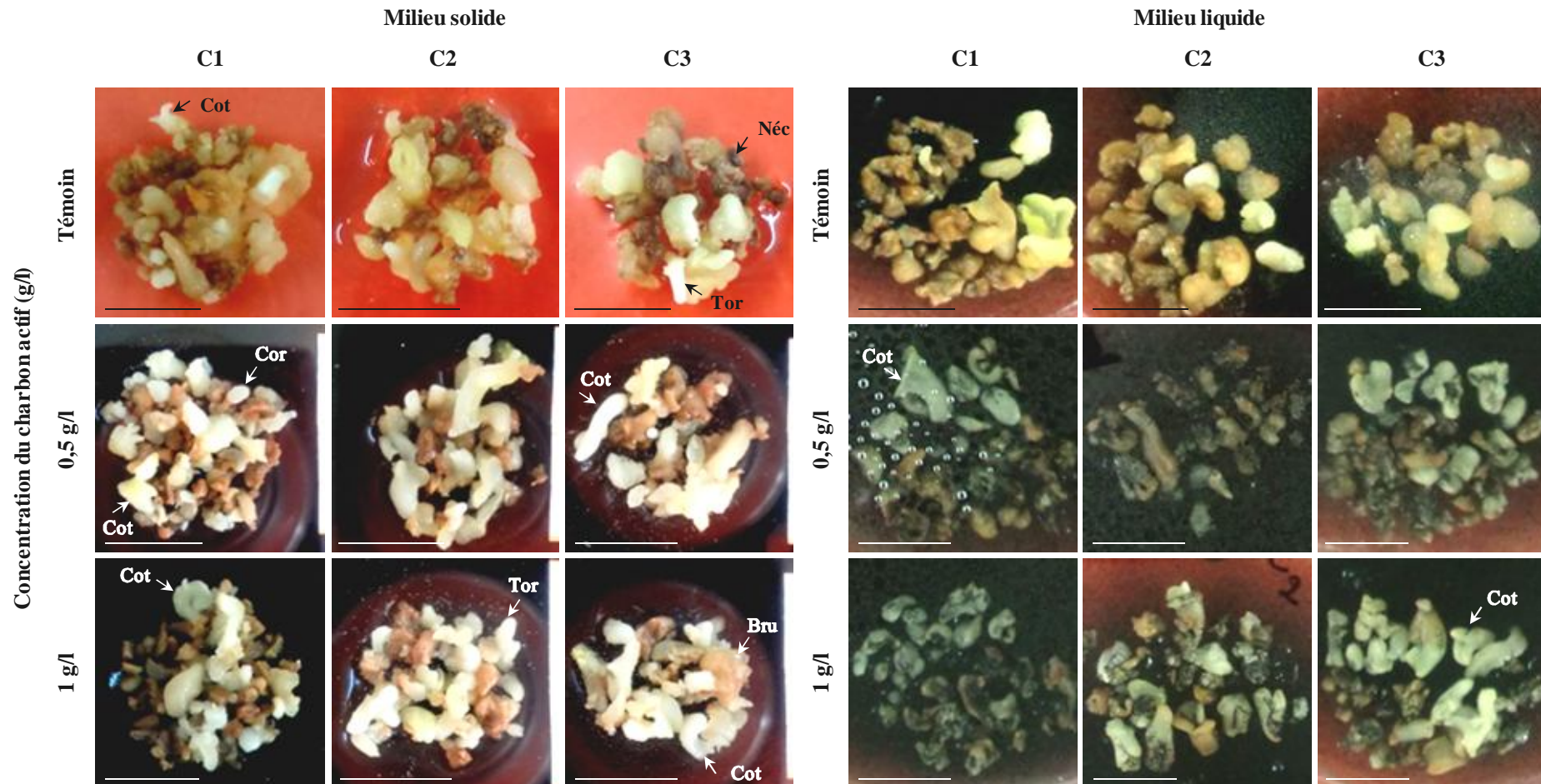


Planche 17 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur milieu ECO solide et liquide en présence de différentes concentrations du charbon actif. (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires et les structures embryogènes, Barre correspond à 1 cm). (Abréviations : **Bru** : Brunissement, **Cor** : Embryon somatique au stade **cordiforme**, **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**, **Néc** : Nécrose, **Tor** : Embryon somatique au stade **torpide**).

1.2.1.5. *Effet de la durée d'incubation des cultures*

La durée d'incubation sur le milieu de culture influence fortement la capacité de prolifération des cals. L'analyse des résultats révèle une corrélation positive entre l'accroissement du poids frais et la durée d'incubation (Figure 6 A et B, Planches 18 et 19, Annexe 1b) notamment sur milieu solide ($r = 0.95$) qu'en culture liquide ($r = 0.94$). Par conséquent, les meilleurs résultats sont enregistrés après 14 semaines sur le milieu solide avec 1.3, 1.1 et 0.47 g respectivement pour les lignées C1, C2 et C3 (Figure 6 A, Planche 18) tandis que 0.3, 0.2 et 0.29 g d'accroissement sont obtenus après 4 semaines de culture en suspension (Figure 6 B, Planche 19). Par ailleurs, la vitesse de prolifération des cals augmente dès les deux premières semaines pour atteindre son maximum après 6 semaines sur milieu solide avec 0.11, 0.10 et 0.04 g/semaine (Figure 6 C, Annexe 1b) et entre la 3^{ème} et 4^{ème} semaine en culture liquide avec 0.08, 0.05 et 0.07 g/semaine respectivement pour les trois lignées (Figure 6 D, Annexe 1b). Cependant, des périodes excédant 8 à 10 semaines sur milieu solide et 3 à 4 semaines en suspension provoquent le brunissement des masses cellulaires et la génération de structures embryogènes assez différenciées (stade cotylédonaire) avec une forte capacité d'embryogenèse somatique secondaire. Inversement, les courtes durées de culture permettent la formation de plusieurs globules sur des amas cellulaires moins nécrosées (Planches 18 et 19).

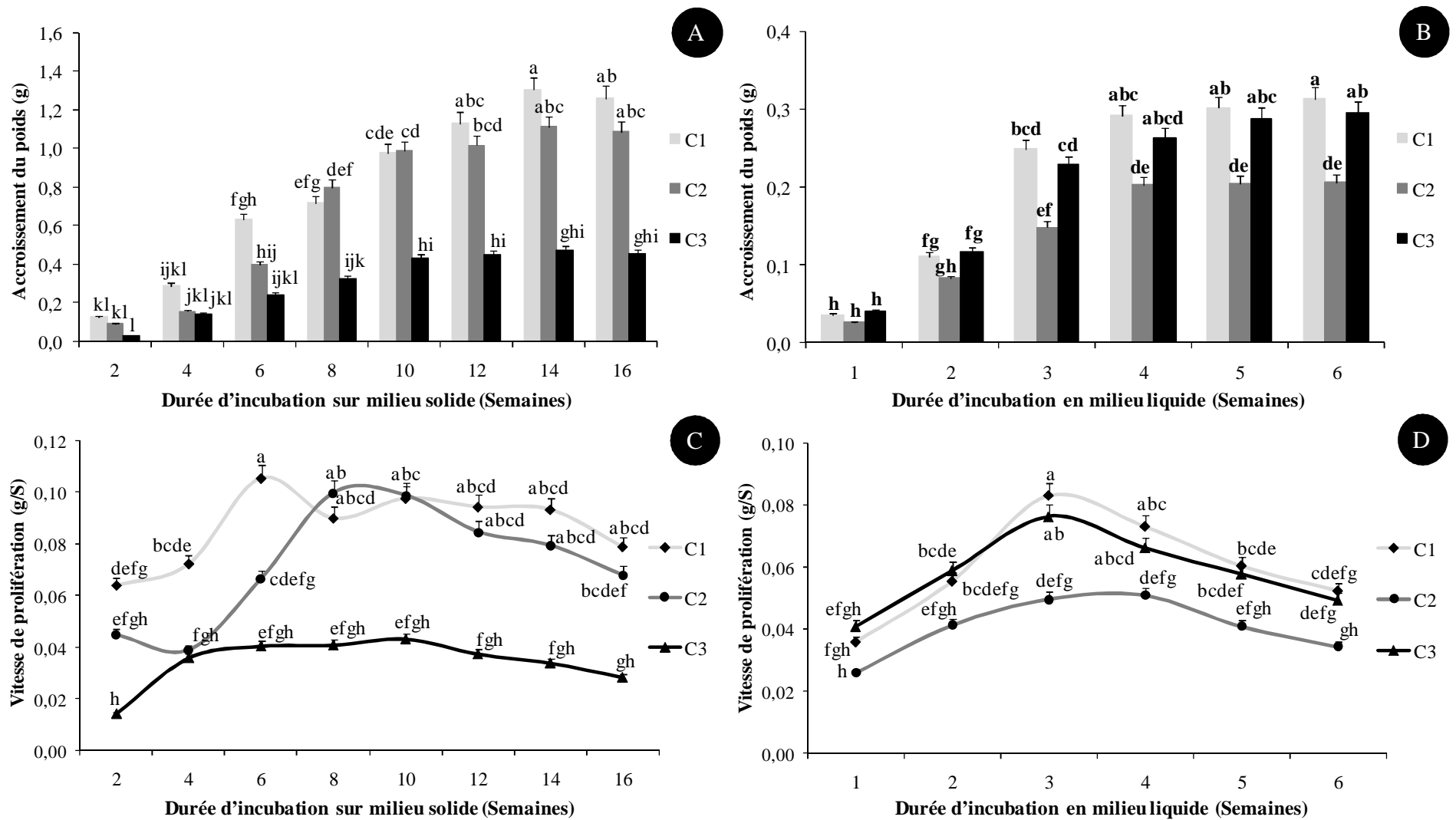


Figure 6. Effet de la durée d'incubation des cultures en milieu de prolifération ECO solide et liquide sur l'accroissement du poids frais (A et B) et la vitesse de prolifération (C et D) des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal.

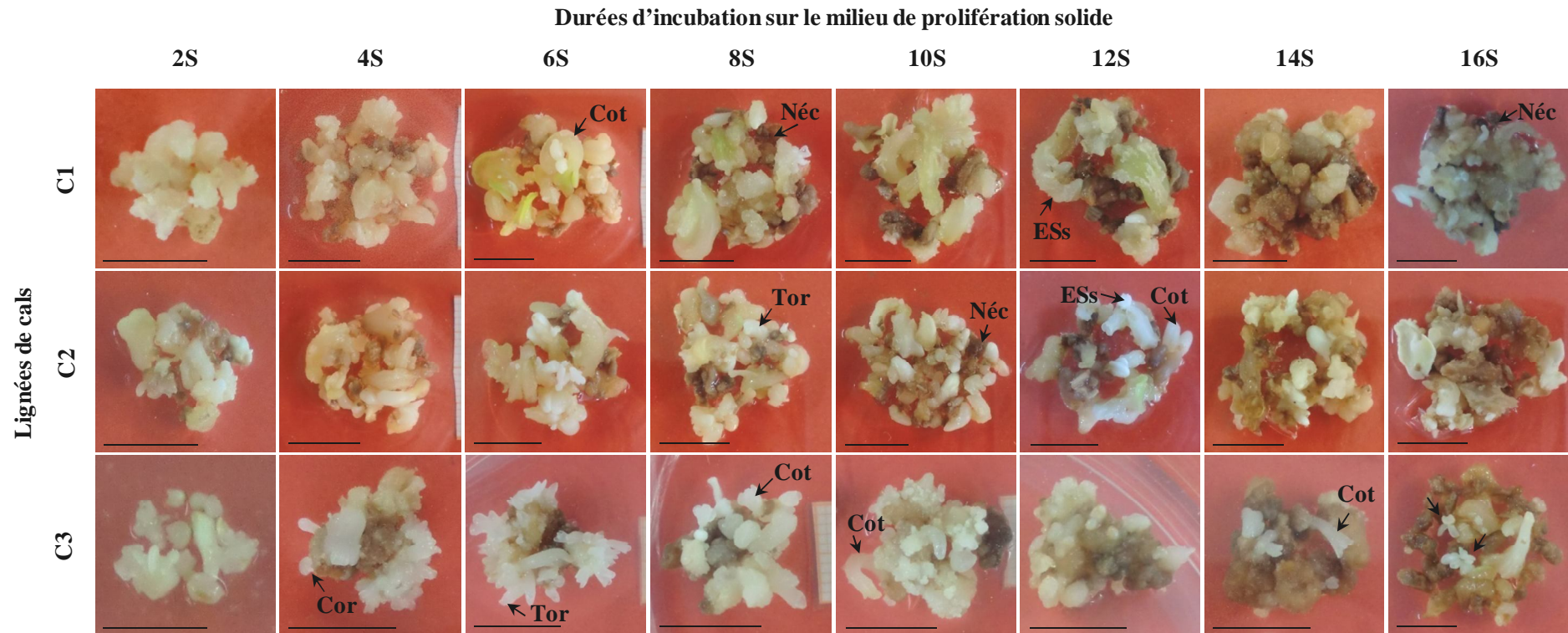


Planche 18 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après différentes durées d'incubation sur le milieu ECO solide. (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires et les structures embryogènes, Barre correspond à 1 cm). (Abréviations : **Cor** : Embryon somatique au stade **cordiforme**, **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**, **ESs** : Embryogenèse somatique secondaire, **Néc** : Nécrose, **Tor** : Embryon somatique au stade **torpide**).

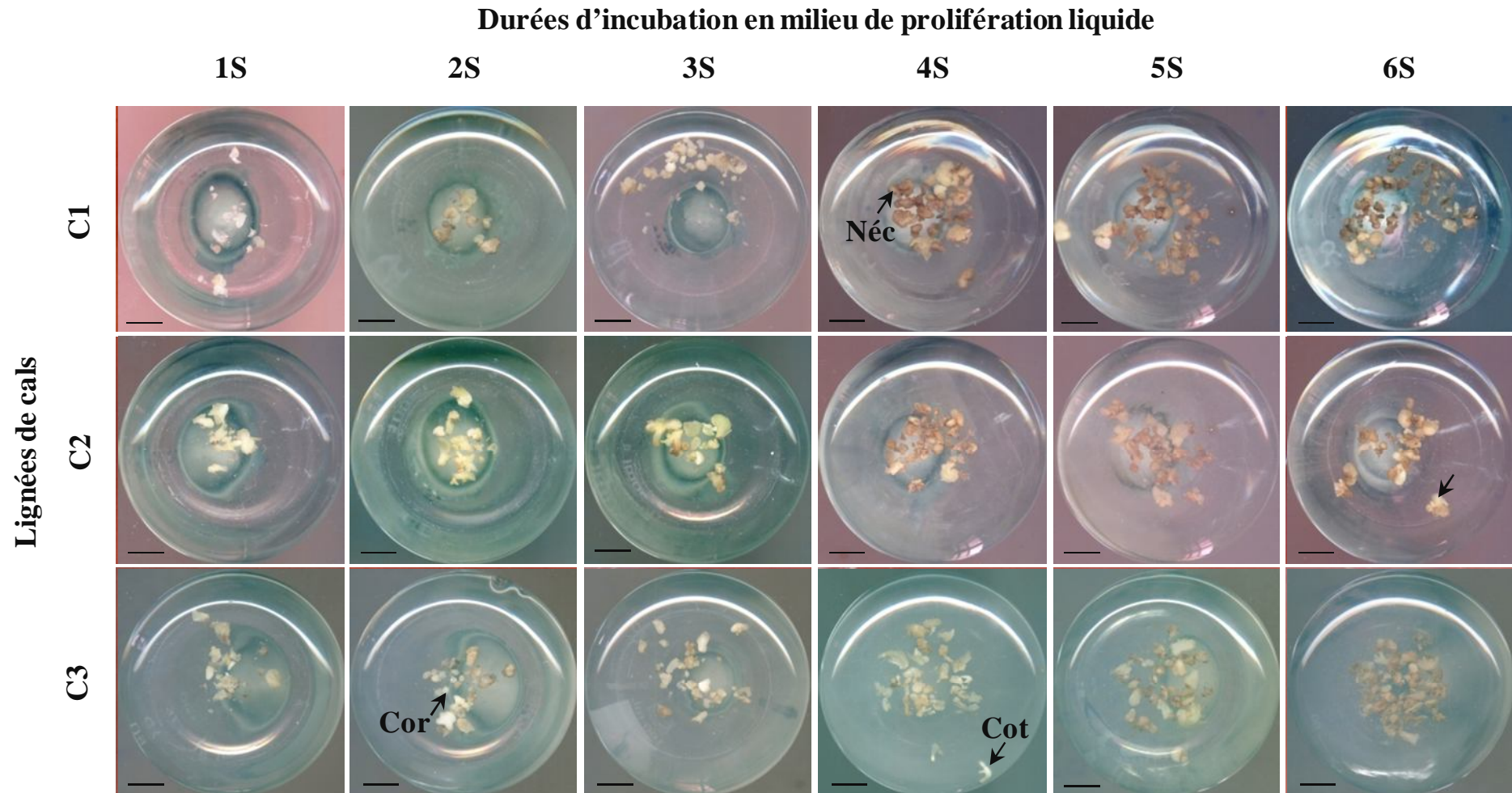


Planche 19 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après différentes durées d'incubation sur le milieu ECO liquide. (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires et les structures embryogènes, Barre correspond à 1 cm). (Abréviations : **Cor** : Embryon somatique au stade **cordiforme**, **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**, **Néc** : Nécrose).

1.2.2. Production d'embryons somatiques

Après un mois sur ECO liquide, l'accroissement du poids frais, le nombre moyen d'embryons récupérés ainsi que leur degré de développement varient d'une lignée de cal à une autre (Tableau 7, Annexe 1c). En effet, les lignées C2 et C3 malgré leurs faibles accroissements de poids frais (1.01 et 1.32 g) ; elles produisent plus d'embryons (72.3 et 56 embryons/gmf) suffisamment différenciés (stades torpide et cotylédonaire), en comparaison avec la lignée C1 ayant produit 33.3 embryons/gmf généralement aux stades globulaire ou cordiforme (Tableau 7, Planche 20 a-f).

Le développement des embryons somatiques varie d'une lignée de cal à une autre (Planche 20 g et h). Les premières phases de l'expression embryogène (globulaire et cordiforme) sont observées durant les premières semaines de mise en culture des masses embryogènes (Planche 20 i et j) tandis que les autres étapes du développement des embryons en torpide (Planche 20 k et l) ou cotylédonaire parfait où l'embryon est prêt à la mise en germination (Planche 20 m) n'apparaissent qu'après plus de 6 ou 8 semaines d'incubation.

Tableau 7 : Nombre moyen et stades de développement des embryons somatiques immatures produits par gramme de matière fraîche après 4 semaines de culture en milieu liquide sous agitation de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal*.

Lignées de cals embryogènes	Accroissement du poids frais (g)	Nombre moyen d'ES produits par gmf	Stades de développement des embryons**			
			Globulaire	Cordiforme	Torpide	Cotylédonaire***
C1	1.46±0.3 a	33.3±5.8 c	+++	++	-	-
C2	1.01±0.2 b	72.3±6.0 a	++	++	+++	++
C3	1.32±0.1 ab	56.0±4.6 b	+	++	+++	++

* : les différentes lettres en minuscule du même format (Non gras sans accent « a », En gras sans accent « a ») indiquent les groupes homogènes d'une différence significative à un seuil de 5%.

** : les stades de développement des ES sont relatifs à leur fréquence d'apparition après plus de deux mois de culture sur milieu solide.

*** : le stade cotylédonaire est observé beaucoup plus sur milieu solide tandis que les autres stades sont présents même en culture liquide.

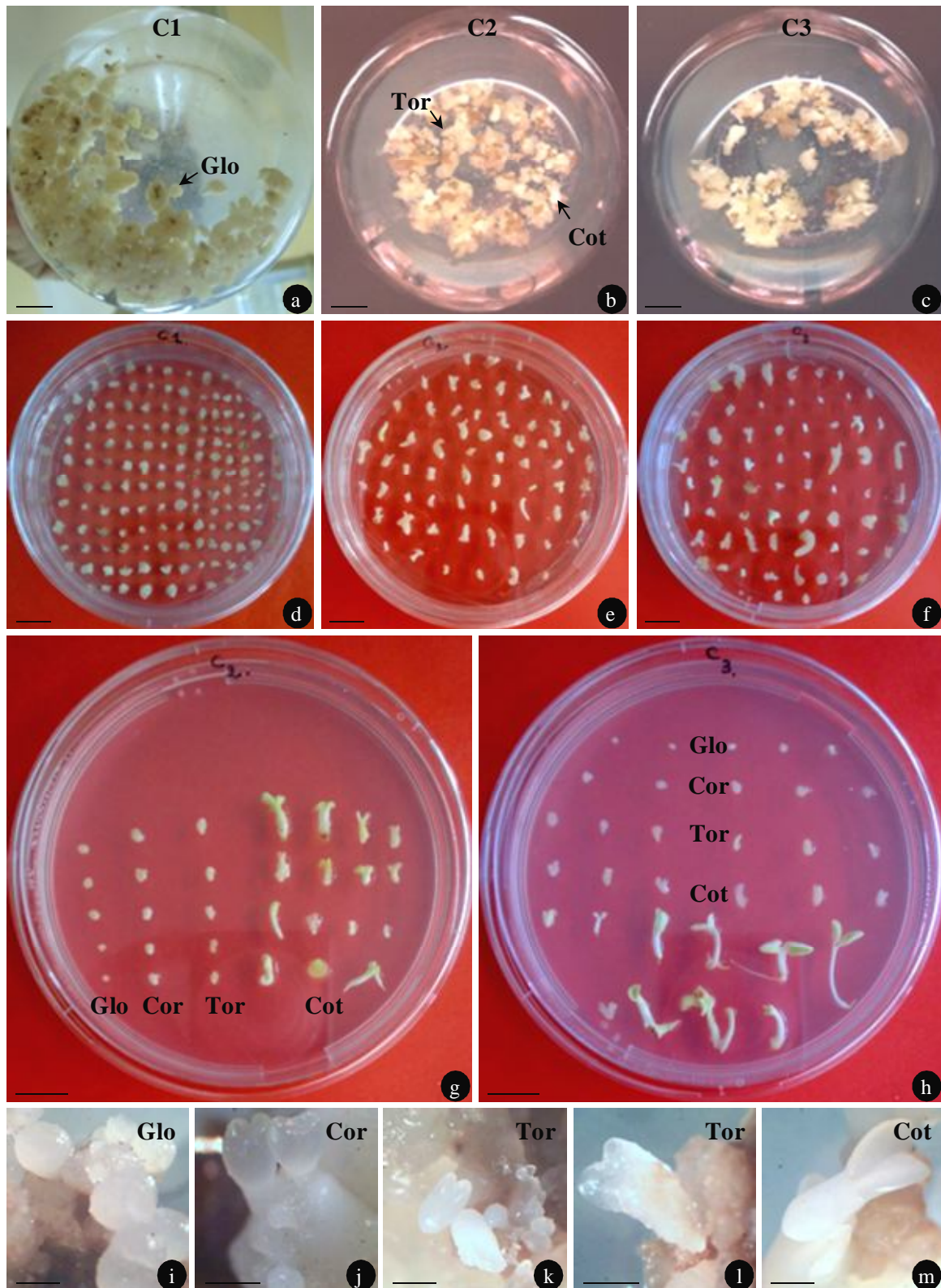


Planche 20 : Aspect des différentes lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 4 semaines de culture sur milieu ECO liquide et embryons somatiques récupérés par chaque lignée à différents stades de développement. (→ : les flèches indiquent les nouvelles proliférations cellulaires et les structures embryogènes, Barre correspond à 1 cm sauf pour i, j, k, l et m la barre correspond à 0.1 cm). (Abréviations : **Glo** : Embryon somatique au stade **globulaire**, **Cor** : Embryon somatique au stade **cordiforme**, **Tor** : Embryon somatique au stade **torpide**, **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**).

1.2.3. Différenciation et maturation des embryons somatiques

La différenciation et la maturation des embryons somatiques varient significativement entre les lignées étudiées (Tableau 8, Planche 21, Annexe 1d). En effet, près de 15% des pro-embryons de la lignée C1 se nécrosent par rapport aux deux autres lignées présentant 7.4% de brunissement. L'analyse statistique des résultats ne révèle aucune différence significative (Planche 21 a-b et c). Cependant, ce sont les explants de C1 qui prolifèrent davantage (74.1%) en comparaison à C2 et C3 avec respectivement 44.4 et 48.1% (Tableau 8). De même, 48.1 et 44.4% des pro-embryons respectivement des lignées C2 et C3 se sont différenciés en embryons matures (Planche 21 d-e et f) en produisant en moyenne 1.3 et 2.6 embryons matures (Tableau 8, Planche 21 g-h et i). Néanmoins, le faible taux de différenciation embryonnaire (11.1%) enregistré chez la lignée C1 a abouti, ainsi, à récupérer moins d'embryons somatiques matures après 8 semaines d'incubation (Tableau 8, Annexe 1d).

Par ailleurs, le maintien des trois lignées de cal sur le milieu de prolifération durant plus de deux mois permet l'isolement d'un grand nombre d'embryons somatiques de différents stades de développement. Les ES isolés chez la lignée C1 sont généralement aux premiers stades de l'embryogenèse (globulaire et cordiforme) (Planche 21 j) tandis que les ES de C2 et C3 présentent une maturité avancée (stades torpide et bipolaire ou cotylédonaire) aptes à la mise en germination (Planche 21 k et l).

Tableau 8 : Nécrose, prolifération, différenciation et nombre moyen d'embryons somatiques matures récupérés à partir d'embryons somatiques immatures (pro-embryons) de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de maturation sur le milieu ECO solide sans hormones et avec du charbon actif*.

Lignées de cals embryogènes	Nécrose (%)	Prolifération (%)	Différenciation (%)	Nombre moyen d'ES produits
C1	14.8 a	74.1 a'	11.1 b	1.0±0.0 c'
C2	7.4 a	44.4 b'	48.1 a	1.3±0.2 b'
C3	7.4 a	48.1 b'	44.4 a	2.6±0.4 a'

* : les différentes lettres en minuscule du même format (Non gras sans accent « a », Non gras avec un seul accent « a' », En gras sans accent « a », En gras avec un seul accent « a' ») indiquent les groupes homogènes d'une différence significative à un seuil de 5%.

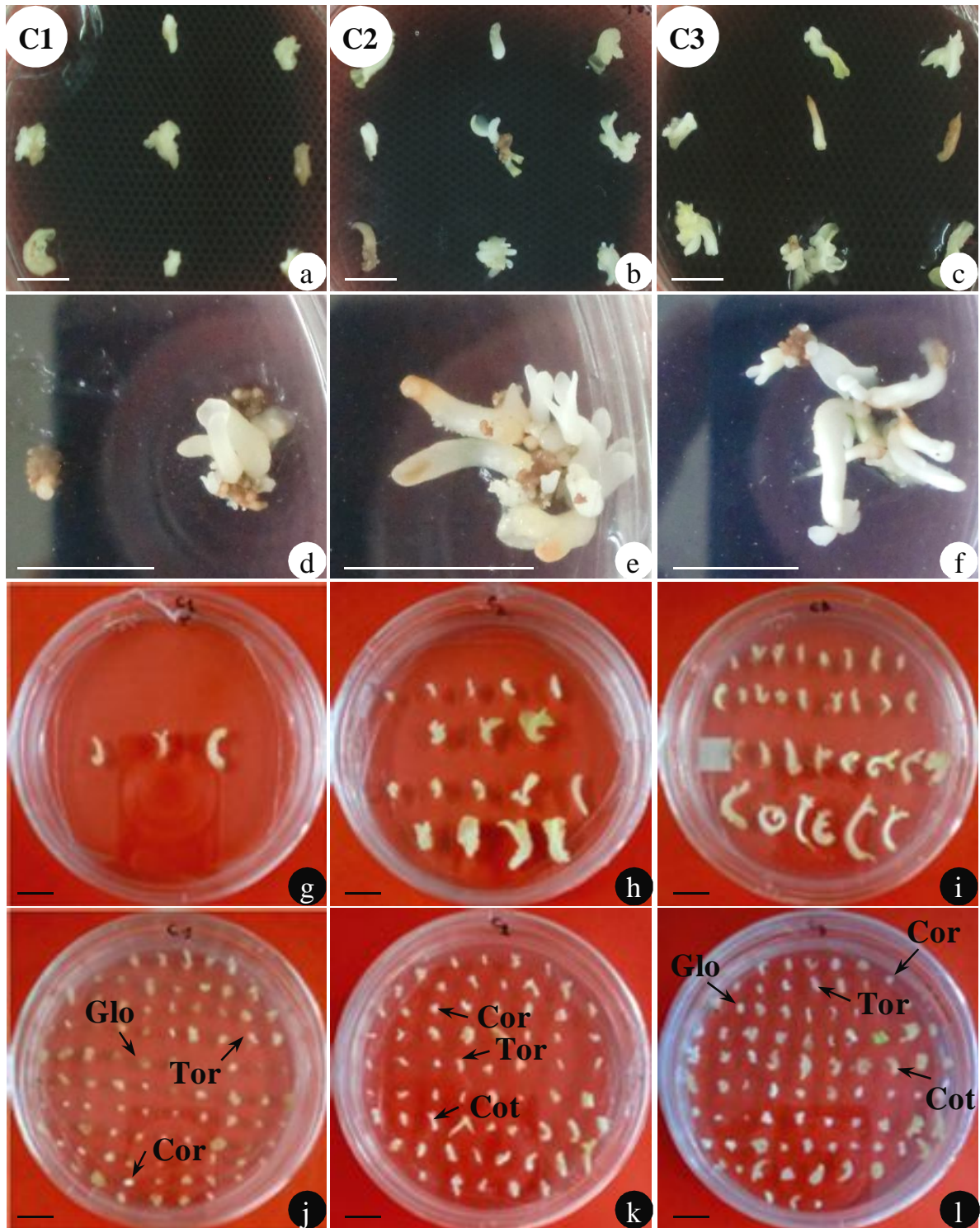


Planche 21 : Maturation des pro-embryons des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture sur milieu ECO solide avec du charbon actif et embryons somatiques récupérés de chaque lignée. (→ : les flèches indiquent les stades de développement des ES sur milieu de maintien, Barre correspond à 1 cm). (Abréviations : **Glo** : Embryon somatique au stade **globulaire**, **Cor** : Embryon somatique au stade **cordiforme**, **Tor** : Embryon somatique au stade **torpide**, **Cot** : Embryon somatique au stade **cotylédonaire**).

Conclusion partielle (Évaluation de la capacité embryogène des cals)

Le potentiel embryogène de certaines lignées de cals d'olivier obtenues est évalué par leur capacité de prolifération et de production de structures embryogènes sur un milieu solide ou liquide après un mois d'incubation, en plus de la différenciation et maturation de leurs embryons somatiques. Pour ce faire, l'influence de plusieurs facteurs est étudiée. Les résultats obtenus indiquent que :

- La prolifération cellulaire diffère d'une lignée à une autre et selon les conditions de culture. En effet, le milieu ECO permet d'obtenir un meilleur accroissement du poids frais et une bonne expression embryogène avec moins de nécrose cellulaire par rapport aux autres milieux testés (OM et MS), et ce en milieu solide ou liquide.
- La présence d'hormones est indispensable pour la prolifération cellulaire des cals. En outre, l'addition d'AIB combinée avec la Zéatine et BAP au milieu ECO solide et notamment liquide permet un bon accroissement du poids frais et développement de masses embryogènes en comparaison avec les autres balances hormonales testées.
- La concentration de saccharose comme source de carbone dans le milieu de culture affecte significativement la capacité embryogène des différentes lignées évaluées. Les meilleures réponses de prolifération sont obtenues avec les concentrations dépassant 20 g l⁻¹ de sucre particulièrement en culture liquide.
- L'addition du charbon actif au milieu de prolifération notamment liquide à une concentration maximale de 1 g l⁻¹ améliore non seulement l'accroissement du poids frais du cal mais aussi sa texture et sa capacité à former des structures embryogènes.
- La durée d'incubation des cultures favorise la prolifération cellulaire des cals. Toutefois, les cultures étalées dépassant 6 à 8 semaines sur milieu solide ou 3 à 4 semaines en culture liquide réduisent la vitesse d'accroissement à cause d'un fort brunissement des masses cellulaires en dépit de l'apparition de structures embryogènes assez développées.
- La production d'embryons somatiques immatures ainsi que leur maturation et différenciation vers des stades de développement avancé, diffèrent d'une lignée à une autre et dépendent non seulement des conditions de culture mais beaucoup plus de la capacité de prolifération, degré de nécrose ainsi que la texture de la lignée évaluée.

1.2.4. Germination des embryons somatiques et régénération de plantules

Les résultats obtenus de la mise en germination des embryons somatiques de deux lignées (C2 et C3) de cal embryogène d'olivier sur deux milieux (OM ou MS) solides ou liquides avec ou sans régulateurs de croissance sont présentés dans le Tableau 9.

- **Germination**

La germination des embryons somatiques d'olivier diffère d'une lignée à une autre et elle est significativement influencée par les conditions de culture, et plus particulièrement par la présence des régulateurs de croissance. En effet, les embryons de la lignée C2 germent 12.5 à 18.8% plus que ceux de C3 sur les milieux OM alors que la germination des deux lignées est similaire sur les milieux MS. De plus, la germination des ES des deux lignées est meilleure sur le milieu OM que sur MS, tandis que la présence d'hormones permet une amélioration significative de la germination. Par conséquent, les meilleurs taux de germination sont obtenus sur le milieu OM additionné d'hormones (OM-S₁) pour les deux lignées avec 56.3 et 37.5% respectivement pour C2 et C3, alors que les plus faibles taux de germination (25 et 18.8%) sont enregistrés sur MS liquide dépourvu d'hormones (MS-L₀) (Tableau 9, Annexe 1e).

Par ailleurs, dès les premiers jours de culture sous photopériode, les embryons somatiques blanc-opaques montrent un verdissement de la partie caulinaire ou cotylédonaire et un jaunissement de la radicule (Planche 22 a) suivi par son élongation précédant l'augmentation de la taille des deux feuilles cotylédonaires et leur séparation l'une de l'autre (Planche 22 b et c) avant l'émergence d'une petite pousse (Planche 22 d). De plus, une callogenèse basale accompagnée d'une rhizogenèse est observée chez les plants obtenus sur les milieux solides additionnés d'hormones (Planche 22 j).

- **Durées moyennes de germination et d'émergence de la racine**

Les embryons somatiques de la lignée C2 commencent à émettre leurs racines dès la 1^{ère} semaine avec une moyenne après 10.5 à 21 jours et entrent en germination après 14 à 24.5 jours d'introduction (Planche 22 a) alors que la germination des ES de C3 commence après 17.5 à 24.5 jours suivant une émergence racinaire après 10.5 à 18.7 jours (Tableau 9, Planche 22 e). En effet, les embryons des deux lignées s'enracinent et germent plus rapidement sur les milieux OM que MS notamment en présence d'hormones qui accélèrent la germination des

embryons. De plus, les ES de C2 germent et s'enracinent plus rapidement sur les milieux OM solides et MS liquides alors que le milieu OM liquide est plus bénéfique pour les embryons de C3. Par ailleurs, les embryons somatiques mis en culture sur les milieux solides émettent leurs racines 3 à 5 jours avant le début de germination tandis que les racines des embryons introduits sur milieu liquide émergent après plus d'une semaine avant l'entrée en germination (Tableau 9, Annexe 1e).

- **Développement des vitroplants obtenus**

Le développement des vitroplants issus de la germination des embryons somatiques est significativement influencé par les conditions de culture notamment la présence d'hormones (Tableau 9, Annexe 1e). En effet, la germination et l'enracinement précoces des embryons de C2 sur les milieux OM-S₁ et OM-L₁ aboutissent à des vitroplants bien développés avec une taille moyenne de 2.3 et 1.4 cm et un nombre plus élevé de feuilles de 6.3 et 3.7 respectivement (Planche 22 f et g). De même, un bon développement chez les vitroplants de C3 est observé sur les milieux MS-S₁ et OM-L₁ avec une taille moyenne de 1.9 et 1.6 cm et un nombre de feuilles de 4.5 et 4.3 respectivement pour les deux milieux (Planche 22 h et i).

- **Acclimatation des vitroplants obtenus**

Les vitroplants obtenus et présentant une taille acceptable (plus de 2 cm) avec plusieurs feuilles (4 à 6) bien développées (Planche 22 j) sont acclimatés au niveau du laboratoire pendant environ deux mois sur un mélange humidifié de sable/terreau/perlite (Planche 22 k). Par la suite, les plantules réactives sont transférées en conditions naturelles sous serre sur un mélange de terre riche en matière organique et du terreau. Les plantules ainsi acclimatées sous serre ont montré une croissance et une morphologie normales sans aucune anomalie ou malformation (Planche 22 l). Les plants sont ensuite transférés définitivement en plein champ lorsque les racines deviennent très actives et bien développées (Planche 22 m).

Tableau 9 : Effet du milieu (OM et MS), type de culture (solide 'S' et liquide 'L') et présence d'hormones (sans hormones '0' ou avec hormones '1') sur la germination et le développement de plantules à partir des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après huit semaines de culture*.

Milieu / type de culture et présence d'hormones dans le milieu de germination	Germination (%)		Durée moyenne de germination (Jours)		Durée moyenne d'émergence de la racine (Jours)		Taille moyenne du vitroplant (cm)		Nombre moyen de feuilles par vitroplant	
	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3
OM-S₀	50.0 ab	31.3 de	16.8±3.8 b'	21.0±0.0 de'	12.3±3.5 ab''	17.5±4.9 de''	1.6±0.1 c	0.6±0.1 jk	6.0±1.6 a'	2.0±0.0 gh'
OM-S₁	56.3 a	37.5 cd	14.0±4.4 a'	18.7±4.0 bc'	10.5±4.0 a''	15.4±3.1 cd''	2.3±0.8 a	0.9±0.2 gh	6.3±1.6 a'	2.3±0.6 fg'
OM-L₀	37.5 cd	25.0 ef	18.7±4.0 bc'	18.7±4.0 bc'	11.7±4.0 a''	11.7±4.0 a''	0.8±0.1 hi	1.4±0.1 ef	2.7±0.6 ef'	3.5±0.7 cd'
OM-L₁	43.8 bc	31.3 de	18.7±4.0 bc'	17.5±4.9 bc'	11.2±3.8 a''	10.5±4.0 a''	1.4±0.1 de	1.6±0.2 cd	3.7±1.2 c'	4.3±1.5 b'
MS-S₀	25.0 ef	25.0 ef	24.5±4.9 f'	21.7±1.2 e'	21.0±0.0 f''	18.7±4.0 e''	0.8±0.1 hij	0.8±0.1 hij	2.5±0.7 efg'	2.0±0.0 gh'
MS-S₁	31.3 de	31.3 de	21.0±0.0 de'	19.3±4.7 cd'	17.5±0.7 de''	16.3±4.0 d''	0.9±0.1 gh	1.9±0.1 b	2.5±0.7 efg'	4.5±0.7 b'
MS-L₀	25.0 ef	18.8 f	21.0±5.7 de'	24.5±4.9 f'	14.0±5.7 bc''	17.5±4.9 de''	1.0±0.0 g	0.5±0.0 k	2.5±0.7 efg'	1.5±0.5 h'
MS-L₁	25.0 ef	25.0 ef	19.3±3.5 cd'	21.0±0.0 de'	12.3±3.5 ab''	14.0±0.0 bc''	1.2±0.1 f	0.6±0.1 ijk	3.0±0.0 de'	2.0±0.0 gh'

* : les différentes lettres en minuscule du même format (Non gras sans accent « a », Non gras avec un seul accent « a' », Non gras avec deux accents « a'' », En gras sans accent « a », En gras avec un seul accent « a' ») indiquent les groupes homogènes d'une différence significative à un seuil de 5%.

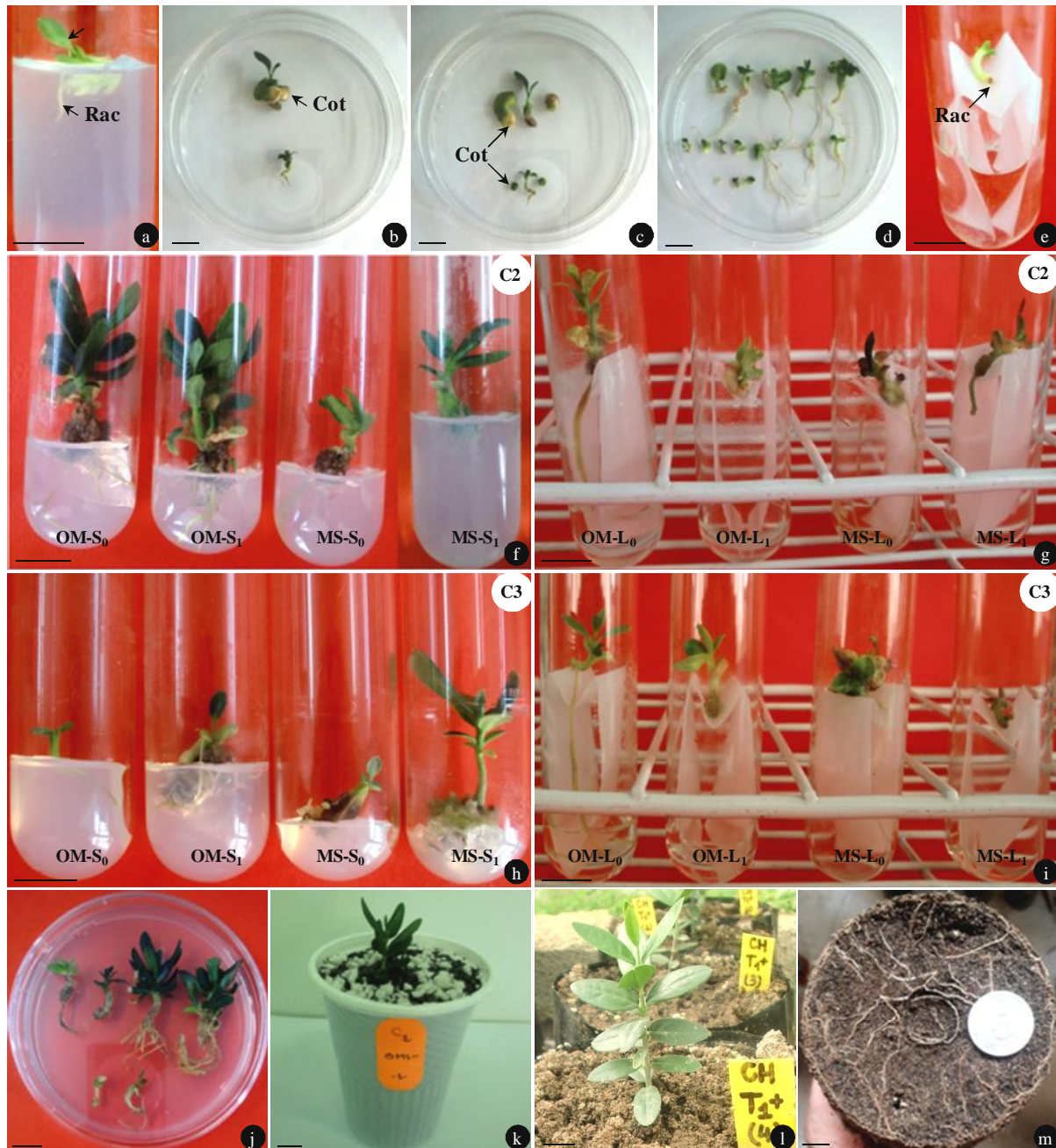


Planche 22 : Germination des embryons somatiques matures de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture sur milieux OM ou MS solides (S) ou liquides (L) en présence ou absence d'hormones (0 ou 1). **a.** Embryon somatique germé sur milieu solide. **b** et **c.** Gonflement des feuilles cotylédonaires des ES. **d.** Différents stades de germination des ES. **e.** Embryon somatique sur milieu liquide. **f, g, h** et **j.** Vitroplants obtenus de la germination des ES sur les différents milieux. **k, l** et **m.** Acclimatation des vitroplants obtenus (→ : les flèches indiquent l'émergence de la racine et de la pousse ainsi que les deux feuilles cotylédonaires, Barre correspond à 1 cm). (Abréviations : **Cot** : Cotylédons, **Rac** : Racine).

1.2.5. Micropropagation des pousses issues des embryons somatiques

Les résultats obtenus de la micropropagation des pousses issues de la germination des embryons somatiques de deux lignées de cal embryogène d'olivier sur deux milieux solides (OM ou DKW) avec ou sans hormones sont présentés dans les tableaux 9 et 10.

a. Débourrement des microboutures et développement des pousses obtenues

- **Débourrement des microboutures**

La micropropagation des pousses est significativement influencée par la lignée du cal, le milieu de culture ainsi que la présence d'hormones. En effet, les microboutures de la lignée C2 sont plus réactives que celles de C3. Par ailleurs, la présence de régulateurs de croissance est essentielle pour la réactivité des explants des deux lignées. Par conséquent, les meilleurs résultats de débourrement (100%) des deux lignées sont obtenus avec la balance Zéatine/AIB alors que la combinaison BAP/AIB ne permet que 62.5 et 87.5% de débourrement chez les boutures de C3 respectivement sur les milieux OM et DKW. En outre, les plus faibles débourrements sont enregistrés sur le milieu DKW sans hormones avec 18.8 et 12.5% respectivement pour les deux lignées (Tableau 10, Planche 23, Annexe 1f).

- **Nombre moyen de bourgeons débourrés**

La capacité de débourrement des microboutures estimée par le nombre moyen de bourgeons débourrés est fortement influencée par la lignée ainsi que les conditions de culture particulièrement la présence d'hormones. En effet, les microboutures des deux lignées présentent plus de bourgeons réactifs sur le milieu DKW que sur OM. Par conséquent, les meilleurs résultats sont enregistrés sur DKW additionné d'hormones avec 2 et 1.8 bourgeons débourrés respectivement pour C2 et C3, tandis que les explants mis en culture sur les témoins restent les moins réactifs avec 1 bourgeon débourré en moyenne (Tableau 10, Planche 23, Annexe 1f).

- **Durée moyenne nécessaire pour le débourrement des microboutures**

La durée moyenne de débourrement est significativement influencée par le génotype, le milieu de culture mais surtout par la présence des hormones. En effet, les boutures de C2 réagissent plus rapidement que celles de C3 avec un écart pouvant atteindre 5 jours comme c'est le cas sur le milieu OM additionné de Zéatine/AIB. Par ailleurs, le milieu DKW permet

un débourrement plus avancé avec un écart variant de 1 à 4 jours pour C2 et jusqu'à 5 jours pour C3 par rapport aux milieux OM respectifs. Par conséquent, les meilleurs résultats d'entrée en débourrement sont obtenus sur le milieu DKW contenant la Zéatine/AIB avec 16 et 17 jours respectivement pour les deux lignées alors que les boutures mises en culture sur les témoins mettent plus de 7 semaines pour réagir (Tableau 10, Annexe 1f).

- **Développement des pousses obtenues**

Les conditions de culture ainsi que le nombre de bourgeons réactifs influencent directement le développement des pousses qui en dérivent. Généralement une pousse se développe plus que l'autre chez les boutures ayant deux bourgeons réactifs (Planche 23). De plus, les boutures mises en culture sur OM additionné de Zéatine/AIB produisent après huit semaines des pousses bien développées d'une taille de 3.7 et 5.2 cm respectivement pour C2 et C3 avec 6.9 et 9.9 feuilles en moyenne tandis que les pousses issues sur les milieux témoins sont les moins développées. En outre, l'analyse des données révèle une corrélation négative entre la durée d'entrée en débourrement et la taille des pousses ($r = -0.68$) et le nombre de feuilles ($r = -0.63$) (Tableau 10, Planche 23, Annexe 1f).

b. Callogenèse basale et enracinement des microboutures

- **Callogenèse basale et taille des cals**

La culture des microboutures sur le milieu de propagation induit non seulement leur débourrement mais aussi la formation d'un cal à la base des explants accompagnée ou non de l'émission de racines. En effet, la présence d'hormones est indispensable pour la callogenèse basale du fait que sur les milieux témoins dépourvus d'hormones le taux de callogenèse est de 12.5 et 6.3% respectivement pour C2 et C3 sur OM alors que uniquement 6.3% des explants forment des cals sur DKW. Cependant, la taille du cal est en relation avec la lignée ainsi que le milieu de culture car la majorité des cals formés sur OM avec hormones sont de taille moyenne ou grande tandis que sur DKW leur taille était plus ou moins petite (Tableau 11, Planche 23, Annexe 1f).

Tableau 10 : Effet du milieu de micropropagation (OM et DKW) et de la présence d'hormones sur le débourrement et le développement des pousses chez les microboutures uninodales issues de la germination des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture.

Milieu de micropropagation	Balances hormonales	Débourrement (%)		Nombre moyen de bourgeons débourrés		Durée moyenne de débourrement (Jours)		Taille moyenne de la pousse (cm)		Nombre moyen de feuilles	
		C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3
OM	Témoin	25.0 d	12.5 d	1.0±0.0 c'	1.0±0.0 c'	38.5±4.9 d''	42.0±0.0 d''	0.7±0.3 g	0.9±0.0 fg	1.5±0.7 d'	2.0±0.0 cd'
	BAP-AIB	100.0 a	62.5 c	1.7±0.5 ab'	1.8±0.5 ab'	26.0±5.3 bc''	28.0±0.0 c''	2.0±0.7 de	1.9±0.2 de	2.9±1.0 cd'	3.1±0.9 cd'
	Zéatine-AIB	100.0 a	100.0 a	1.9±0.4 ab'	1.6±0.5 b'	17.0±5.5 a''	22.0±4.8 b''	3.7±1.0 b	5.2±2.1 a	6.9±3.2 b'	9.9±3.1 a'
DKW	Témoin	18.8 d	12.5 d	1.0±0.0 c'	1.0±0.0 c'	42.0±0.0 d''	42.0±0.0 d''	0.5±0.0 g	0.7±0.0 g	2.0±0.0 cd'	2.0±0.0 cd'
	BAP-AIB	100.0 a	87.5 b	1.9±0.4 ab'	1.8±0.4 ab'	22.0±7.5 b''	23.3±8.5 b''	1.7±0.3 ef	3.1±1.0 bc	3.4±1.1 c'	2.7±0.4 cd'
	Zéatine-AIB	100.0 a	100.0 a	2.0±0.0 a'	1.7±0.5 ab'	16.0±3.4 a''	17.0±3.7 a''	2.7±0.2 cd	3.3±1.4 bc	6.6±1.1 b'	6.8±2.4 b'

* : les différentes lettres en minuscule du même format (Non gras sans accent « a », Non gras avec un seul accent « a' », Non gras avec deux accents « a'' », En gras sans accent « a », En gras avec un seul accent « a' ») indiquent les groupes homogènes d'une différence significative à un seuil de 5%.

- **Enracinement des microboutures**

L'émission de racines n'est observée qu'en présence d'hormones. En effet, plus d'enracinement est observé chez les microboutures de C2 particulièrement sur le milieu OM additionné de Zéatine et d'AIB permettant 62.5% d'enracinement tandis que le milieu DKW contenant la Zéatine/AIB était plus bénéfique pour les microboutures de C3 avec 50% d'enracinement. Par ailleurs, les microboutures ayant développées des cals de grande taille s'enracinent moins que celles qui possèdent des cals moyennement développés (Tableau 11, Planche 23, Annexe 1f).

- **Durée moyenne nécessaire pour l'apparition des racines**

La durée moyenne d'enracinement variant de 26.3 à 38.5 jours est significativement influencée par la lignée, le milieu de propagation mais surtout par la combinaison hormonale ajoutée. Généralement, les boutures de C2 s'enracinent plus rapidement que celles de C3. De plus, l'apparition des racines survenant de la 3^{ème} à la 7^{ème} semaine de culture est plus rapide sur le milieu DKW notamment additionné de BAP et AIB avec un écart dépassant 5 jours par rapport au milieu OM. De même, le remplacement de la BAP par la Zéatine permet de réduire significativement la durée d'émission racinaire de 7 à 11 jours respectivement sur DKW et OM pour C2 et de 8 à 11 jours pour C3 sur OM et DKW (Tableau 11, Annexe 1f).

- **Nombre moyen de racines émises**

Ce sont les microboutures de C2 et C3 mises en culture respectivement sur les milieux OM et DKW contenant la Zéatine/AIB qui émettent le plus grand nombre de racines avec 1.5 et 2 racines émises par bouture. De même, le milieu DKW additionné de BAP permet une légère amélioration du nombre moyen de racines émises par rapport au milieu OM en passant de 1 à 1.3 racines/explant pour C2 et atteignant 1.5 pour C3 (Tableau 11, Planche 23, Annexe 1f).

Tableau 11 : Effet du milieu de micropropagation (OM et DKW) et de la présence d'hormones sur la callogenèse basale et l'enracinement des microboutures uninodales issues de la germination des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture.

Milieu de micropropagation	Balances hormonales	Callogenèse basale (%)		Taille du cal		Enracinement (%)		Durée moyenne d'enracinement (Jours)		Nombre moyen de racines	
		C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3
OM	Témoin	12.5 b	6.3 b	Petite	Petite	0.0 e'	0.0 e'	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e	0.0±0.0 f'	0.0±0.0 f'
	BAP-AIB	100.0 a	100.0 a	Moyenne	Grande	31.3 d'	31.3 d'	38.5±4.9 d	38.5±4.9 d	1.0±0.0 e'	1.5±0.7 bc'
	Zéatine-AIB	100.0 a	100.0 a	Moyenne	Grande	62.5 a'	43.8 c'	26.8±5.3 a	30.3±4.0 b	1.5±0.0 bc'	1.7±0.6 b'
DKW	Témoin	6.3 b	6.3 b	Très petite	Petite	0.0 e'	0.0 e'	0.0±0.0 e	0.0±0.0 e	0.0±0.0 f'	0.0±0.0 f'
	BAP-AIB	100.0 a	93.8 a	Petite	± Moyenne	43.8 c'	31.3 d'	33.3±6.7 bc	35.0±9.9 c	1.3±0.6 cd'	1.5±0.7 bc'
	Zéatine-AIB	100.0 a	100.0 a	Petite	± Moyenne	56.3 a'	50.0 b'	26.6±5.9 a	26.3±6.7 a	1.3±0.5 d'	2.0±0.8 a'

* : les différentes lettres en minuscule du même format (Non gras sans accent « a », Non gras avec un seul accent « a' », Non gras avec deux accents « a'' », En gras sans accent « a », En gras avec un seul accent « a' ») indiquent les groupes homogènes d'une différence significative à un seuil de 5%.

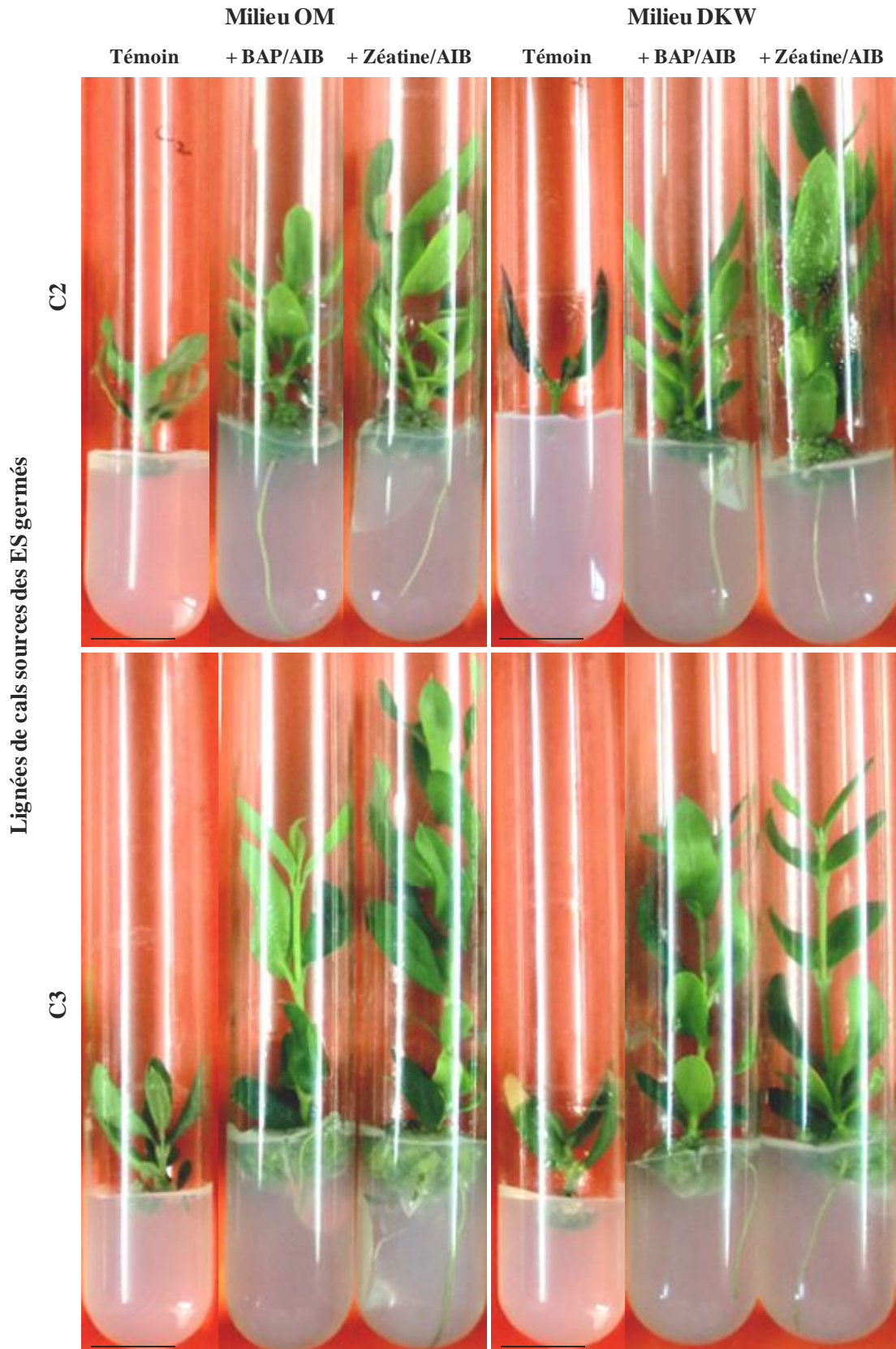


Planche 23 : Micropropagation des vitroplants issues de la germination des embryons somatiques matures de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 8 semaines de culture sur milieux OM ou DKW solides en présence ou absence d'hormones. (Barre correspond à 1 cm).

Conclusion partielle (Germination des ES et micropropagation)

L'obtention de plantules d'olivier par embryogenèse somatique dépend fortement de la capacité germinative des embryons somatiques ainsi que des conditions de leur mise en germination. Pour ce faire, des embryons somatiques matures sont mis en culture sur différents milieux solides ou liquides en présence ou absence de régulateurs de croissance. Par la suite, les pousses des vitroplants développés sont multipliées par micropropagation sur des milieux solides avec ou sans hormones. Les résultats obtenus montrent que :

- La faculté germinative varie d'une lignée de cal à une autre ainsi que selon les conditions de germination. En effet, le milieu OM notamment solide et additionné de BAP et d'AIB permet plus de germination suite à une émergence plus rapide (après 1 à 2 semaines) de la racine précédant une entrée en germination plus avancée (moins de 3 semaines).
- Le développement des vitroplants après germination dépend fortement du génotype et des conditions de culture mais beaucoup plus de la vitesse d'entrée en germination. De ce fait, les embryons germés rapidement sur les milieux avec hormones particulièrement solides (OM-S₁ et MS-S₁) produisent les pousses les plus développées (2 à 3 cm) avec plusieurs feuilles (4 à 6 feuilles).
- La réactivité des microboutures des pousses issues de la germination des embryons somatiques dépend directement du milieu de culture ainsi que sa concentration en hormones. En effet, le milieu OM additionné de Zéatine et d'AIB permet un meilleur débourrement plus ou moins rapide (2 à 3 semaines) avec un maximum de bourgeons réactifs ce qui permet d'avoir des pousses bien développées (jusqu'à 5 cm) avec plusieurs feuilles (plus de 10 feuilles).
- L'apparition de racines chez les microboutures dépend de la présence des régulateurs de croissance dans le milieu de culture ainsi que la formation préalable d'un cal à la base de la bouture. De ce fait, un milieu OM ou DKW additionné de Zéatine et d'AIB permettent un bon enracinement (40 à 60%) en un temps court (3 à 4 semaines) avec plusieurs racines émises par pousse.

2. Variation somaclonale : Induction par pression sélective

L'objectif de cette partie du travail est d'induire une variation somaclonale et d'évaluer la sensibilité de trois lignées de cals embryogènes d'olivier en utilisant le filtrat brut de la culture du champignon *Verticillium dahliae* Kleb. comme agent de sélection. En effet, deux stratégies d'induction sont appliquées selon le type du milieu de sélection utilisé. La sélection discontinue ou récurrente est réalisée sur un milieu liquide en présence de différentes concentrations du filtrat fongique suivie d'un transfert sur un milieu solide sans filtrat. La deuxième stratégie consistait à appliquer une pression sélective continue par le maintien des cultures embryogènes par des repiquages successifs sur un milieu solide additionné de différentes concentrations du filtrat fongique.

2.1. Sélection en milieu liquide (sélection discontinue)

Première phase de sélection (Pression sélective)

A la sortie du milieu liquide, l'accroissement du poids frais des cals en absence du filtrat fongique (témoin) est de 0.45, 0.19 et 0.38 g respectivement pour les trois lignées testées (Figure 7, Planche 24). Toutefois, la prolifération cellulaire est significativement influencée par l'inclusion du filtrat fongique au milieu de culture, et elle diminue proportionnellement avec l'augmentation de la concentration du filtrat notamment à 60% ayant provoqué une forte inhibition de la prolifération par rapport aux concentrations de 20 et 40% du filtrat en présence desquelles la réaction des lignées est plus ou moins similaire et varie entre 0.10 et 0.16 g pour C1 et de 0.06 à 0.08 g pour C2 (Figure 7, Annexe 2a). Cependant, la prolifération de C3 est plus affectée sur un milieu avec 40% de filtrat permettant un accroissement de poids frais entre 0.08 et 0.15 g par rapport à des accroissements entre 0.14 et 0.26 g en présence de 20% de filtrat respectivement des souches S2 et S1 (Figure 7, Planche 24). Par ailleurs, la prolifération cellulaire est généralement plus affectée en présence du filtrat de la souche S2 que celui de la souche S1 (Figure 7, Planche 24) alors que les lignées C1 et C3 sont moins influencées par la présence du filtrat que la lignée C2 présentant la plus faible prolifération même sur le témoin (Figure 7, Planche 24).

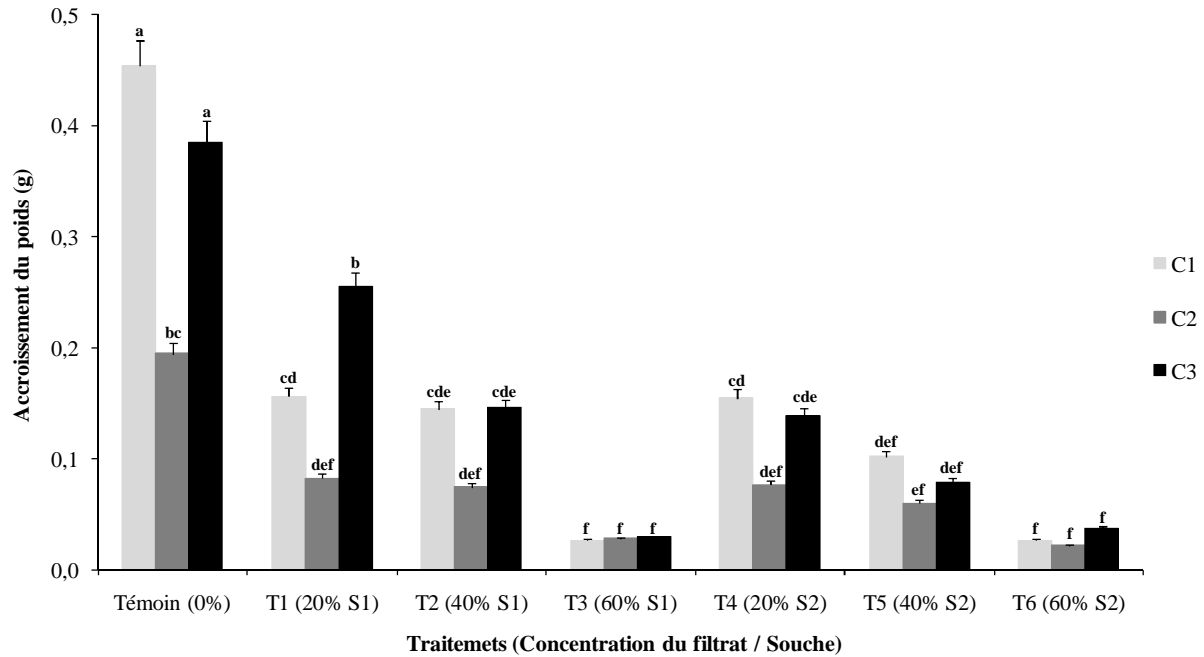


Figure 7. Effet de la concentration du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* dans le milieu de prolifération ECO liquide sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection.

Après trois semaines de sélection, le brunissement des masses cellulaires augmente proportionnellement avec la concentration du filtrat dans le milieu de culture, et est négativement corrélé ($r = -0.72$) avec l'accroissement du poids frais de telle sorte que les cals faiblement proliférés présentent plus de masses nécrosées en comparaison avec le témoin sur lequel les trois lignées ont montré respectivement 26.3, 30.0 et 26.8% de brunissement (Figure 8, Planche 24, Annexe 2a). En effet, les taux de brunissement les plus élevés sont enregistrés chez les cultures incubées en présence de 60% du filtrat particulièrement celui de la souche S2 avec 84.2, 87.4 et 94.9% respectivement pour les trois lignées (Figure 8, Planche 24). Par contre, le brunissement des différentes lignées sur les milieux contenant 40% de filtrat est plus élevé de 10 à 24% par rapport à celui observé avec la concentration de 20% où le taux de brunissement varie entre 37 et 42% pour C1, entre 58 et 63% pour C2 et d'environ 65% pour C3 (Figure 8, Planche 24). Par ailleurs, le filtrat de la souche S2 provoque plus de brunissement chez les masses cellulaires alors que le cal de C3 est le plus affecté par la présence du filtrat fongique (Figure 8, Planche 24).

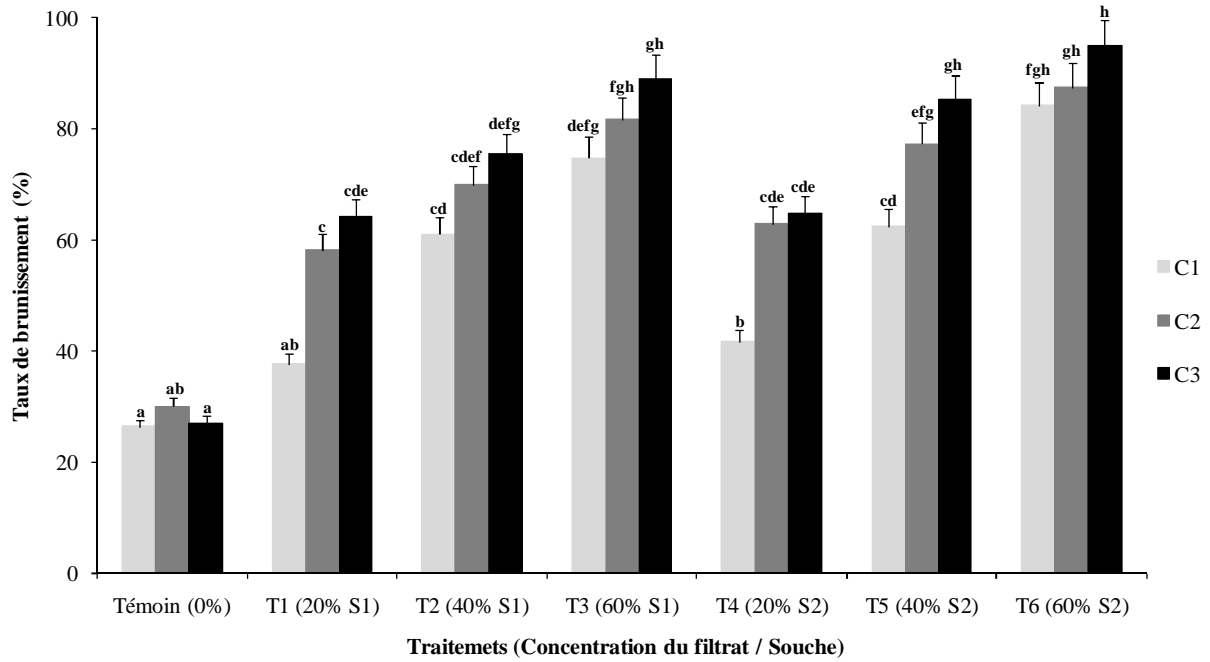


Figure 8. Effet de la concentration du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* dans le milieu de prolifération ECO liquide sur le brunissement des amas cellulaires de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection.

Concentrations du filtrat fongique dans le milieu de sélection liquide

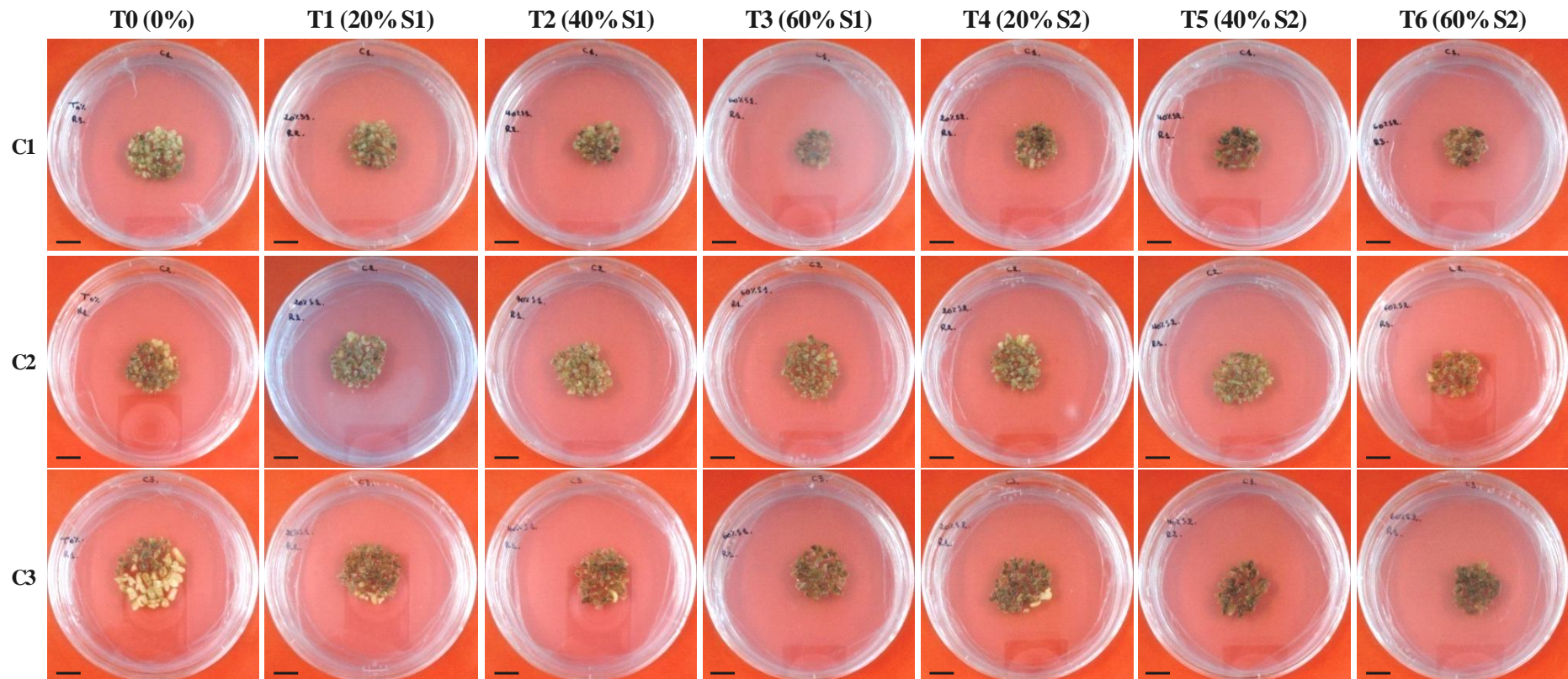


Planche 24 : Aspect des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection en milieu ECO liquide additionné de différentes concentrations du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae*. (Barre correspond à 1 cm).

Deuxième phase de sélection (Reprise cellulaire)

Après trois semaines de sélection en milieu liquide, les cals des différentes lignées sont transférés sur un milieu ECO solide sans filtrat fongique pour permettre leur reprise cellulaire. Cette dernière estimée par l'évolution du poids frais total du cal diffère d'une lignée cellulaire à une autre et elle est significativement influencée par le traitement appliqué lors de la 1^{ère} phase de sélection en milieu liquide, i.e. la concentration du filtrat fongique (Figure 9, Planche 25, Annexe 2a). En effet, les cals des trois lignées développés en absence du filtrat ont continué à proliférer dès leur étalement sur le milieu ECO solide et atteignent des poids frais de 2.6, 1.9 et 2.1 g après trois mois de culture, tandis que la prolifération des cals sélectionnés en présence de 20 et 40% de filtrat fongique ne s'est rétablie qu'à partir du deuxième mois de maintien pour atteindre des poids frais variant entre 0.9 et 0.6 g pour C1, entre 0.5 et 0.3 g pour C2 et entre 1.2 et 0.4 g pour C3 (Figure 9, Planche 25). Néanmoins, les cals cultivés avec 60% de filtrat n'ont pas montré une prolifération cellulaire significative. Par ailleurs, la sélection en présence du filtrat de la souche S2 a fortement affecté la reprise cellulaire des trois lignées de cal (Figure 9, Planche 25).

Les planches 26, 27 et 28 montrent la prolifération cellulaire observée chez les cals des trois lignées embryogènes sélectionnés en présence des différentes concentrations du filtrat notamment 20 et 40% du filtrat brut de culture des deux souches de *verticillium* après trois mois de maintien sur le milieu ECO solide sans filtrat fongique. Les masses cellulaires produites sont isolées et maintenues sur un milieu ECO solide basal dans le but de produire des embryons somatiques afin de régénérer des plantules.

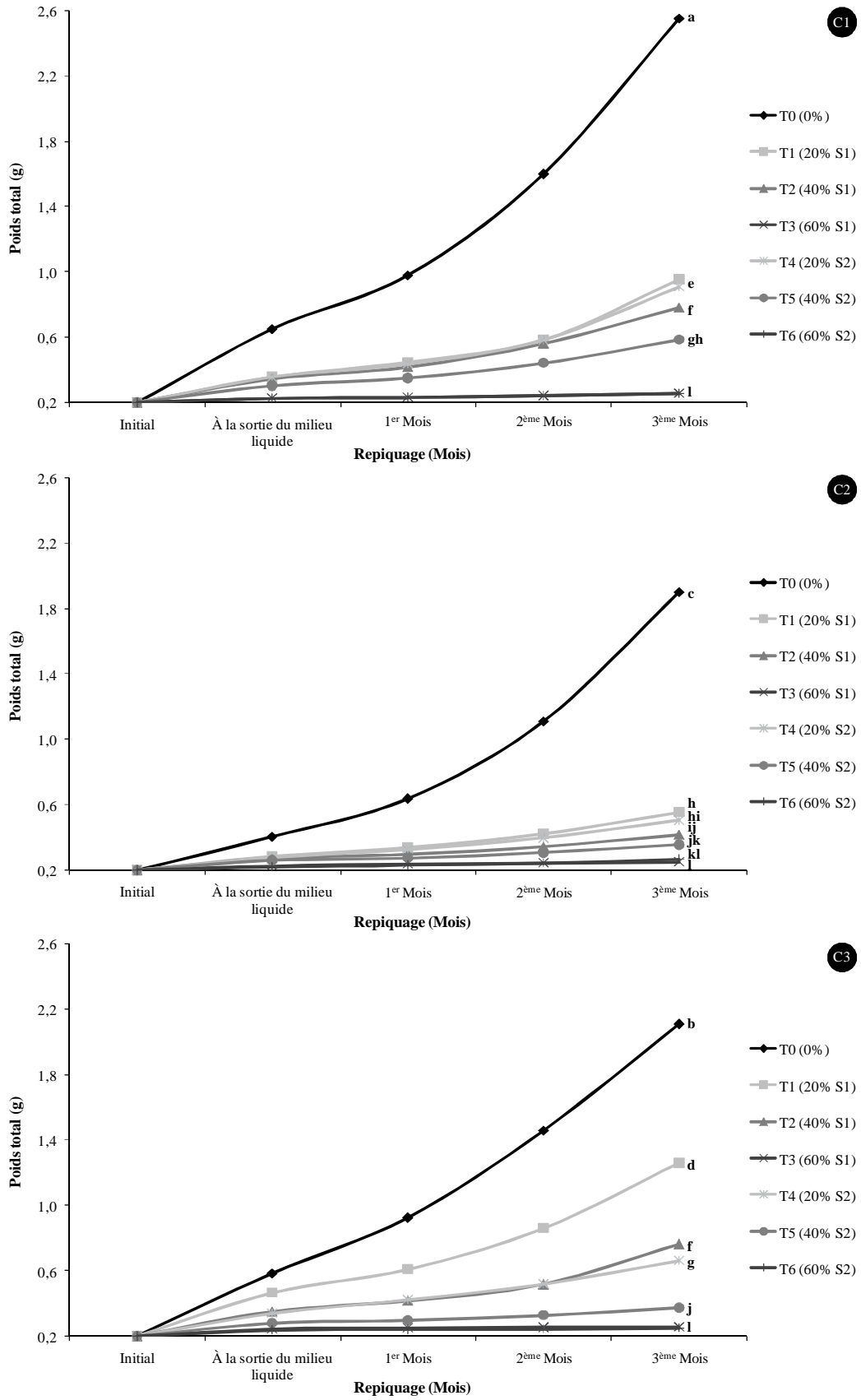


Figure 9. Evolution du poids frais total de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection en milieu ECO liquide additionné de différentes concentrations du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* et durant trois mois de maintien sur le milieu ECO solide sans filtrat.

Concentrations du filtrat fongique dans le milieu de sélection liquide

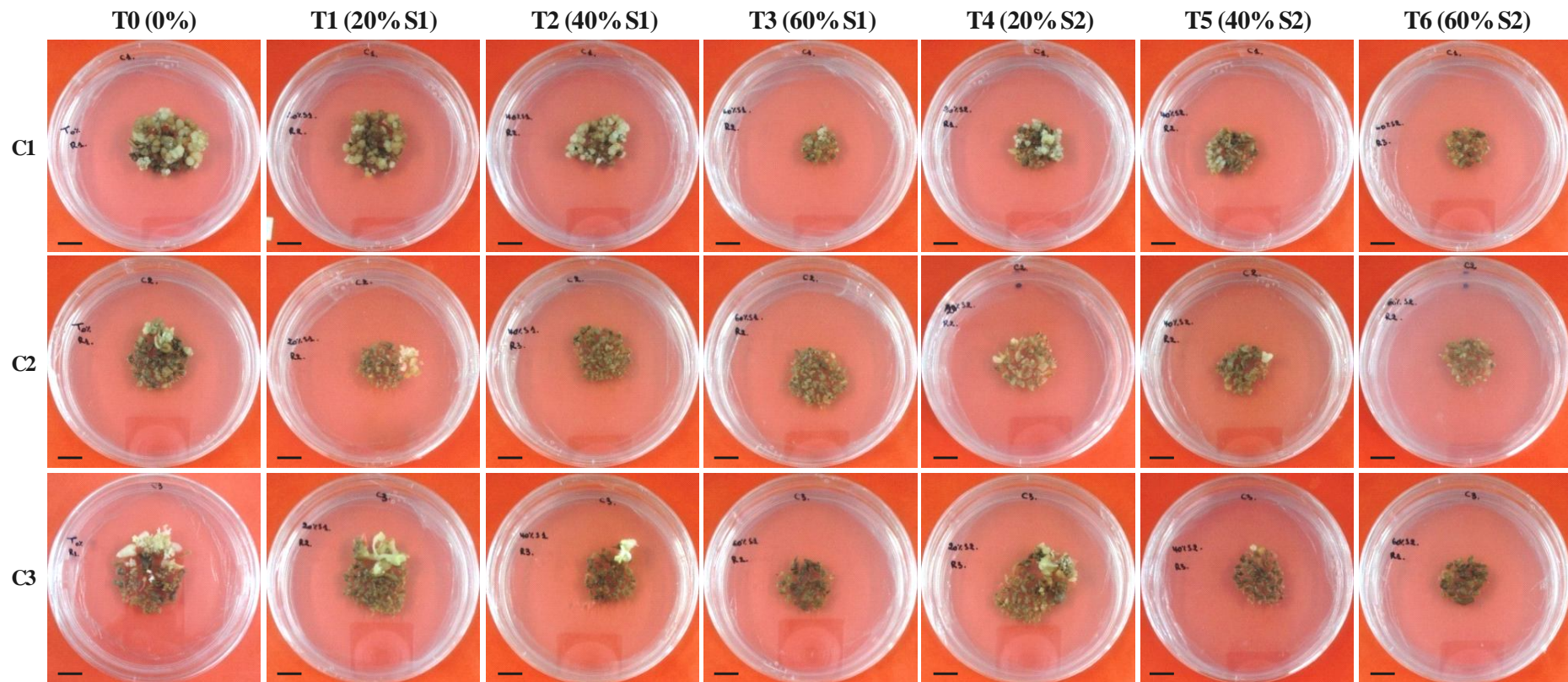


Planche 25 : Aspect des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois mois de maintien sur un milieu ECO solide sans filtrat de culture de *Verticillium dahliae*. (Barre correspond à 1 cm).

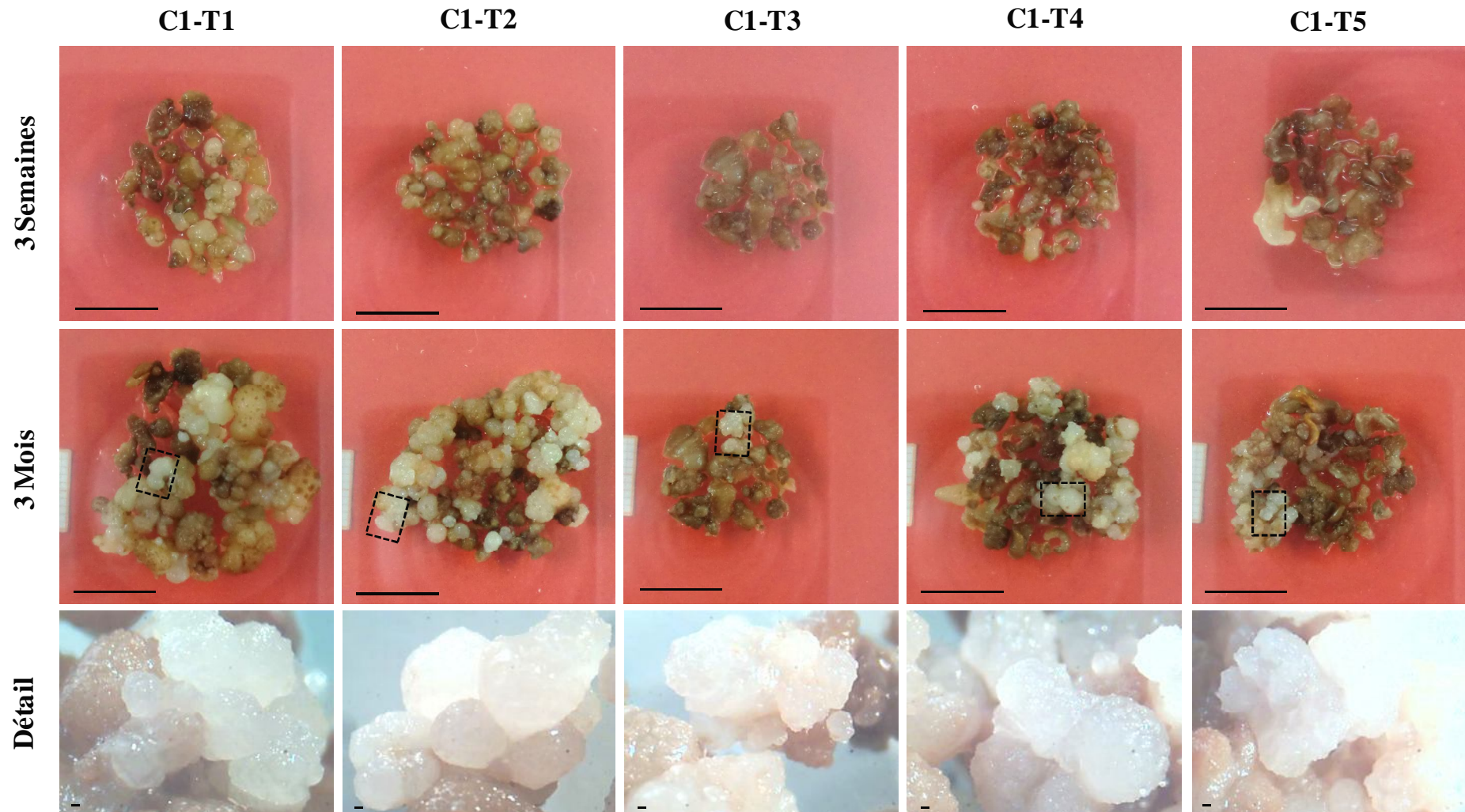


Planche 26 : Prolifération cellulaire observée chez le cal de la lignée embryogène 'C1' à la sortie du milieu de sélection liquide et après trois mois de maintien sur un milieu ECO sans filtrat de culture de *Verticillium dahliae*. (Barre correspond à 1 cm, Les carrés en pointillés □ indiquent l'endroit de l'observation microscopique).

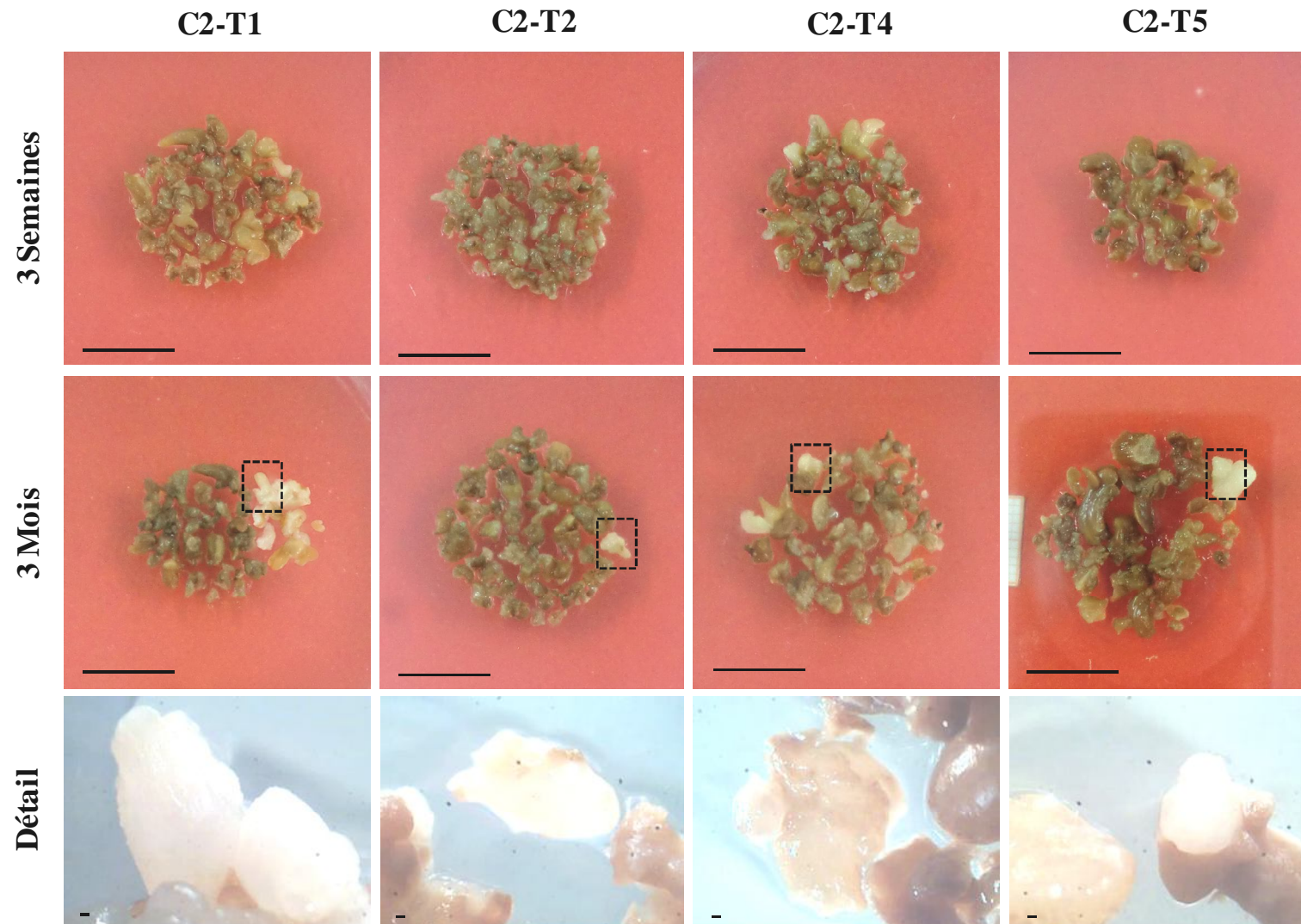


Planche 27 : Prolifération cellulaire observée chez le cal de la lignée embryogène 'C2' à la sortie du milieu de sélection liquide et après trois mois de maintien sur un milieu ECO sans filtrat de culture de *Verticillium dahliae*. (Barre correspond à 1 cm, Les carrés en pointillés □ indiquent l'endroit de l'observation microscopique).

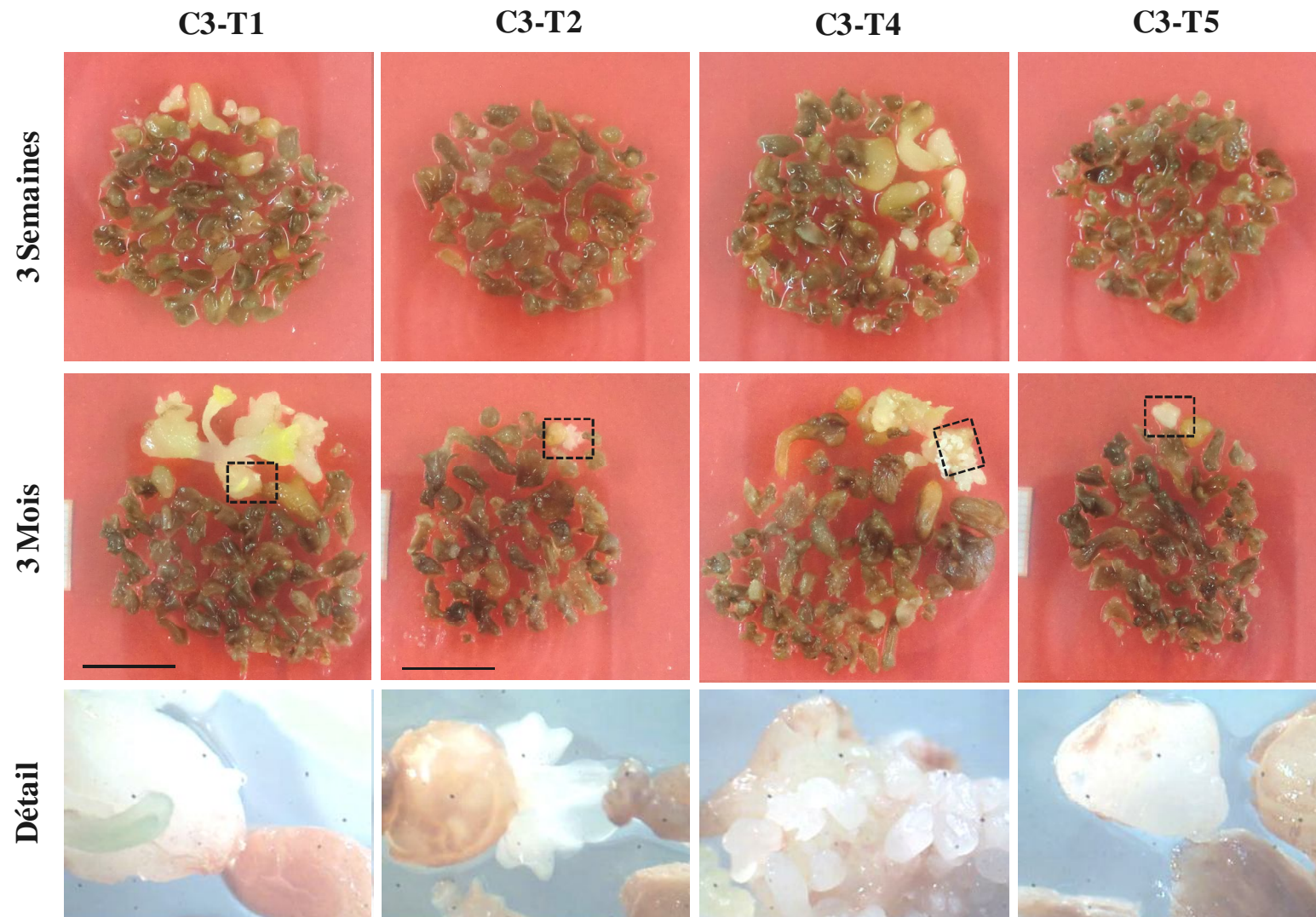


Planche 28 : Prolifération cellulaire observée chez le cal de la lignée embryogène 'C3' à la sortie du milieu de sélection liquide et après trois mois de maintien sur un milieu ECO sans filtrat de culture de *Verticillium dahliae*. (Barre correspond à 1 cm, Les carrés en pointillés □ indiquent l'endroit de l'observation microscopique).

2.2. Sélection sur milieu solide (sélection continue)

Première phase de sélection (Initiation de la pression sélective)

Après trois semaines de culture sur le milieu solide, l'accroissement du poids frais diminue proportionnellement avec l'augmentation de la concentration du filtrat notamment à 60% ayant provoqué une importante réduction de la prolifération cellulaire qui est de 0.1, 0.06 et 0.01 g respectivement pour les trois lignées par rapport au témoin dont l'accroissement est de 0.24, 0.24 et 0.14 g respectivement (Figure 10, Planche 29, Annexe 2b). Par contre, en présence de 20 ou 40% de filtrat ; la réaction de la lignée C2 était plus ou moins indifférente et varie entre 0.11 et 0.14 g tandis que la prolifération des lignées C1 et C3 est plus affectée en présence de 40% de filtrat des souches S2 et S1 respectivement avec 0.12 et 0.02 g. Par ailleurs, l'accroissement du poids frais est généralement plus affecté par la présence du filtrat de la souche S2 que celui de la souche S1 alors que la lignée C3 présente la plus faible prolifération cellulaire y compris sur le témoin (Figure 10, Planche 29).

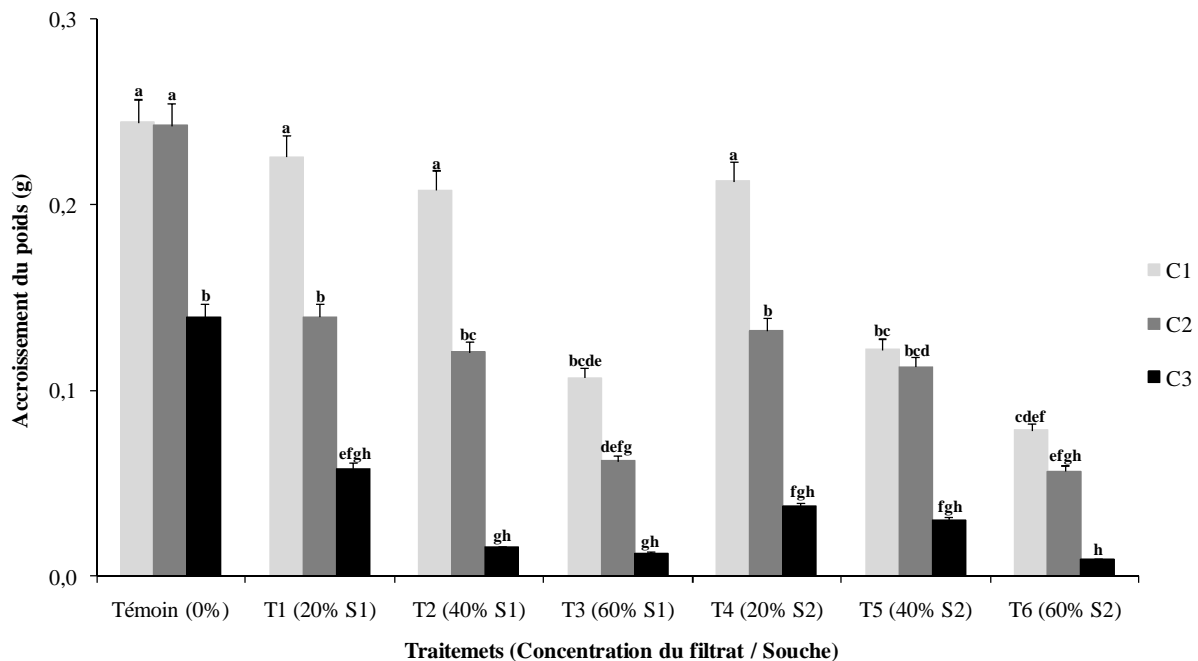


Figure 10. Effet de la concentration du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* dans le milieu de prolifération ECO solide sur l'accroissement du poids frais de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection.

Quant au brunissement des masses cellulaires, il augmentait proportionnellement avec la concentration du filtrat, et il est négativement corrélé ($r = -0.61$) avec l'accroissement du poids frais de telle sorte que les cals faiblement proliférés présentent plus de masses brunies

en comparaison avec le témoin sur lequel les trois lignées ont montré respectivement 14.5, 22.8 et 26.7% de brunissement (Figure 11, Planche 29, Annexe 2b). Par conséquent, la présence de 60% de filtrat particulièrement celui de la souche S2 provoque plus de brunissement avec des taux de 58.7, 83.6 et 90.9% respectivement pour les trois lignées (Figure 11, Planche 29). Par ailleurs, le filtrat de la souche S2 provoque plus de brunissement chez les masses cellulaires des différentes lignées testées alors que le cal de la lignée C3 est le plus affecté par la présence du filtrat fongique dans le milieu de sélection solide (Figure 11, Planche 29).

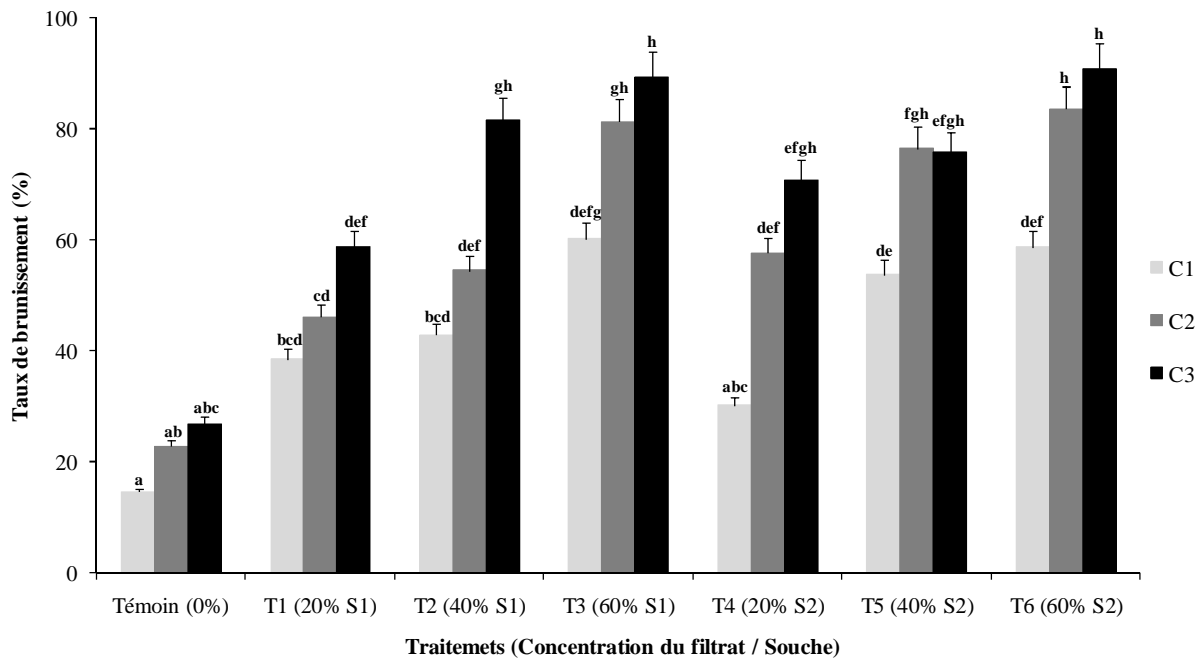


Figure 11. Effet de la concentration du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae* dans le milieu de prolifération ECO solide sur le brunissement des amas cellulaires de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après trois semaines de sélection.

Deuxième phase de sélection (Maintien de la pression sélective)

Afin d'appliquer une pression sélective continue sur les cultures ; ces dernières sont maintenues durant près de quatre mois par des repiquages successifs chaque trois semaines sur un nouveau milieu contenant la même concentration initiale du filtrat fongique. L'évolution du poids frais total du cal diffère d'une lignée à une autre et était significativement influencée par la concentration du filtrat fongique additionnée mais aussi par la souche source du filtrat (Figures 12, Planche 29, Annexe 2b).

En effet, les cals maintenus en présence de 60% de filtrat particulièrement issu de la souche S2 présentent un poids frais total plus ou moins stabilisé dès le premier repiquage entre 0.32 et 0.4 g pour C1, entre 0.26 et 0.29 g pour C2 et entre 0.21 et 0.23 g pour C3, tandis que la prolifération des cals repiqués sur milieux avec 20 ou 40% du filtrat notamment de la souche S1 était moins affectée et aboutit à des poids frais graduellement croissants surtout à partir du troisième repiquage (9 semaines) (Figures 12, Planche 29). Toutefois, les cals du milieu témoin ont développé plus de masses cellulaires dont le poids frais total était de 0.84, 0.73 et 0.49 g respectivement pour les trois lignées testées (Figures 12, Planche 29).

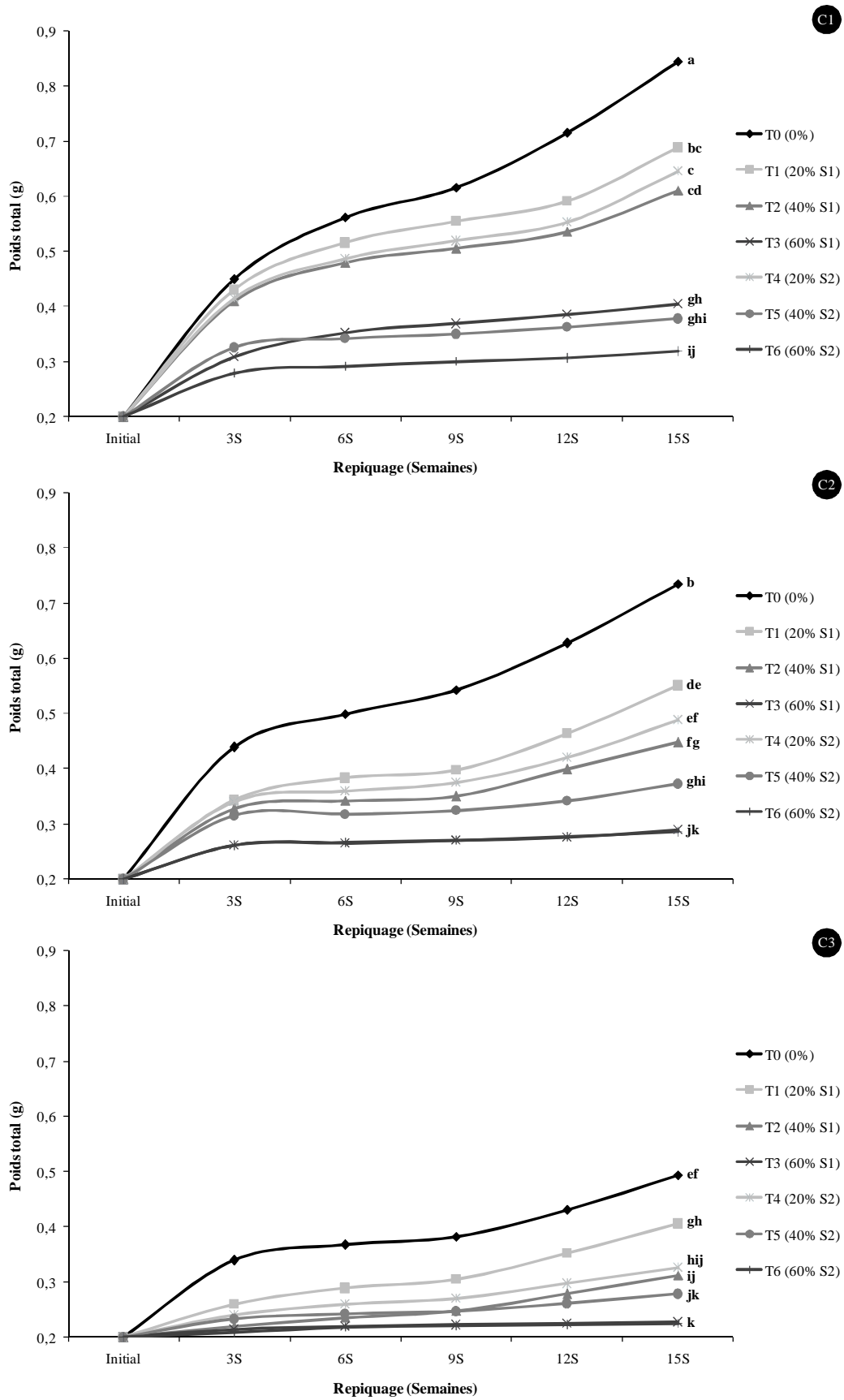


Figure 12. Evolution du poids frais total de trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal durant quinze semaines de sélection en milieu ECO solide additionné de différentes concentrations du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae*.

Concentrations du filtrat fongique dans le milieu de sélection solide

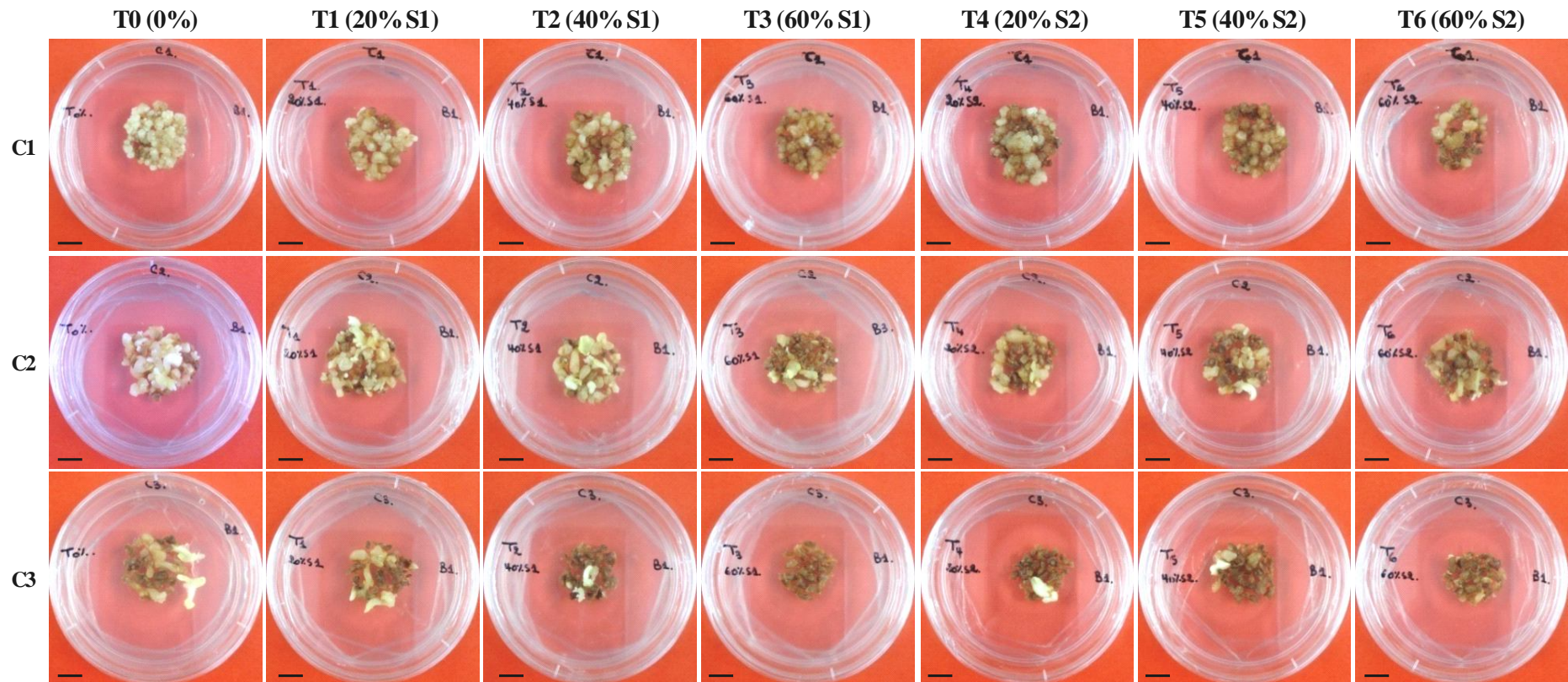


Planche 29 : Aspect des trois lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal après quinze semaines de maintien sur un milieu ECO solide avec différentes concentrations de filtrat de culture de *Verticillium dahliae*. (Barre correspond à 1 cm).

2.3. Régénération de plantules après sélection en présence du filtrat fongique

A partir des amas cellulaires produites après les différents procédés de sélection en présence du filtrat fongique du *Verticillium* ; des embryons globulaires sont isolés et mis en maturation sur un milieu ECO additionné de charbon actif (Planche 30 a). La mise en germination des embryons matures (Planche 30 b) sur un milieu OM contenant de la BAP et l'AIB (Planche 30 c) permet l'obtention de plantules d'une apparence normale (Planche 30 d- e et f). Toutefois, l'acclimatation et / ou la multiplication de ces plants après plus de deux mois de germination dans le but d'évaluer leur résistance n'étaient pas possibles vu leur très faible taille et entre-nœuds très courts rendant leur manipulation difficile (Planche 30 g).

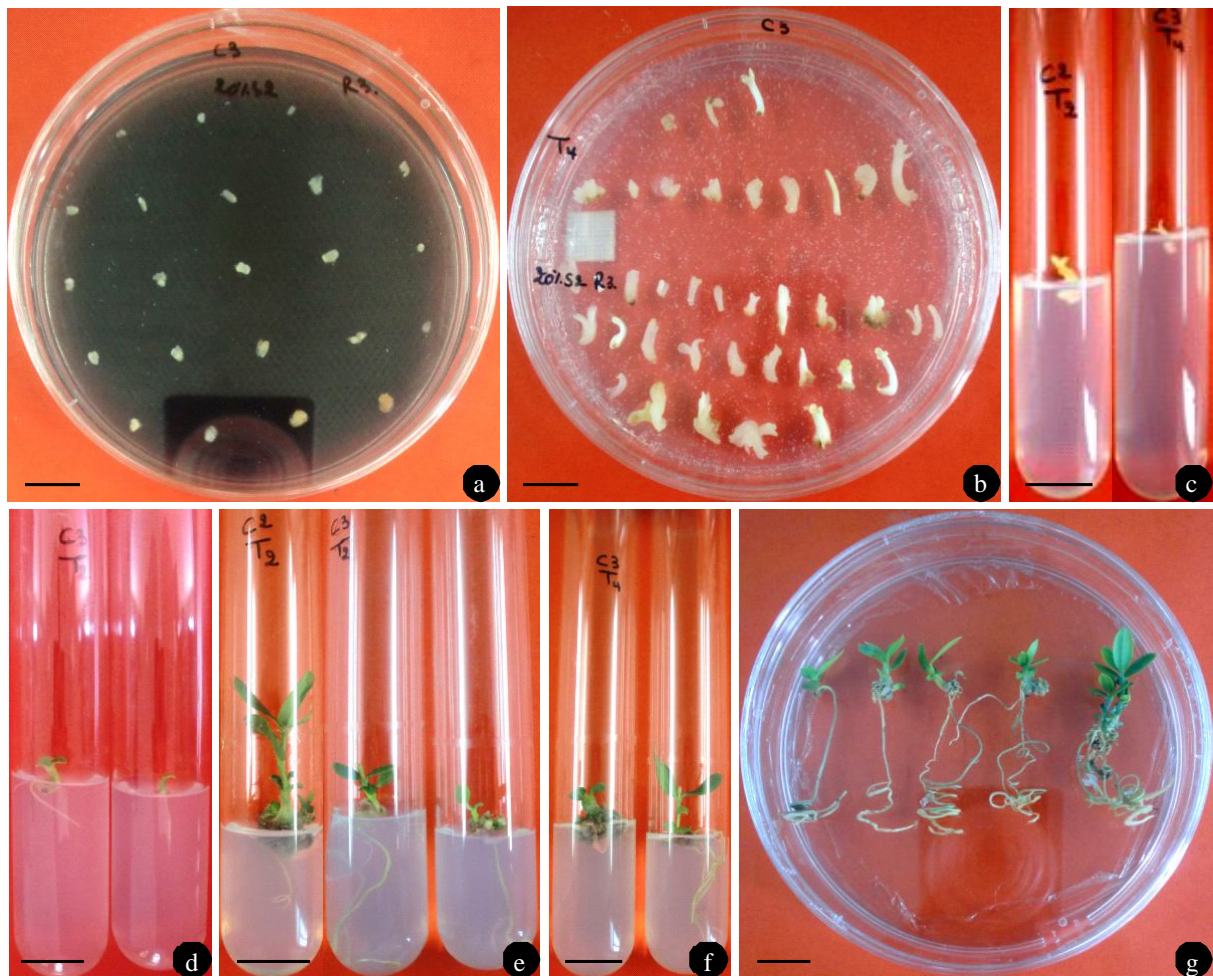


Planche 30 : Essai de régénération de plantules par germination d'embryons somatiques après sélection en présence du filtrat brut de la culture de deux souches de *Verticillium dahliae*. **a.** Embryons somatiques en maturation. **b.** ES matures. **c.** ES mis en germination. **d.** Début de germination après 2 semaines. **e et f.** Vitroplants obtenus après 2 mois. **g.** Vitroplants récupérés après plus de deux mois de culture. (Barre correspond à 1 cm).

Conclusion partielle (Variation somaclonale par pression sélective)

L'induction de la variation somaclonale chez les cultures embryogènes d'olivier par pression sélective exercée par un agent de sélection : le filtrat brut de la culture du champignon *Verticillium dahliae*, diffère d'une lignée cellulaire à une autre et dépend directement de la concentration du filtrat fongique dans le milieu de sélection, type du milieu ainsi que la souche du *Verticillium* utilisée. En effet, des masses embryogènes de trois lignées de cals embryogènes du cultivar 'Chemlal' sont cultivées en milieux liquide ou solide additionnés de différentes concentrations du filtrat fongique de deux souches de *Verticillium*. Les résultats obtenus montrent que :

- La sélection en milieu liquide avec agitation pendant trois semaines en présence du filtrat fongique, suivie d'un transfert sur un milieu solide dépourvu de l'agent sélectif, est plus efficace qu'un long maintien sur un milieu solide additionné du filtrat.
- La réaction des lignées utilisées diffère selon la concentration du filtrat ainsi que la souche de *Verticillium* productrice du filtrat. En effet, la lignée C3 est la plus sensible à la présence de l'agent de sélection notamment à une concentration 60% alors que le filtrat de la souche S2 est plus sélectif, et ce, indépendamment de la concentration testée.
- La présence du filtrat fongique dans le milieu de culture liquide durant trois semaines même à une faible concentration de 20% affecte fortement la prolifération cellulaire des cals en provoquant un brunissement important chez les masses développées. Néanmoins, le transfert sur un milieu solide sans filtrat permet le rétablissement de la capacité de prolifération des cals notamment ceux cultivés en présence de moins de 40% du filtrat.
- La sélection sur un milieu solide durant près de quatre mois même en présence d'une forte concentration du filtrat, quoiqu'elle réduit significativement l'accroissement du poids frais des cultures et amplifie la nécrose des amas cellulaires ; les cals maintiennent leur capacité de prolifération en s'habituant à la présence du filtrat et montrent une reprise de croissance notamment à partir du deuxième mois de sélection.
- La mise en germination des embryons isolés à partir des amas cellulaires proliférées après sélection en présence du filtrat fongique a permis la régénération de plantules dont l'acclimatation et / ou multiplication n'étaient pas possibles vu leur très faible développement.

3. Transformation génétique : Enracinement par inoculation bactérienne

Le but principal de cette partie du travail est d'améliorer la formation de racines chez les microboutures prélevées à partir des plants issus de la germination des embryons somatiques produits par des lignées de cals embryogènes d'olivier. Pour ce faire, l'effet de l'inoculation par une souche bactérienne d'*Agrobacterium rhizogenes* combiné avec la présence ou non d'auxine dans le milieu de culture est étudié. L'acclimatation des pousses enracinées est testée. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 12 et 13.

a. Débourrement des microboutures et développement des pousses

La réactivité des microboutures est significativement influencée par la lignée du cal ainsi que les conditions de culture notamment l'inoculation bactérienne. En effet, les boutures de C2 sont généralement plus réactives avec plus de bourgeons débourrés que celles de C3 sauf après inoculation et culture en absence d'AIB (T1) où le débourrement est de 46.7 et 86.7% avec 1.4 et 1.7 bourgeons débourrés respectivement pour C2 et C3 (Tableau 12). En outre, l'inoculation bactérienne des explants suivie par une culture en présence d'auxine (T3) permet d'obtenir les meilleurs résultats de débourrement (100%) et de bourgeons réactifs par explant (1.9 bourgeons). De même, ces traitements (inoculation bactérienne et auxine) accélèrent la réactivité des microboutures qui débourrent dès la 2^{ème} et 3^{ème} semaine de culture alors que les explants du témoin réagissent après plus de 35 jours d'incubation (Tableau 12, Annexe 3). Par conséquent, cet effet bénéfique de l'inoculation bactérienne et/ou de la présence d'AIB sur la réactivité contribue indirectement dans l'obtention de pousses bien développées. Les explants inoculés et/ou cultivés en présence d'auxine débourrant plus rapidement produisent les meilleures pousses dont la taille atteint 3.2 et 3.7 cm avec 6.2 et 7.6 feuilles en moyenne respectivement pour C2 et C3 (Planche 31 m), tandis que les pousses produites sur le témoin sont les moins développées avec une taille inférieure à 1 cm et un maximum de 2 feuilles. En outre, l'analyse statistique des données a révélé une corrélation négative entre la durée moyenne du débourrement et le développement des pousses (taille ($r = -0.54$) et nombre de feuilles ($r = -0.64$)) (Tableau 12, Annexe 3).

b. Enracinement des microboutures

Une callogenèse basale (Planche 31 a) précède souvent l'enracinement et l'élongation des racines émises chez les microboutures (Planche 31 b-c et d) particulièrement celles cultivées en présence d'auxines. En effet, l'émission de racines est directement influencée par

la lignée cellulaire source des explants mais beaucoup plus par le traitement appliqué avant (inoculation bactérienne) et au cours de la culture (présence d'auxine). Généralement, les microboutures de C2 s'enracinent mieux que celles de C3 surtout après inoculation bactérienne et culture en présence d'AIB (T3) avec des taux d'enracinement de 93.3 et 86.7% respectivement. Néanmoins, l'effet de l'auxine est plus important du fait que le taux d'enracinement passe de 6.7% sur le milieu témoin à 60 et 46.7% en présence d'AIB (T2) respectivement pour les deux lignées, alors que l'amélioration n'est que de 46.6 et 26.6% après inoculation bactérienne (T1) (Tableau 13, Planche 31, Annexe 3).

De même, la durée moyenne d'apparition des racines est significativement influencée par la lignée, présence d'auxine et particulièrement l'inoculation bactérienne. Les boutures de C3 s'enracinent plus rapidement que celles de C2 notamment après inoculation bactérienne et culture en présence d'auxine (T3) où les premières racines apparaissent après environ 23 jours d'incubation alors que sur les traitements T1 et T2 les racines sont émises après environ 27 jours. Par ailleurs, les explants inoculés et/ou introduits sur milieu avec AIB émettent des racines continuellement à partir de la 2^{ème} et 3^{ème} semaines d'incubation alors que sur le témoin la 1^{ère} racine n'apparaît qu'après plus de 6 semaines de culture (Tableau 13, Annexe 3). En addition, l'inoculation bactérienne améliore significativement le nombre de racines émises par explant en comparaison au témoin alors que la culture sur un milieu contenant l'AIB permet l'allongement des racines atteignant 4 cm de longueur pour C2 et 2.8 cm pour C3. Par conséquent, ce sont les microboutures inoculés et cultivés en présence d'AIB qui émettent plus de racines avec 2.4 et 2.7 racines par explant dont la longueur varie entre 2.4 et 3.6 cm respectivement pour C3 et C2 (Tableau 13, Planche 31 e-f-g-h-i-j-k et l).

c. Acclimatation des plantules régénérées

Après plus de six semaines de culture, plusieurs plantules phénotypiquement normales sont obtenues (Planche 31 m et n). Après immersion de la partie racinaire dans une solution de 500 mg l⁻¹ de céfotaxime pendant environ une heure, les plantules sont acclimatées au laboratoire (Planche 31 o). Après environ deux mois, les plantules sont déplacées sous serre où elles ont montré une croissance et une morphologie normales sans aucune anomalie ou malformation (Planche 31 p).

Tableau 12 : Effet du traitement (addition d'auxine AIB au milieu de culture et inoculation bactérienne basale) sur le débourrement et le développement des pousses chez les microboutures uninodales issues de la germination des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 6 semaines de culture*.

Traitements (AIB/Inoculation bactérienne)	Débourrement (%)		Nombre moyen de bourgeons débourrés		Durée moyenne de débourrement (Jours)		Taille moyenne de la pousse (cm)		Nombre moyen de feuilles	
	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3
Témoin (- AIB -IB)	26.7 bc	13.3 c	1.0±0.0 d'	1.0±0.0 d'	36.8±3.5 c''	35.0±0.0 c''	0.7±0.1 d	0.8±0.1 d	1.5±0.6 e'	2.0±0.0 d'
T1 (-AIB + IB)	46.7 b	86.7 a	1.4±0.5 c'	1.7±0.5 b'	21.0±4.0 b''	22.1±6.3 b''	0.9±0.2 d	1.4±0.3 c	3.4±0.5 c'	3.3±0.9 c'
T2 (+AIB - IB)	100.0 a	93.3 a	1.9±0.4 ab'	1.7±0.5 ab'	20.1±8.3 ab''	21.5±6.4 b''	3.0±0.6 b	3.7±0.5 a	6.3±0.8 b'	7.6±0.4 a'
T3 (+AIB +IB)	100.0 a	100.0 a	1.9±0.3 a'	1.8±0.4 ab'	17.3±5.8 a''	18.7±5.1 ab''	3.2±1.1 b	3.6±0.4 a	6.2±1.0 b'	7.3±0.7 a'

* : les différentes lettres en minuscule du même format (Non gras sans accent « a », Non gras avec un seul accent « a' », Non gras avec deux accents « a'' », En gras sans accent « a », En gras avec un seul accent « a' ») indiquent les groupes homogènes d'une différence significative à un seuil de 5%.

Tableau 13 : Effet du traitement (addition d'auxine AIB au milieu de culture et inoculation bactérienne basale) sur l'enracinement des microboutures uninodales issues de la germination des embryons somatiques de deux lignées de cals embryogènes d'olivier, Cv. Chemlal, après 6 semaines de culture*.

Traitements (AIB/Inoculation bactérienne)	Enracinement (%)		Durée moyenne de la 1 ^{ère} racine (Jours)		Durée moyenne d'apparition des racines (jours)		Nombre moyen de racines		Longueur moyenne des racines (cm)	
	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3
Témoin (- AIB -IB)	6.7 d	6.7 d	42.0±0.0 c'	42.0±0.0 c'	42.0±0.0 d''	42.0±0.0 d''	1.0±0.0 e	1.0±0.0 e	1.1±0.0 e'	1.0±0.0 e'
T1 (-AIB + IB)	53.3 c	33.3 cd	27.3±4.6 b'	27.2±4.3 b'	29.9±5.3 bc''	31.5±6.4 c''	1.9±0.6 cd	2.2±0.4 bc	3.4±2.0 ab'	1.5±1.3 de'
T2 (+AIB - IB)	60.0 bc	46.7 c	27.1±6.0 b'	26.9±3.6 b'	28.7±6.0 b''	30.4±5.3 bc''	1.7±0.5 d	1.9±0.7 cd	4.0±3.0 a'	2.8±3.5 bc'
T3 (+AIB +IB)	93.3 a	86.7 ab	23.5±8.4 a'	23.0±7.8 a'	26.5±7.5 a''	28.3±8.1 ab''	2.4±0.8 ab	2.7±1.3 a	3.6±1.7 ab'	2.4±0.9 cd'

* : les différentes lettres en minuscule du même format (Non gras sans accent « a », Non gras avec un seul accent « a' », Non gras avec deux accents « a'' », En gras sans accent « a », En gras avec un seul accent « a' ») indiquent les groupes homogènes d'une différence significative à un seuil de 5%.

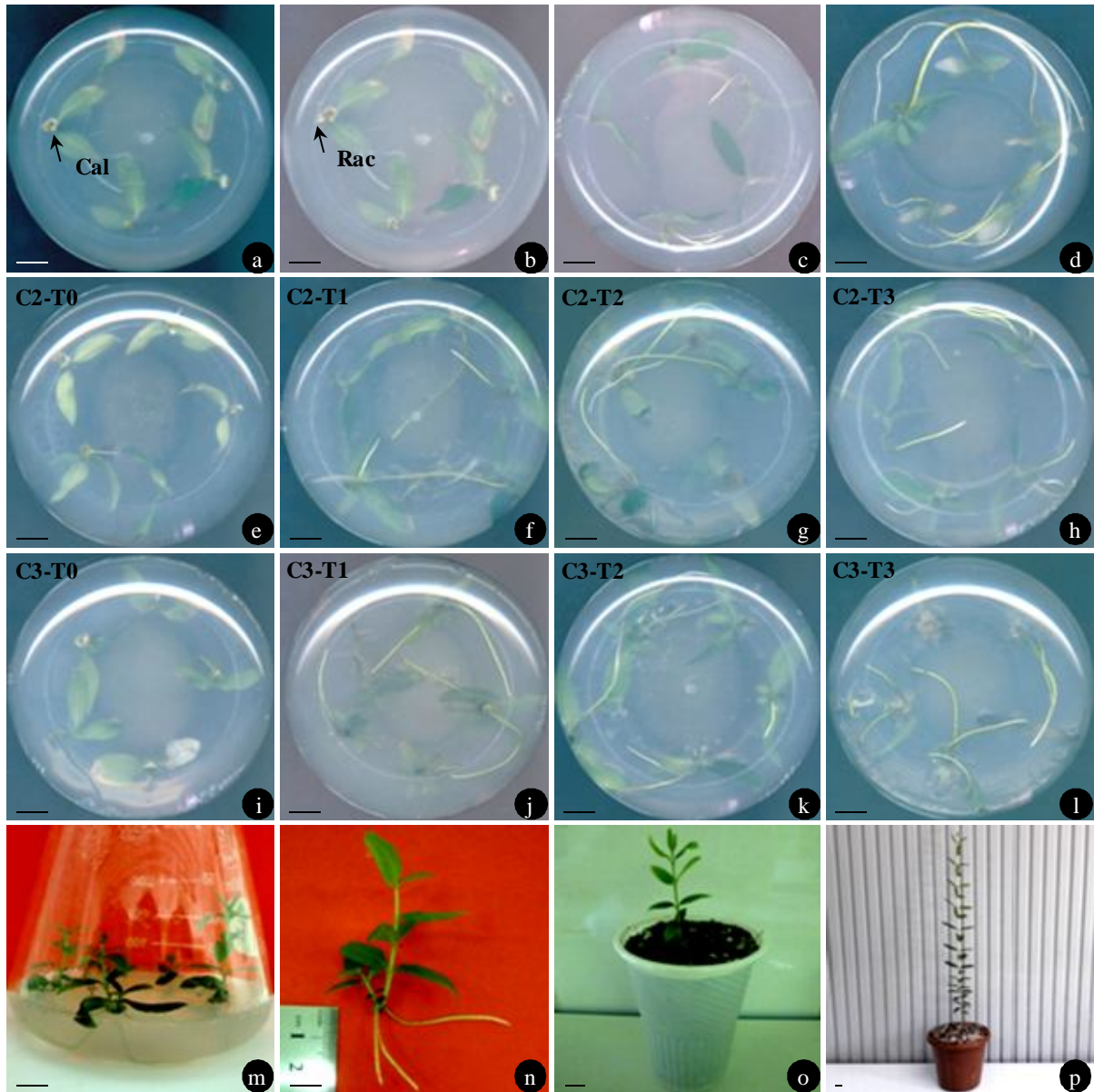


Planche 31 : Essai d'amélioration de l'enracinement des microboutures issues de la germination des ES par inoculation basale à l'aide d'*Agrobacterium rhizogenes* et mise en culture en présence ou absence d'AIB. **a**, **b**, **c** et **d**. Etapes de l'enracinement des microboutures (Callogenèse, Emission, Début d'élongation et fin de l'élongation). **e**, **f**, **g** et **h**. Traitements d'enracinement des microboutures de la lignée C2. **i**, **j**, **k** et **l**. Traitements d'enracinement des microboutures de la lignée C3. **m**. Pousses développées après six semaines. **n**. Vitroplant enraciné. **o**. Vitroplant acclimaté au laboratoire. **p**. Vitroplant acclimaté aux conditions externes. (Barre correspond à 1 cm, Abréviations : **Cal** : callogenèse, **Rac** : racine).

Conclusion partielle (Enracinement par inoculation bactérienne)

L'enracinement des microboutures prélevées des vitroplants obtenus après germination d'embryons somatiques d'olivier dépend fortement du génotype (lignée cellulaire) et il est significativement influencé par le procédé appliqué pour l'induction des racines notamment l'addition d'auxines au milieu de culture ou l'inoculation des bases des explants par *Agrobacterium rhizogenes* responsable de la formation du chevelu racinaire. En effet, des microboutures uninodales, préalablement inoculées ou non par une souche d'*Agrobacterium rhizogenes*, sont mises en culture sur un milieu OM solide additionné ou non d'auxine (AIB). Les résultats obtenus montrent que :

- La réactivité des microboutures est significativement améliorée par l'inoculation bactérienne des bases des explants particulièrement quand elle est suivie d'une culture en présence d'auxine.
- L'inoculation bactérienne combinée avec la présence d'AIB dans le milieu de culture accélère non seulement le débourrement des microboutures mais améliore considérablement le développement des pousses obtenues.
- La formation de racines chez les microboutures dépend directement de la lignée de cal mais aussi du traitement appliqué avant et pendant la mise en culture notamment l'inoculation bactérienne et la présence d'AIB dans le milieu d'enracinement.
- L'inoculation par *Agrobacterium* et/ou la culture en présence d'AIB améliore significativement l'enracinement des explants en accélérant l'émission de plusieurs racines d'une longueur assez importante.

Partie IV. Discussion

Partie IV. Discussion

1. Embryogenèse somatique

Dans cette étape de l'étude, nous avons pu optimiser un protocole de régénération *in vitro* de plantules d'olivier par embryogenèse somatique induite à partir de racicules d'embryons zygotiques du cultivar Algérien 'Chemlal' dans le but d'appliquer certaines techniques biotechnologiques d'amélioration particulièrement la transformation génétique et la variation somaclonale. L'étude a porté sur l'induction de cals embryogènes sur différents milieux en présence de différentes balances hormonales suivie par l'optimisation des conditions de maintien et de prolifération cellulaires permettant une meilleure production d'embryons somatiques. Ces derniers, après leur maturation en absence d'hormones, sont mis à germer sur différents milieux additionnés ou non de régulateurs de croissance afin de régénérer des vitroplants pouvant être multipliés *in vitro* par micropropagation ou directement acclimatés aux conditions naturelles.

1.1. Induction des cals embryogènes

L'obtention de cultures embryogènes à partir de racicules d'embryons zygotiques du cultivar 'Chemlal' est directement influencée par la composition chimique du milieu d'induction, la balance hormonale appliquée mais beaucoup plus par le type des régulateurs de croissance notamment l'auxine incluse dans telles balances hormonales.

1.1.1. Effet du milieu d'induction

Le besoin en éléments nutritifs pour l'induction de l'embryogenèse somatique dépend beaucoup plus du type d'explant utilisé ainsi que son état de développement que du génotype (Maalej *et al.*, 2006 ; Cerezo *et al.*, 2011 ; Rallo *et al.*, 2018). Cependant, il n'y a pas de milieu standard pour l'induction de cultures embryogènes chez l'olivier, malgré que le milieu OM de Rugini (1984) adapté à la callogenèse 'OMc' par Cañas et Benbadis (1988) est couramment utilisé avec les tissus juvéniles notamment les racicules (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Cerezo *et al.*, 2011 ; Mazri *et al.*, 2011 et 2012 ; Toufik *et al.*, 2017 ; Pires *et al.*, 2020) et les segments cotylédonaire (Mitrakos *et al.*, 1992 ; Peyvandi *et al.*, 2001 et 2010b ; Trabelsi *et al.*, 2003 ; Mazri *et al.*, 2012) d'embryons zygotiques matures tandis que la composition chimique du milieu MS de Murashige et Skoog (1962) souvent réduite à moitié est plus bénéfique pour l'induction à partir de matériel adulte tels que les

pétioles, feuilles, apex ou racines de vitrosemis d'olivier (Rugini et Caricato, 1995 ; Shibli et al., 2001 ; Trabelsi et al., 2011 ; Mazri et al., 2013) et même d'oléastre (Capelo et al., 2010 ; Narváez et al., 2019). Toutefois, l'induction à partir de cotylédons entiers est plus efficace sur la formule chimique complète du MS comme c'est le cas chez le cultivar 'Picholine Marocaine' (Brhadda et al., 2003a, 2007 et 2008) ou 'Coratina' (Hegazi et al., 2017) alors que ½ MS est plus adapté aux embryons zygotiques immatures des cultivars 'Dolce Agogia', 'Leccino', 'Frantoio' et 'Moraiolo' (Rugini, 1988), 'Chalkidikis' (Pritsa et Voyiatzis, 1999) ainsi que 'Chemlali de Sfax' et 'Meski' (Maalej et al., 2002).

En effet, à partir de radicules d'embryons zygotiques d'oléastre, Orinos et Mitrakos (1991) et après trois semaines d'incubation ont obtenu 100% de callogenèse sur le milieu OMc en présence d'AIB et de 2iP. Sous ces mêmes conditions, Mitrakos et al. (1992) et Cerezo et al. (2011) ont observé une callogenèse chez la majorité des radicules des cultivars 'Koroneiki' et 'Picual' respectivement. De même, Mazri et al. (2011 et 2012) indiquent que les radicules mises en culture sur le milieu OM augmentent de taille dès la première semaine d'introduction avec une formation de cal sur la partie blessée dès la 2^{ème} semaine et qui couvre la totalité de l'explant, mais à partir de la 3^{ème} semaine aucune nouvelle callogenèse n'est observée après transfert sur milieu sans hormones. Ces auteurs ont obtenu 82, 92, 95 et 100% de callogenèse à partir de radicules des cultivars 'Picual', 'Dahbia', 'Picholine Marocaine' et 'Arbequina' respectivement tandis que Toufik et al. (2017) indiquent que la totalité des radicules du cultivar 'Dahbia' forment des cals après trois semaines de culture sur le milieu OM additionné d'AIB et 2iP. Récemment, Pires et al. (2020) ont observé la callogenèse chez 98.9% des radicules du cultivar 'Galega Vulgar' sur OMc. En outre, selon Toufik et al. (2014) une durée dépassant 4 semaines sur le milieu d'induction n'améliore pas significativement le taux de callogenèse et ce quelque soit la balance hormonale ajoutée.

Ces observations corroborent parfaitement avec nos résultats sur les radicules du cultivar 'Chemlal' après trois semaines de leur culture sur le milieu OMc additionné d'AIB et Zéatine à la place du 2iP où on a observé un gonflement et début de formation d'amas cellulaires sur les parties blessées aboutissant à 100% de callogenèse (Figure 1, Planches 6, 7 et 8). De plus, aucune apparition de cal n'est observée chez les explants non réactifs lors de leur transfert sur le deuxième milieu de callogenèse.

Concernant le milieu MS, Hegazi et *al.* (2017) indiquent que ce milieu additionné d'hormones ne permet pas une bonne callogenèse à partir de tissus d'embryons zygotiques du cultivar 'Coratina' particulièrement les racines en comparaison avec les cotylédons. Ces auteurs indiquent un maximum de 95% d'induction de cal en présence d'ANA avec TDZ. Dans notre cas, le milieu MS indépendamment de la balance hormonale ne permet pas une bonne callogenèse par rapport au milieu OM et un maximum de 93.3% de formation de cals est obtenu en présence d'AIB et Zéatine. En effet, le milieu MS est souvent utilisé pour l'induction à partir de tissus adultes (feuilles, pétioles, etc.) ou des cotylédons entiers (Brhadda et *al.*, 2007 et 2008) ou embryons zygotiques immatures (Rugini, 1988 ; Pritsa et Voyiatzis, 1999 ; Maalej et *al.*, 2002). De plus, Maalej et *al.* (2006) suggèrent d'utiliser un milieu plus riche en nutriments notamment en azote sous forme de nitrates, comme c'est le cas du MS, durant la première phase d'embryogenèse lors de l'induction à partir de tissus contenant moins d'éléments minéraux (N, K, Ca et Mg) tels que les cotylédons des embryons zygotiques (Brhadda et *al.*, 2008) du fait que les nutriments sont localisés dans l'endosperme de la semence et ne sont délocalisés aux cotylédons de l'embryon qu'après le déclenchement de la germination (Zienkiewicz et *al.*, 2011). En outre, Pritsa et Voyiatzis (1999) indiquent que la richesse du milieu de culture ne peut être bénéfique que lorsque l'explant, tel que les cotylédons, est capable d'utiliser les éléments contenus quoique les taux de callogenèse obtenus sont souvent moins de 90% indépendamment de la balance hormonale additionnée (Trabelsi et *al.*, 2003 ; Brhadda et *al.*, 2007 et 2008).

Dans notre cas, les racines probablement n'étaient pas en mesure de métaboliser les nutriments inclus dans le milieu MS ce qui s'est traduit par une faible callogenèse en comparaison avec le milieu OM moins riche en nutriments (Figure 1).

Le transfert des cals sur un deuxième milieu de même composition chimique appauvri en régulateurs de croissance induit généralement le brunissement des tissus avec le maintien de la prolifération cellulaire chez certains explants (Figure 1, Tableau 3, Planches 6, 7 et 8). Nos résultats confirment ceux de Mazri et *al.* (2011 et 2012) indiquant que les cals issus des racines des différents cultivars d'olivier et induits sur un milieu OMc sont de couleur blanchâtre durant les premières semaines ensuite brunissent après 6 à 7 semaines lors de leur transfert sur un milieu sans hormones. De même, Toufik et *al.* (2017) ont observé que les cals blanchâtres et hydratés induits à partir de racines du

cultivar 'Dahbia' deviennent brunâtres et compacts une fois transférés en absence d'hormones. De plus, Mazri et *al.* (2013), Toufik et *al.* (2014) et Oulbi et *al.* (2018) ont observé que le bruissement des cals induits à partir de feuilles et pétioles d'olivier commence juste avec le transfert des explants sur un milieu dépourvu d'hormones suite à une forte accumulation de composés phénoliques induisant, ainsi, une régression rapide de leur croissance (Trabelsi et *al.*, 2011). Récemment, Pires et *al.* (2020) indiquent que le maintien des cals sur un second milieu OMc dépourvu d'hormones après induction pendant plus d'un mois provoque la nécrose des cals ayant montré une certaine expression embryogène. Néanmoins, un deuxième transfert sur un milieu contenant une faible teneur en hormones permet un redémarrage lent de la prolifération cellulaire (Trabelsi et *al.*, 2011 ; Oulbi et *al.*, 2018) comme c'est le cas dans notre étude où certains cals reprennent leur croissance une fois transférés sur le milieu ECO additionné d'hormones.

En outre, en dépit d'une forte nécrose observée chez les cultures après leur transfert sur le milieu moins riche en régulateurs de croissance ; certains cals demeurent en prolifération avec une expression embryogène qui diffèrent d'une lignée de cal à une autre après introduction sur le milieu ECO approprié (Figure 1, Planches 6, 7 et 8). Cette suppression ou réduction de la teneur en hormones est nécessaire à l'expression embryogène (Peyvandi et *al.*, 2001). Par conséquent, les taux d'embryogenèse somatique obtenus étant faibles varient entre 3.3 et 13.3% en fonction du milieu d'induction et de sa contenance en hormones (Figure 1). Nos résultats rejoignent parfaitement ceux obtenus dans les mêmes conditions d'induction par plusieurs auteurs à partir des racicules de diverses variétés d'olivier indiquant des taux d'embryogenèse de 0 à moins de 25% selon le cultivar. En effet, Orinos et Mitrakos (1991) ont observé moins de 7% d'embryogenèse chez les racicules d'oléastre transférés sur un milieu OMc dépourvu de cytokinine et contenant $1/10^{\text{ème}}$ de la concentration d'AIB initialement additionnée. De même, Mazri et *al.* (2012) ont obtenu 0, 7, 9 et 13% respectivement pour les cultivars 'Picholine Marocaine', 'Picual', 'Dahbia' et 'Arbequina' après transfert sur le milieu ECO tandis que Mazri et *al.* (2011) et Toufik et *al.* (2017) indiquent respectivement que 19.6 et 20.8% de cals induits à partir de racicules du cultivar marocain 'Dahbia' étaient embryogènes. De plus, Cerezo et *al.* (2011) et Pires et *al.* (2020) ont obtenu respectivement 25 et 17% d'embryogenèse à partir des racicules des cultivars 'Picual' et 'Galega Vulgar' après transfert sur le milieu ECO additionné d'hormones permettant, ainsi, de restaurer leur capacité de prolifération et d'expression embryogène.

Par ailleurs, l'induction de l'embryogenèse somatique à partir d'autres tissus juvéniles tels que les cotylédons aboutit à des taux plus ou moins faibles de l'ordre de 4 à 13% pour les cultivars 'Arbequina', 'Chetoui' et 'Chemlali' (Trabelsi et al., 2003) et entre 22 et 37% pour 'Picholine Marocaine' (Brhadda et al., 2007 et 2008). Toutefois, Mitrakos et al. (1992) et Peyvandi et al. (2010b) indiquent l'obtention entre 40 et 55% d'embryogenèse à partir de radicules du cultivar 'Koroneiki' après trois semaines d'induction sur OMc avec AIB et 2iP suivi d'un transfert en absence d'hormones. De même, Hegazi et al. (2017) ont obtenu entre 27 et 38% d'embryogenèse à partir de radicules du cultivar 'Coratina' sur le milieu $\frac{1}{2}$ MS contenant différentes cytokinines. En addition, Capelo et al. (2010) ont obtenu près de 27% d'embryogenèse à partir de pétioles d'oléastre après induction sur MS en présence d'AIB et Zéatine alors que Oulbi et al. (2018) indiquent que 7 à 11% des cals issus des pétioles et feuilles du cultivar 'Picholine Marocaine' induits en présence de Zéatine avec l'AIB et ANA respectivement sont embryogènes. Par conséquent, ces différences entre cultivars démontrent que la récalcitrance de certaines variétés à l'embryogenèse somatique est génétiquement déterminée par la juvénilité du tissu (Peyvandi et al., 2001 ; Rugini et Silvestri, 2016).

L'apparition des structures embryogènes particulièrement les nodules est considérée comme un marqueur morphologique de l'embryogenèse somatique (Mazri et al., 2013 ; Oulbi et al., 2018) et commence généralement après transfert sur un milieu dépourvu d'hormones ou dont la concentration notamment celle des auxines est réduite (Planches 6 et 7). De ce fait, Orinos et Mitrakos (1991) et Mitrakos et al. (1992) indiquent que l'expression embryogène chez les cals des radicules d'oléastre et du cultivar 'Koroneiki' a été observée à partir du deuxième mois (6 à 8 semaines) de maintien sur le milieu OMc dépourvu de cytokinine (2iP) et dont la concentration de l'AIB est réduite à $1/10^{\text{ème}}$. De même, sous tels conditions ; Peyvandi et al. (2008) ont observé les structures embryogènes chez les cals des radicules des cultivars 'Zard' et 'Mission' après le deuxième ou troisième repiquage c'est-à-dire 7 à 9 semaines de l'initiation des cultures. De plus, Cerezo et al. (2011) et Mazri et al. (2012) indiquent l'apparition des structures embryogènes à partir de la 9^{ème} semaine de culture chez 'Picual' alors que d'autres cultivars tels que 'Arbequina' et 'Dahbia' forment des embryons après 4 semaines de transfert sur le milieu ECO c'est-à-dire 10 à 14 semaines de l'initiation des cultures (Mazri et al., 2011 et 2012 ; Toufik et al. (2017) tandis que Pires et al. (2020) indiquent l'apparition des structures embryogènes chez les cals du cultivar 'Galega vulgar' après 7

semaines de culture juste lors du transfert sur un milieu OMc sans hormones malgré que le maintien des cultures pendant plus d'un mois sur le milieu dépourvu d'hormones retarde significativement l'apparition des ES (Mazri et *al.*, 2011 ; Pires et *al.*, 2020). En addition, Brhadda et *al.* (2003a) indiquent que les ES apparaissent sur les cals issus des cotylédons du cultivar 'Picholine Marocaine' après 7 à 8 semaines de l'initiation. Nos résultats confirment ces observations du fait que les structures embryogènes sont observées après un mois du transfert des cals sur le milieu dépourvu de Zéatine et dont la concentration des auxines est réduite à 1/10^{ème} c'est-à-dire après 7 à 8 semaines de l'introduction des explants. De plus, leur fréquence et l'intensité de formation augmentent significativement avec la mise en culture sur le milieu ECO approprié (Planches 6, 7 et 8).

1.1.2. Effet des régulateurs de croissance

L'induction de l'embryogenèse somatique se fait en cultivant l'explant sur un milieu contenant le stimulant, habituellement une auxine, et dans certains cas une cytokinine (Pliego-Alfaro et Barceló-Muñoz, 2001 ; Von Arnold, 2008 ; Neumann et *al.*, 2009 ; Cançado et *al.*, 2013 ; Palomo-Ríos et *al.*, 2021) suivie de son transfert sur un milieu généralement de même composition chimique cependant dépourvus d'auxines ou avec une concentration réduite afin de favoriser l'expression embryogène (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et *al.*, 1992 ; Bhojwani et Razdan, 1996 ; Peyvandi et *al.*, 2001). Toutefois, le besoin en auxine ou autres régulateurs de croissance additionnés pour l'initiation de l'embryogenèse somatique est fonction, en grande partie, du génotype et explant (Mazri et *al.*, 2011) ainsi que son degré de maturité et de développement (Von Arnold, 2008) mais aussi du type d'auxine utilisée (Rugini, 1988).

Selon Rugini (1995) l'induction de cals d'olivier peut être réalisée avec de faibles concentrations d'auxines ou même en leur absence totale du fait qu'elles ne sont pas indispensables pour le développement précoce des cals selon Lavee et Messer (1969) quoique l'induction en absence d'hormones ou en présence d'auxines seules ne permet pas d'avoir des cals embryogènes ce qui indique que la combinaison des auxines et cytokinines semble être essentiel pendant la phase d'induction de cals (Maalej et *al.*, 2002 ; Hegazi et *al.*, 2017) pour provoquer la conversion des cellules somatiques à l'état méristématique (Peyvandi et *al.*, 2001). Nos résultats confirment ces observations du fait qu'une callogenèse de 10 à 13% est obtenue sur les milieux témoins toutefois sans aucune expression embryogène (Figure 1, Planches 6, 7 et 8). De plus, les cals d'apparence

embryogène ne sont observés qu'après induction en présence d'auxines en combinaison avec la Zéatine. Toutefois, les mêmes balances hormonales ne donnent pas forcément les mêmes effets sur différents explants du même cultivar ou les mêmes explants de différentes variétés. Cette différence d'influence est étroitement liée avec le niveau de différenciation des cellules de l'explant (Leva et *al.*, 1995) déterminant son équilibre hormonale endogène (Mazri et *al.*, 2011) en plus de l'existence d'un gradient potentiel de régénération chez les explants prélevés des embryons zygotiques (Cañas et Benbadis, 1988 ; Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et *al.*, 1992 ; Peyvandi et *al.*, 2001 ; Brhadda et *al.*, 2003a ; Peyvandi et *al.*, 2008 ; Pires et *al.*, 2020) et feuilles d'olivier (Mazri et *al.*, 2013 ; Toufik et *al.*, 2014) et même d'oléastre (Capelo et *al.*, 2010) d'où l'importance du choix de la partie de l'explant à utiliser et de la période de prélèvement pour avoir une bonne réponse (Leva et *al.*, 1995 ; Peyvandi et *al.*, 2008).

En effet, l'AIB avec le 2iP était généralement la combinaison hormonale la plus utilisée pour l'induction de cals embryogènes à partir de tissus juvéniles tels que les racines des embryons zygotiques (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et *al.*, 1992 ; Cerezo et *al.*, 2011 ; Mazri et *al.*, 2011 et 2012 ; Toufik et *al.*, 2017 ; Pires et *al.*, 2020) ou les parties proximales des cotylédons (Cañas et Benbadis, 1988 ; Peyvandi et *al.*, 2001 et 2010b ; Trabelsi et *al.*, 2003 ; Mazri et *al.*, 2012) tandis que l'ANA est souvent utilisée avec le matériel adulte notamment les pétioles et feuilles en combinaison avec le thidiazuron (TDZ) (Rugini et Caricato, 1995 ; Mazri et *al.*, 2011 et 2013 ; Rugini et Silvestri, 2016 ; Narváez et *al.*, 2019) ou bien le 2iP (Trabelsi et *al.*, 2011) ou Zéatine (Oulbi et *al.*, 2018). De plus, la combinaison de l'ANA avec le 2iP ou TDZ a permis de bons résultats à partir des cotylédons entiers (Leva et *al.*, 1995 ; Brhadda et *al.*, 2008 ; Hegazi et *al.*, 2017) ou embryons zygotiques immatures (Maalej et *al.*, 2002) alors que la combinaison de l'AIA avec la Kinétine induit plus de cal chez les tissus du cultivar 'Manzanillo' (Lavee et Messer, 1969).

Dans notre cas, plus de callogenèse est obtenue à partir de racines d'embryons zygotiques en présence d'AIB par rapport aux autres auxines testées et ce indépendamment de la composition chimique du milieu de culture. Par la suite, ce sont les cals induits en présence d'AIB ainsi que l'ANA en combinaison avec la Zéatine qui ont présenté plus d'expression embryogène alors que ceux issus en présence de l'AIA ou 2,4-D se sont fortement nécrosés (Figure 1, Planches 6, 7 et 8).

Néanmoins, Rugini (1988) indique que le 2,4-D notamment en combinaison avec la BAP induit moins de cals, inhibe la différenciation cellulaire et provoque un brunissement rapide et marqué des cultures inversement à l'ANA qui, en dépit de la faible callogenèse induite, favorise l'expression embryogène avec une faible nécrose des tissus. De plus, Ramezani et Shekafandeh (2009) indiquent que l'ANA et le 2,4-D en combinaison avec le 2iP induisent très faiblement la callogenèse à partir d'anthères du cultivar 'Conservolea' toutefois sans aspect embryogène. Nos résultats corroborent parfaitement avec ces observations car moins de 27 et 44% de callogenèse sont obtenues respectivement sur les milieux OMc et MS additionnés de 2,4-D en combinaison avec la Zéatine. De plus, ces cals brunissent rapidement avant même le transfert sur un milieu dépourvu de cytokinine sans montrer aucune expression embryogène. De même, la callogenèse sur les milieux contenant de l'ANA était moins de 50% quoique près de 7% des cals étaient embryogènes (Figure 1, Tableau 3, Planches 6, 7 et 8).

De plus, les radicules mises en culture en absence de régulateurs de croissance ou en présence d'ANA comme auxine tendent à s'allonger et ce indépendamment de la composition chimique du milieu d'induction (Planches 6 et 7). En effet, l'élongation de la radicule et de l'hypocotyle est souvent considérée comme un premier signe d'entrée en germination chez l'olivier (Voyiatzis, 1995 ; Acebedo et *al.*, 1997) notamment chez les embryons zygotiques isolés (Cañas et *al.*, 1987 ; Brhadda et *al.*, 2000) suite à l'activation de la zone méristématique apicale de la radicule (Germanà et *al.*, 2014) par la mobilisation des réserves incluses dans les cotylédons ainsi que le milieu de culture contenant des régulateurs de croissance (Zienkiewicz et *al.*, 2011). Toutefois, selon Orinos et Mitrakos (1991) la formation de racine sur les explants lors de la callogenèse est une réaction morphogénique labile favorisée par plusieurs facteurs notamment l'absence d'hormones ou leurs faibles concentrations particulièrement les auxines. De plus, la rhizogenèse n'est signalée qu'avec les segments cotylédonaires en absence d'hormones (Orinos et Mitrakos, 1991 ; Mitrakos et *al.*, 1992) ou en présence de faibles quantités (moins de 5 mg l⁻¹) d'AIB ou ANA (Trabelsi et *al.*, 2003 ; Brhadda et *al.*, 2008 ; Mazri et *al.*, 2012 ; Pires et *al.*, 2020).

En outre, l'élongation observée dans notre étude en présence d'ANA est peut être due au fait que la concentration additionnée (5 mg l⁻¹) de l'ANA était faible pour induire directement une callogenèse (Tableau 3).

1.1.3. Structure des cals obtenus

Les cals embryogènes caractérisés principalement par des traits qualitatifs tels que leurs structure et texture ainsi que la couleur de masses cellulaires mais aussi par des critères quantifiables en relation avec leur prolifération cellulaire et la production d'embryons somatiques. Ces caractères diffèrent suivant l'explant utilisé et varient d'une lignée de cal à une autre et selon les conditions d'induction notamment l'auxine.

En effet, plusieurs études indiquent que les cals embryogènes de l'olivier indépendamment de l'explant source sont de couleur blanc-opaque ou crémeuse (Sánchez-Romero, 2018 ; Oulbi et *al.*, 2021) alors que le brunissement des masses est un signe d'accumulation des phénols conduisant à la nécrose des tissus ainsi que la perte de leur capacité embryogène (Trabelsi et *al.*, 2011). Néanmoins, cette couleur est généralement fonction de la luminosité durant l'incubation des cultures car les cals induits sous obscurité sont blanchâtres alors que sous photopériode la couleur est hétérogène mais principalement verdâtre (Brhadda et *al.*, 2003a) quoique la lumière est considérée inhibitrice de l'expression embryogène et induit plus d'organogenèse (Rugini et Caricato, 1995). Hegazi et *al.* (2017) ont observé que la couleur des cals du cultivar 'Coratina' varie avec la balance hormonale additionnée notamment le type d'auxine. En effet, en présence d'AIB ou 2,4-D les cals sont plus ou moins brunâtres alors qu'avec l'ANA la couleur est blanc-jaunâtre. Nos résultats corroborent parfaitement avec ces observations du fait que toutes les étapes d'induction de cals embryogènes sont conduites sous obscurité totale ; la couleur des cultures était blanc-opaque toutefois avec un certain brunissement variant d'une lignée à l'autre. De plus, les cultures induites en présence d'ANA présentent moins de brunissement par rapport à celles des autres auxines surtout en présence du 2,4-D (Tableau 3, Planches 6, 7 et 8).

De plus, indépendamment de l'explant source ; la texture nodulaire composée de nodules ou globules compacts de couleur blanchâtre, bien individualisés et facilement séparables dont la taille est plus ou moins moyenne donnant un aspect friable et granulaire à la culture est souvent considérée comme un marqueur de distinction des cals embryogènes d'olivier (Shibli et *al.*, 2001 ; Capelo et *al.*, 2010 ; Mazri et *al.*, 2013 ; Oulbi et *al.*, 2018 ; Pires et *al.*, 2020 ; Oulbi et *al.*, 2021). Par conséquent, les cals composés de globules compacts à consistance friable sont considérés comme embryogènes (Sánchez-Romero, 2018) du fait que l'analyse histologique des nodules révèle la présence de centres

d'activité méristématique périphériques et/ou internes (Brhadda et *al.*, 2007) alors que ceux trop friables et de couleur beige sont moins embryogènes (Brhadda et *al.*, 2008) quoique plus utiles pour les suspensions cellulaires (Trabelsi et *al.*, 2011). Récemment, Oulbi et *al.* (2021) ont trouvé que les cals embryogènes, en plus des caractères morphologiques (texture, structure, couleur, etc.), présentent une forte activité des peroxydases impliquées dans plusieurs processus physiologiques y compris la régénération. Dans notre cas, les 12 lignées de cals retenues comme embryogènes présentent des nodules de couleur blanche ou crémeuse de différentes tailles. Toutefois, la friabilité et la facilité de séparation de ces nodules varient d'une lignée à une autre allant du fortement compactes (Planche 9 C11 et C12) au très friables (Planche 9 C3).

Plusieurs facteurs notamment les régulateurs de croissance influencent le type de texture obtenue. En effet, Brhadda et *al.* (2003a) indiquent que les cals issus sous obscurité sont globulaires et friables alors que ceux issus sous photopériode sont plus compacts. De plus, Hegazi et *al.* (2017) et Oulbi et *al.* (2018) ont observé plus de nodules chez les cals induits en présence d'ANA que d'AIB en combinaison avec la Zéatine ou TDZ alors que Rugini (1988) indiquent que les cals issus d'embryons trop matures présentent des nodules qui augmentent de taille sans développer des embryons somatiques bien structurés (stade cotylédonaire). Nos résultats rejoignent ces observations car ce sont principalement les cals induits en présence d'AIB ou ANA en combinaison avec la Zéatine qui présentent des nodules alors que certaines lignées telles que C10 et C11 (Planche 9) possèdent des globules fortement accolées et de taille trop petites et très grandes respectivement. Ces lignées sont probablement induites à partir de radicules prélevées d'embryons isolés d'olives de maturité avancée.

1.2. Evaluation de la capacité embryogène

La capacité des cals embryogènes à maintenir une bonne prolifération cellulaire avec une production continue des embryons somatiques capables de régénérer des plantules entières est très importante pour leur utilisation dans les techniques d'amélioration par transformation génétique ou variation somaclonale (Peyvandi et *al.*, 2001). Par conséquent, une évaluation de la capacité embryogène des lignées de cals d'olivier obtenues à partir de radicules d'embryons zygotiques du cultivar 'Chemlal' s'est avérée indispensable pour sélectionner un matériel performant.

Pour ce faire, l'évaluation accompagnée d'essais d'optimisation ont porté essentiellement sur l'estimation de la capacité de prolifération cellulaire sur milieu liquide et solide sous différentes conditions de culture ainsi que la production, maturation et germination des ES ainsi que la multiplication des plants régénérés.

1.2.1. Prolifération cellulaire et production d'embryons somatiques

L'un des aspects importants des cultures embryogènes est leur capacité à maintenir indéfiniment une prolifération continue (Merkle *et al.*, 1995) à travers la formation de nouvelles masses embryogènes et via une embryogenèse somatique secondaire (Sánchez-Romero, 2019). En effet, malgré que cette prolifération n'est pas considérée comme une étape limitative dans le protocole de l'embryogenèse somatique ; toutefois le taux d'accroissement et la fréquence des repiquages sont des aspects importants avec des répercussions marquées sur l'application pratique de cette technique (Sánchez-Romero, 2019). En outre, la prolifération est déterminée par plusieurs facteurs liés à la formulation chimique du milieu de culture ainsi que l'addition d'hormones et autres composants mais beaucoup plus le génotype en culture (Merkle *et al.*, 1995 ; Sánchez-Romero, 2019).

1.2.1.1. Effet de la composition chimique du milieu de prolifération

Le maintien des cultures embryogènes est réalisée habituellement par des repiquages mensuels sur un milieu similaire à celui de l'initiation (Rugini et Baldoni, 2005) souvent à base des milieux OM et MS (Sánchez-Romero, 2019). Toutefois, la modification de la composition minérale et organique du milieu de culture ainsi que son type influence significativement l'efficacité de la culture (Trabelsi *et al.*, 2003 ; Brhadha *et al.*, 2007 ; Pérez-Barranco *et al.*, 2007).

- **Milieu solide**

En effet, à partir de 0.3 à 0.4 g de cal issu de radicules du cultivar 'Picual' ; Pérez-Barranco *et al.* (2007) indiquent qu'en dépit d'un taux de croissance élevé (0.8 g d'accroissement) obtenu sur le milieu OMc solide additionné d'AIB combiné avec le 2iP et BAP par rapport au milieu ECO (0.6 g) une croissance plus organisée est obtenue sur le milieu ECO montrant une texture plus friable. De même, Pérez-Barranco *et al.* (2009) indiquent un accroissement d'environ 0.5 g après un mois de culture sur ECO solide avec moins de 15% de nécrose. De plus, quoique Cerezo *et al.* (2011) n'ont pas observé une

différence significative entre l'accroissement moyen du poids frais estimé à 0.75 g sur ECO et OM ; ces auteurs indiquent que le brunissement des cultures est plus prononcé sur le milieu OM que ECO. En addition, Bradaï et *al.* (2016b) à partir de 0.2 g de cal ont obtenu jusqu'à 0.8 g d'accroissement chez plusieurs lignées âgées alors que les cultures jeunes prolifèrent moins. Néanmoins, sous les mêmes conditions précédentes, Mazri et *al.* (2012) ont obtenu de faibles accroissements de 0.02, 0.003 et 0.084 g respectivement à partir de 0.1 g de cal des racines des cultivars 'Picholine marocaine', 'Dahbia' et 'Arbequina' alors que les valeurs étaient nettement supérieures chez les lignées de cal issus des cotylédons des mêmes variétés. En addition, les cal issus des feuilles et pétioles du cultivar 'Dahbia' prolifèrent mieux sur le milieu ECO additionné d'AIB, BAP et 2iP que sur ½ MS (Mazri et *al.*, 2013).

Nos résultats confirment parfaitement l'effet bénéfique du milieu ECO solide sur l'accroissement du poids frais des trois lignées de cal testées. Un accroissement entre 0.16 et 0.3 g est enregistré à partir d'un inoculum de 0.1 g des trois lignées de cal sur le milieu ECO soit 0.6 à 0.9 g pour un inoculum de 0.3 g (Figure 2 A) ; rejoignant ainsi les résultats obtenus par Pérez-Barranco et *al.* (2007 et 2009) et Cerezo et *al.* (2011) sur le cultivar 'Picual'. Cependant, nos résultats sont nettement supérieurs à ceux de Mazri et *al.* (2012) ce qui confirme l'influence du génotype sur la capacité de prolifération (Sánchez-Romero, 2019) ainsi que la compétence des lignées âgées par rapport à celles trop jeunes comme l'ont suggéré Bradaï et *al.* (2016b).

En outre, un séjour prolongé sur le milieu OMc solide provoque non seulement la disparition des structures globulaires mais aussi un durcissement du cal suivi de son brunissement tandis que les masses embryogènes sur ECO solide continuent à former des structures globulaires de couleur blanc-opaques (Pérez-Barranco et *al.*, 2007 ; Cerezo et *al.*, 2011). De plus, Mazri et *al.* (2011) indiquent que les cal maintenus sur ECO présentent une bonne prolifération avec plus de structures nodulaires alors qu'aucune morphogenèse n'a été observée sur le milieu OM notamment en absence d'hormones. Toutefois, le transfert sur le milieu ECO additionné d'hormones permet de rétablir la capacité de prolifération du cal même après une nécrose et un arrêt de croissance (Pires et *al.*, 2020) en plus d'une bonne expression embryogène (Sánchez-Romero, 2018).

Ces observations concordent exactement avec notre cas où on a observé chez les cal mis en culture sur OM et particulièrement MS ; des masses cellulaires compactes

caractérisées par un brunissement plus marqué et une faible expression embryogène tandis que sur ECO la friabilité et l'expression embryogène du cal sont parfaitement maintenues (Planches 6 et 7).

Par conséquent, malgré que le milieu OMc ainsi que MS contiennent une teneur élevée en nutriments particulièrement les macroéléments, la balance nutritive du milieu ECO apparaît être plus adéquate pour maintenir les traits embryogènes du cal d'olivier (Pérez-Barranco et *al.*, 2007). Selon Cerezo et *al.* (2011) cet effet bénéfique du milieu ECO est peut être dû à sa faible teneur en macroéléments, notamment l'azote, induisant une situation de stress qui favorise la prolifération et le développement des structures embryogènes (Cerezo et *al.* 2011 ; Oulbi et *al.*, 2021).

- **Milieu liquide**

Les cultures embryogènes peuvent être maintenues sous agitation en culture liquide permettant la production d'un grand nombre de cellules compétentes ainsi qu'une meilleure organisation et synchronisation de la culture par filtration sur des grilles (Von Arnold, 2008 ; Sánchez-Romero, 2019 ; Palomo-Ríos et *al.*, 2021). En effet, Pérez-Barranco et *al.* (2007 et 2009) indiquent une prolifération exponentielle du cal de racicules du cultivar 'Picual' durant les trois semaines de culture sur ECO liquide additionné d'AIB, 2iP et BAP permettant jusqu'à 50% d'amélioration du poids frais par rapport au control solide estimé à 0.6 g. Ces auteurs ont obtenu près de 0.9 g d'accroissement à partir de 0.4 g d'inoculum soit plus de 0.2 g pour chaque 0.1 g d'inoculum. De même, Cerezo et *al.* (2011) considèrent qu'une incubation du cal pendant 4 semaines sur le milieu ECO sous agitation permet de produire un grand nombre d'embryons globulaires de grande taille.

Nos résultats rejoignent ces observations car après 4 semaines de culture en milieu ECO liquide, l'accroissement du poids frais varie entre 0.2 et 0.3 g selon la lignée du cal (Figure 2 B) soit près de 50% d'amélioration chez les lignées C2 et C3 par rapport au milieu solide dont l'accroissement était en moyenne 0.15 g (Figure 2 A). Cet effet bénéfique du milieu ECO liquide est en relation avec l'oxygénation assurée par l'agitation et la disponibilité des nutriments pour toutes les cellules. En revanche, une croissance lente est souvent observée sur le milieu solide du fait qu'une partie uniquement de la culture est en contact direct avec le milieu (Neumann et *al.*, 2009). De plus, la combinaison des formes organiques (hydrolysat de caséine) et inorganiques (KNO_3) du nitrogène améliore

significativement la prolifération des cals en culture liquide via la stabilisation du pH du milieu de culture (Trabelsi et *al.*, 2011).

Néanmoins, le milieu OMe et MS additionné d'ANA en combinaison avec la Zéatine sont utilisés respectivement pour la culture liquide des cals induits à partir de feuilles ou pétioles (Rugini et Caricato, 1995 ; Trabelsi et *al.*, 2011) et ceux des cotylédons d'olivier (Brhadda et *al.*, 2007). En outre, Trabelsi et *al.* (2011) indiquent que l'accroissement du poids frais de cals de feuilles du cultivar 'Chetoui' est plus élevé (7 g) sur OMe que sur le milieu B5 de Gamborg et *al.* (1968) avec moins de 1 g à partir d'un inoculum de 2 g alors que les cals des pétioles des cultivars 'Canino' et 'Moraiolo' ne prolifèrent pas bien sur le milieu OMe liquide et montrent une couleur jaunâtre en produisant moins d'embryons structurés (Rugini et Caricato, 1995). De plus, Brhadda et *al.* (2007) ont observé que les cals des cotylédons du cultivar 'Picholine Marocaine' prolifèrent mieux sur le milieu MS solide qu'en culture liquide.

Dans notre cas, les trois lignées réagissent plus en culture liquide que sur milieu solide indépendamment de la composition chimique testée. Ceci est peut être en relation avec l'origine du cal qui influence fortement la capacité embryogène du cal induit (Mazri et *al.*, 2011).

- **Production d'embryons somatiques**

Après un mois de culture sur le milieu ECO liquide, le nombre moyen d'embryons somatiques produits diffère d'une lignée à l'autre (Tableau 6). Selon Mitrakos et *al.* (1992) la morphogenèse chez le cal dépend de son âge et de son origine. En effet, les cals jeunes donnent plus d'embryons que les cals plus âgés qui perdent leur capacité d'expression embryogène avec le temps (Von Arnold, 2008). Dans ce sens, Bradai et *al.* (2016b) ont obtenu plus de 9 embryons en moyenne sur le milieu ECO à partir de 0.2 g de lignées jeunes de cals de radicules du cultivar 'Picual' âgées de 2 ans alors que les lignées âgées de plus de 8 ans donnent près de 8 embryons. De même, Pires et *al.* (2020) indiquent que le nombre d'ES produits par les cals de radicules du cultivar 'Galega Vulgar' augmentent avec les repiquages successifs sur le milieu ECO pour atteindre environ 25 embryons par cal lors du 3^{ème} repiquage. Dans notre cas, 33 à 72 embryons somatiques sont produits à partir d'un inoculum de 1 g de cal des différentes lignées testées après un mois de culture sur ECO liquide additionné d'hormones.

Nos résultats rejoignent les observations précédentes de Bradai et al. (2016b) sur les lignées jeunes du fait que les trois lignées testées ont moins de trois ans au cours de la réalisation des essais.

Des ES de différents stades de développement sont observés sur le même cal des différentes lignées cultivées sur milieu liquide ou solide (Tableau 7, Planche 20). Selon Mazri et al. (2011) la fragmentation et la subculture du cal sur le milieu ECO améliore fortement la formation des embryons somatiques d'une manière asynchrone car plusieurs stades de développement embryonnaire (globulaire, cordiforme et torpide) coexistent sur le même cal alors que d'autres atteignent le stade cotylédonaire avec des parties caulinaire et radiculaire bien visibles (Mazri et al., 2012). Les mêmes observations sont indiquées par Rugini (1988), Leva et al. (1995), Brhadda et al. (2007) et Pires et al. (2020). Ceci est dû selon Lambardi et al. (1999a) à la formation continue d'ES via l'embryogenèse secondaire répétitive d'où l'importance de la filtration des cultures après une culture liquide qui permet la production d'ES à des stades primaires de développement (globulaire, cordiforme ou torpide) prêts à passer en maturation (Trabelsi et al., 2011). Dans notre cas, les ES à des stades avancés de développement sont observés sur milieu solide alors que les stades globulaire, cordiforme et torpide sont obtenus notamment en culture liquide.

1.2.1.2. Effet de la balance hormonale

Le maintien en prolifération des cultures embryogènes d'olivier est rapportée sur des milieux de culture additionnés ou non d'hormones (Sánchez-Romero, 2019) quoique la présence de régulateurs de croissance semble être critique durant cette phase du processus (Lavee, 1977 ; Trabelsi et al., 2011) du fait qu'ils jouent un rôle important dans le développement des cellules embryogènes en embryons somatiques (Mazri et al., 2011). En effet, l'inclusion des hormones consiste normalement à des combinaisons auxines-cytokinines similaires à celles de l'induction mais avec des concentrations réduites puisque les fortes concentrations peuvent altérer le mode d'embryogenèse provoquant une perte du potentiel de régénération (Sánchez-Romero, 2019).

Isleem et Sadder (2005) indiquent que le cal d'olivier peut se multiplier sur le milieu OM de base même en absence de régulateurs de croissance bien que cette capacité dépend directement du contenu quantitatif et qualitatif hormonal endogène de l'explant. Cette observation concorde avec notre cas car les cals des trois lignées ont gardé une

certaine prolifération même en absence d'hormones notamment en culture liquide (Figure 3) caractérisée par une disponibilité des éléments nutritifs meilleure que sur milieu solide (Neumann et *al.*, 2009).

Cependant, la majorité des travaux en relation avec la multiplication des cals issus de divers types d'explants mentionnent l'addition d'une balance hormonale dans le milieu de prolifération. En effet, Lavee et Messer (1969) indiquent que les cals du cultivar 'Manzanillo' prolifèrent mieux en présence du minimum d'AIB notamment en combinaison avec une forte concentration de Kinétine aboutissant à plus de 0.4 g d'accroissement par rapport à 0.02 g en absence d'hormones. De même, la réduction de la concentration de l'AIB ou ANA en plus de la Zéatine et BAP dans le milieu OM a permis d'améliorer significativement la croissance des cals obtenus à partir d'embryons zygotiques des cultivars 'Moraiolo', 'Frantoio' et 'Dolce Agogia' (Rugini, 1988) et ceux des cotylédons des cultivars 'Tanche' et 'Picual' (Cañas et Benbadis, 1988). En outre, la combinaison hormonale contenant moins d'auxine (AIB) et riche en cytokinine (2iP et AIB) est largement utilisée pour la prolifération des cals induits à partir de radicules et cotylédons (Pérez-Barranco et *al.*, 2007 et 2009 ; Cerezo et *al.*, 2011 ; Mazri et *al.*, 2011 et 2012 ; Bradaï et *al.*, 2016b ; Toufik et *al.*, 2017 ; Pires et *al.*, 2020) et même de feuilles et pétioles de plusieurs cultivars (Rugini et Caricato, 1995 ; Mazri et *al.*, 2013 ; Toufik et *al.*, 2014).

Nos résultats d'accroissement du poids frais des cals des trois lignées rejoignent ces observations de l'effet bénéfique d'une balance hormonale contenant l'AIB comme auxine et riche en cytokinine (Zéatine et BAP) sur la prolifération cellulaire notamment en milieu liquide par rapport aux autres balances hormonales testées. Toutefois, l'effet de la balance additionnée dépend directement de sa composition du fait qu'en présence d'AIB la Zéatine permet une bonne prolifération du cal des différentes lignées en comparaison avec le TDZ alors qu'en présence de l'ANA l'effet s'inverse particulièrement pour la lignée C3 (Figure 3).

Nos observations corroborent avec ceux de Hegazi et *al.* (2017) indiquant l'existence d'une relation entre l'auxine et la cytokinine utilisées lors de la prolifération des cals de radicules et cotylédons du cultivar 'Coratina'. Ces auteurs ont obtenu les meilleurs poids frais des cals lorsque l'AIB ou l'ANA étaient en combinaison avec le TDZ alors que le 2,4-D réagit mieux en présence du 2iP. De même, nos résultats confirment

ceux de Mencuccini et *al.* (1991) et Shibli et *al.* (2001) indiquant que le maintien des cals des pétioles et racines des vitrosemis d'olivier respectivement en présence du TDZ avec l'ANA permet le développement de cal volumineux.

1.2.1.3. Effet de la concentration du saccharose

La source du carbone affecte non seulement l'induction de cal mais aussi leur prolifération cellulaire par la suite. Chez plusieurs espèces y compris l'olivier, le saccharose était souvent utilisé durant tout le processus de l'embryogenèse somatique (Brhadda et *al.*, 2008). Toutefois, peu d'études sont réalisées sur l'influence de ce sucre sur la prolifération des cals d'olivier durant leur maintien après induction.

En effet, l'augmentation de la concentration du saccharose stimule la callogenèse même en absence d'hormones (Grossoni, 1979). De plus, Shibli et *al.* (2001) indiquent que le doublement de la concentration du saccharose de 30 à 60 g l⁻¹ dans le milieu de culture améliore significativement le nombre d'embryons produits par les cals du cultivar 'Nabali' alors qu'une concentration trop élevée affecte négativement l'expression embryogène chez les cals. De même, 30 à 40 de saccharose permet une bonne prolifération et production d'ES des cals du cultivar 'Chetoui' (Trabelsi et *al.*, 2003). Selon ces auteurs, le saccharose influence indirectement l'embryogenèse secondaire par l'induction des cellules non-embryogènes. Cependant, Brhadda et *al.* (2008) ont observé que l'augmentation de la concentration du sucre au-delà de 30 g l⁻¹ améliore la callogenèse mais pas l'expression embryogène. Par conséquent, la majorité des études indiquent l'addition de 20 à 30 g l⁻¹ de saccharose au milieu ECO pour la prolifération des cals des racines (Cerezo et *al.*, 2011 ; Mazri et *al.*, 2011 et 2012 ; Hegazi et *al.*, 2017 ; Toufik et *al.*, 2017 ; Pires et *al.*, 2020), de cotylédons (Mazri et *al.*, 2011 et 2012) ainsi que les feuilles et pétioles (Mazri et *al.*, 2013 ; Oulbi et *al.*, 2018) de plusieurs cultivars d'olivier.

Récemment, Bradaï et *al.* (2023) indiquent qu'une préculture en présence du saccharose notamment en milieu liquide améliore non seulement la prolifération du cal embryogène mais aussi la récupération des lignées cellulaires après cryoconservation suite à l'accumulation du sucre dans les cellules des embryons somatiques.

Nos résultats confirment ces observations du fait que le doublement de la concentration du saccharose permet d'augmenter proportionnellement l'accroissement du

poids frais des cals quoique une dose dépassant 20 ou 30 g l⁻¹ n'améliore pas significativement la prolifération cellulaire des lignées mais favorise beaucoup plus l'apparition d'ES plus matures (cotylédonaire) tout en réduisant le degré de nécrose des cultures notamment en suspension (Figure 4, Planche 16).

1.2.1.4. Effet de l'addition du charbon actif (CA)

L'addition du charbon actif au milieu de culture des tissus permet d'améliorer la croissance et développement cellulaires de plusieurs espèces (Thomas, 2008) principalement via la réduction du brunissement des explants suite à l'adsorption des substances inhibitrices principalement les composés phénoliques libérées par les cultures dans le milieu tout en améliorant la fréquence d'organogenèse (Merkle et al., 1995 ; Kaur et al., 2018).

Chez l'olivier, le CA est souvent utilisé durant la phase de maturation des ES pour diminuer les effets des auxines résiduelles (Pérez-Barranco et al., 2007) quoique l'addition du CA durant le processus améliore significativement l'obtention de cals embryogènes (Maalej et al., 2002) avec un effet bénéfique sur l'entretien de leur capacité embryogène (Benelli et al., 2001). En effet, Pérez-Barranco et al. (2007) indiquent que la culture du cal des radicules du cultivar 'Picual' sur un milieu ECO contenant 1 g l⁻¹ du CA provoque un changement radical dans son mode de multiplication d'une prolifération cellulaire cyclique avec formation d'ES à des stades de développement primaires (globules) vers la production d'ES blanc-opaques à des stades de développement avancés qui peuvent même germer sur le milieu comme un signe d'une forte embryogenèse somatique secondaire (Rugini et Silvestri, 2016). De même, Benelli et al. (2001) ont trouvé que les lignées embryogènes du cultivar 'Canino' cultivées sur un milieu OMc additionné de 0.1% charbon actif sont moins brunies et capables de différencier des embryons à des stades de développement avancés.

De ce fait, l'effet du CA sur le processus semble être qualitatif que quantitatif puisque Benzekri et Sánchez-Romero (2012) indiquent que l'étalement de masses embryogènes du cal du cultivar 'Picual' sur un milieu ECO additionné de CA à 1 g l⁻¹ n'affecte pas le nombre total d'ES produits mais améliore significativement leur capacité germinative par la suite. De plus, Mazri et al. (2013) considèrent que l'addition du CA au milieu ECO dépourvu d'hormones n'est pas significativement adéquate à la prolifération

des cals des feuilles du cultivar 'Dahbia' en dépit de la néoformation de bourgeons sur les masses cellulaires.

Nos résultats corroborent en partie avec ces observations. En effet, l'incorporation du charbon actif dans notre cas au milieu ECO additionné d'hormones améliore significativement la prolifération des cals des trois lignées testées notamment en culture liquide (Figure 5). Cet effet bénéfique peut être en relation avec la présence des régulateurs de croissance qui n'ont pas été ajoutés dans le cas de Mazri et *al.* (2013). De plus, en présence du CA ; le brunissement des masses cellulaires est nettement réduit en plus de l'apparition d'ES blanc-opaques bien structurés à des stades de développement très avancés (Cotylédonaires) confirmant ainsi l'effet qualitatif du CA sur le processus (Planche 17).

1.2.1.5. Effet de la durée d'incubation des cultures

L'établissement d'une culture embryogène compétente chez l'olivier nécessite un temps considérable notamment son maintien en prolifération continue (Bradaï et *al.*, 2016b) dont la durée et la fréquence des repiquages peuvent avoir des effets importants sur la capacité embryogène (Sánchez-Romero, 2019). En effet, la durée d'incubation des masses cellulaires en culture avant de les transférer sur un nouveau milieu est déterminée par plusieurs paramètres liés au cal tels que sa croissance cellulaire ainsi qu'aux conditions de culture notamment l'épuisement du milieu.

Afin d'éviter le brunissement induit par l'accumulation des exsudats phénoliques, Shibli et *al.* (2001) repiquent les cals du cultivar 'Nabali' chaque trois semaines sur un milieu MS solide additionné d'ANA en combinaison avec le 2,4-D et BAP. Ces auteurs indiquent que l'accroissement du poids frais augmente proportionnellement avec la durée d'incubation des cultures et avec les repiquages successifs notamment chez les cals issus des racines. Toutefois, après 2 à 3 sub-cultures (6-9 semaines) l'accroissement du poids frais tend à se stabiliser avec une réduction significative du nombre d'embryons isolés. De même, Pérez-Barranco et *al.* (2009), Cerezo et *al.* (2011) et Bradaï et *al.* (2016b) suggèrent 4 à 6 semaines pour le transfert des cals des radicules du cultivar 'Picual' sur le milieu ECO solide pour réduire le brunissement des masses cellulaires tout en gardant un accroissement du poids frais plus ou moins stable avec une formation continue des structures embryogènes. De plus, Trabelsi et *al.* (2003) indiquent que 4 à 5 semaines est la

meilleure durée pour une bonne prolifération et production d'embryons somatiques à partir de cals de cotylédons des cultivars 'Chetoui', 'Chemleli' et 'Arbequina' sur le milieu OMc additionné d'AIB et 2iP. Récemment, Pires *et al.* (2020) ont observé une augmentation significative du nombre d'ES produits par les cals des radicules du cultivar 'Galega Vulgar' avec la durée de culture sur le milieu ECO solide quoique après 4 mois (16 semaines) une forte réduction de l'expression embryogène des cals est remarquée. Pour rétablir cette perte de la capacité embryogène ; ces auteurs préconisent de passer les cals pendant un mois sur le milieu OMc d'induction ensuite les remettre sur le milieu ECO. Au bout du 3^{ème} mois de culture, les cals ont montré un rétablissement de leur capacité à produire plus d'ES.

Nos résultats concordent parfaitement avec ces observations puisque les cals des trois lignées testées présentent une augmentation proportionnelle de leur accroissement du poids frais avec la durée de culture avec une stabilité après 6 à 10 semaines d'incubation (Figure 6 A) néanmoins à partir de 6 à 8 semaines la vitesse de prolifération des lignées diminue (Figure 6 C) suite au début de brunissement des cultures qui, toutefois, gardent leur capacité à former des structures embryogènes à des stades de développement avancés (Planche 18).

Selon Trabelsi *et al.* (2011) les cultures en suspension sont soumises aux oxydations phénoliques dès les premiers jours causant ainsi leur brunissement rapide. Cependant, à partir de la deuxième semaine la croissance reprend avec une faible division cellulaire particulièrement en présence d'hormones. De ce fait, Rugini et Caricato (1995) ont maintenu les cals issus des pétioles des cultivars 'Canino' et 'Moraiolo' par des repiquages chaque 3 semaines sur le milieu OMe liquide additionné d'hormones afin d'éviter la nécrose des tissus. De même, Pérez-Barranco *et al.* (2007 et 2009) et Cerezo *et al.* (2011) indiquent que le cal embryogène issu des radicules du cultivar 'Picual' tolère bien des périodes de culture en milieu liquide sous agitation pendant 3 à 4 semaines favorisant la formation de petits embryons globulaires libres avec un accroissement plus élevé (0.9 g) par rapport à la culture sur milieu solide (0.5 à 0.6 g).

Nos résultats confirment ces observations. Dans notre cas, toutes les lignées testées prolifèrent mieux en culture liquide que sur milieu solide (Figure 6 A et B). Néanmoins, des durées de culture dépassant 3 à 4 semaines n'améliorent pas vraiment l'accroissement du poids frais mais provoquent au contraire un brunissement des masses cellulaires

(Planche 19) avec une forte diminution de la vitesse d'accroissement du poids frais (Figure 6 D).

La majorité des études indiquent que le maintien continu des cals d'olivier sur le milieu de prolifération notamment solide induit une diminution graduelle de leur potentiel embryogène (Bradaï *et al.*, 2016b ; Pires *et al.*, 2020) en plus de l'apparition de variations phénotypiques et génétiques chez les plantes qui en dérivent (Bradaï *et al.*, 2016a ; Bradaï *et al.*, 2019). Selon Bhojwani et Razdan (1996), Litz *et al.* (2005) et Von Arnold (2008) les cultures cellulaires embryogènes prolongées montrent des variations de croissance, une diminution de la qualité embryonnaire et une perte progressive du potentiel embryogène ainsi qu'un changement du mode de prolifération qui se traduit par une réduction significative du potentiel de régénération (Bradaï *et al.*, 2016b ; Sánchez-Romero, 2018). Cette perte de potentiel embryogène est généralement corrélée à une altération de l'équilibre hormonal endogène, une modification de la sensibilité aux auxines exogènes appliquées (Bhojwani et Razdan, 1996).

1.2.2. Différenciation et maturation des embryons somatiques

Malgré que la conversion des embryons somatiques en plantules n'exigent pas une phase de maturation rigoureuse (Sánchez-Romero, 2018 ; Pires *et al.*, 2020) ; la différenciation des embryons somatiques lors de cette étape est significativement influencée par plusieurs facteurs notamment ceux liés au matériel végétal tels que le génotype, l'origine et l'âge de la culture (Mazri *et al.*, 2012 ; Bradaï *et al.*, 2016b ; Sánchez-Romero, 2019) mais aussi les conditions de culture (Cerezo *et al.*, 2011 ; Benzekri et Sánchez-Romero, 2012 ; Mazri *et al.*, 2020) impliquées dans les changements morphologiques et biochimiques incluant la déposition de protéines de réserves, répression de germination et acquisition d'une tolérance à la dessiccation (Braybrook et Harada, 2008).

Après 8 semaines de maturation sur un milieu ECO solide sans hormones et additionné de 1 g l⁻¹ de CA, Cerezo *et al.* (2011) indiquent que 49 à 57% des pro-embryons des cals de radicules du cultivar 'Picual' développent en moyenne 1.7 à 2.2 embryons matures en plus d'environ de 6% des embryons se nécrosent. De même, Bradaï *et al.* (2016b) ont observé que l'efficacité de la maturation diminue significativement chez les lignées âgées en plus d'un déclin du nombre et de la qualité des embryons par rapport aux

lignées jeunes. En outre, à partir d'un pro-embryon, les cultures âgées produisent en moyenne jusqu'à 3 embryons matures généralement de petite taille alors que les jeunes lignées produisent plus de 5 ES matures de grande taille. Ces mêmes conditions ont permis à Narváez *et al.* (2019) d'obtenir plus de 59% de maturation chez les embryons globulaires d'oléastre. De plus, à partir des cals de radicules des cultivars 'Dahbia' et 'Arbequina', Mazri *et al.* (2012) ont observé une augmentation de la taille des ES matures produits après chaque maturation sur le milieu ECO suivant la prolifération de cals. Récemment, Mazri *et al.* (2020) ont trouvé que l'addition d'hormones au milieu de maturation ECO induit une embryogenèse secondaire et améliorer le nombre d'ES matures récupérés à partir d'embryons globulaires du cultivar 'Dahbia'.

Ces observations corroborent en partie nos résultats particulièrement pour les lignées C2 et C3 ont montré 44 et 48% de pro-embryons en maturation ayant produit toutefois entre 1.3 et 2.6 embryons matures respectivement avec 7.4% d'explants nécrosés (Tableau 7). Néanmoins, la lignée C1 a présenté une faible capacité de maturation (11.1%) et une forte prolifération (74.1%) par rapport aux deux autres lignées évaluées. Selon Rugini *et al.* (2005) certains pro-embryons sur le milieu de maturation présentent une nécrose marquée ou une prolifération cellulaire sans induire aucune différenciation morphogénique.

Dans notre cas, après deux mois en culture ; un pro-embryon mis en maturation produit souvent plus d'un embryon mature particulièrement chez les lignées C2 et C3 (Planche 21 d-e et f). Nos résultats confirment ceux de plusieurs auteurs indiquant qu'un embryon somatique au stade globulaire ou cordiforme est considérée comme une structure pro-embryonnaire qui peut continuer sa maturation normalement pour se développer vers un stade bipolaire (Torpide) rattaché aux tissus via sa partie radiculaire à l'aide d'un suspenseur (Lambardi *et al.*, 1999a ; Brhadha *et al.*, 2007) facilement séparable au stade cotylédonaire parfait (Benelli *et al.*, 2001 ; Toufik *et al.*, 2014) ou générer plus d'un ES par embryogenèse somatique secondaire (Mazri *et al.*, 2020) vu la présence de primordia d'ES localisées dans sa couche épidermique ou sub-épidermique (Benelli *et al.*, 2001 ; Peyvandi *et al.*, 2001 et 2008 ; Capelo *et al.*, 2010).

Par conséquent, les embryons somatiques bien développés de couleur blanchâtre avec une surface lisse peuvent se former séparément ou groupés en cluster de plusieurs

embryons (Rugini et Caricato, 1995 ; Shibli et *al.*, 2001 ; Brhadda et *al.*, 2003a ; Toufik et *al.*, 2014 ; Sánchez-Romero, 2018).

Certaines formes de fusion de plusieurs embryons ensemble notamment leurs bases (Planche 20 g et h et Planche 21 k) ou la présence de plus de deux cotylédons (Planches 9 et 11) sont observées. En effet, telles anomalies morphologiques notamment la fusion des ES sont souvent signalées par plusieurs auteurs (Benelli et *al.*, 2001 ; Peyvandi et *al.*, 2008). Rugini et Caricato (1995) mentionnent la fusion des bases des embryons somatique des cultivars ‘Canino’ et ‘Moraiolo’ formant des tératomes capables de germer et donner des plantules. De même, Trabelsi et *al.* (2003) ont observé des embryons somatiques avec plusieurs cotylédons chez les cals des cotylédons du cultivar ‘Chetoui’. En revanche, ces malformations sont en relation directe avec l’embryogenèse somatique secondaire observée même chez les ES au stade de développement avancé ‘cotylédonaire’ (Lambardi et *al.*, 1999a ; Brhadda et *al.*, 2003a ; Peyvandi et *al.*, 2008).

1.3. Germination des embryons somatiques et régénération de plantules

La germination des embryons somatiques est réalisée sur des milieux ressemblent à ceux utilisés pour les embryons zygotiques souvent à base des formulations chimiques du OM et MS solide ou liquide et caractérisés par une concentration réduite en sels minéraux (Sánchez-Romero, 2019) et généralement dépourvus d’hormones (Toufik et *al.*, 2017). Toutefois, les faibles taux de conversion restant le grand obstacle du processus (Rugini et *al.*, 2005 ; Palomo-Ríos et *al.*, 2021) sont principalement dus à des déficiences dans la phase du développement embryonnaire induisant des anomalies morphologiques ou des déficiences d’accumulation de produits de réserve (Merkle et *al.*, 1995 ; Sánchez-Romero, 2018). Cette mauvaise qualité des ES peut être induite par les conditions de culture mais aussi par le génotype (Bradaï et *al.*, 2016b).

a. Entrée en germination et émergence racinaire

Selon Rugini (1988) la germination et le développement des plantules à partir d’ES d’olivier est plus rapide sur le milieu OM que MS. De même, Rugini et Caricato (1995) indiquent que les ES issus des pétioles des cultivars ‘Canino’ et ‘Moraiolo’ germent après 1 à 2 semaines sur le milieu OM avec augmentation de leur taille et verdissement dès les premiers jours d’incubation et donnent des plantules de 2 à 3 nœuds au bout d’un mois de

leur mise en culture. De plus, Toufik et *al.* (2017) ont observé un verdissement des ES dès les premiers jours avec une augmentation du volume notamment des cotylédons suivie du développement de la racine à partir de la 2^{ème} semaine de culture sur ECO qui est à base de la composition chimique du milieu OMe. Toutefois, sur un milieu ½ MS solide sans hormones, Orinos et Mitrakos (1991) indiquent une germination des ES de radicules d'oléastre après 10 à 15 jours produisant des plantules avec 8 à 10 feuilles après plus de sept semaines de culture. De même, Shibli et *al.* (2001) ont observé les premières feuilles après plus de 2 semaines de culture des embryons des racines du cultivar 'Nabali' sur MS sans hormones.

Ces observations concordent en partie avec nos résultats indiquant un verdissement et un gonflement des ES dès la première semaine de culture (Planche 22 b et c) suivis de l'élongation de la racine dès la 2^{ème} semaine ainsi qu'une entrée en germination des ES plus rapide sur le milieu OM (2 à 3 semaines) par rapport au milieu MS (plus de 3 semaines) en absence d'hormones tandis que l'addition des régulateurs de croissance permet une légère accélération du processus de la germination des ES (Tableau 8, Planche 22 a).

b. Taux de germination et développement des plants

Plusieurs travaux mentionnent des taux de germination d'ES souvent faibles quoiqu'ils diffèrent suivant les conditions de culture, génotypes ainsi que la qualité des embryons utilisés.

En effet, sur un milieu ½ MS, Jafarzadeh-Bajestani et *al.* (2011) ont obtenu moins de 6% de germination chez les ES des radicules du cultivar 'Zard' n'ayant pas passés une phase de maturation alors qu'une dessiccation des ES pendant trois jours permet d'améliorer la régénération à près de 50% avec formation de plantules enracinées et portant 6 à 8 feuilles. De même, Benzekri et Sánchez-Romero (2012) ont trouvé qu'une maturation des ES du cultivar 'Picual' sur un milieu additionné du charbon actif et gélifié avec 9 à 12 g l⁻¹ de Phytigel induit une bonne dessiccation des embryons générés et permet une nette amélioration de leur germination sur le milieu de Clavero-Ramírez et Pliego-Alfaro (1990) consistant en MS sans hormones et dont les macroéléments sont réduits à ½ en plus de 10 g l⁻¹ de sucre. Ces auteurs ont obtenu entre 30 et 60 % de germination après six semaines de culture. Additivement, en présence de 3 g l⁻¹ de Phytigel Cerezo et *al.*

(2011) ont obtenu 12.5% de germination d'ES du cultivar 'Picual' après 12 semaines alors que plus de 50% des embryons forment des cals. Néanmoins, l'étalement des ES sur une membrane semi-perméable d'acétate de cellulose durant le premier mois de maturation permet une adéquate déshydratation et une bonne structuration aboutissant à une amélioration significative de la germination et de la qualité des plants portant une racine et 6 à 8 feuilles. Ces conditions ont permis à Narváez et *al.* (2019) d'avoir plus de 35% de germination chez les ES d'oléastre. De plus, sur $\frac{1}{3}$ MS sans hormones Hegazi et *al.* (2017) ont obtenu moins de 13% de germination des ES du cultivar 'Coratina'.

Nos résultats obtenus sur le milieu MS solide sont relativement proches de ces observations puisque 25% des ES uniquement ont germé en absence d'hormones alors que la germination est fortement réduite sur milieu MS liquide où moins de 19% de germination est obtenue. En outre, la faible faculté germinative observée dans cette étude est probablement due au fait que les embryons sont utilisés directement après leur maturation sans subir une dessiccation permettant la synchronisation de la germination des ES ou à cause d'un manque d'imbibition particulièrement en culture liquide (Merkle et *al.*, 1995).

En revanche, malgré que la germination des ES est réalisée en absence d'hormones dans la majorité des études ; Rugini (1995) recommande l'addition de 2 mg l⁻¹ de Zéatine au milieu MS solide pour booster la germination des ES. De même, Trabelsi et *al.* (2003) et Brhadda et *al.* (2003a, 2007 et 2008) affirment que les ES des cotylédons des cultivars 'Chetoui', 'Chemlali' et 'Arbequina' ainsi que 'Picholine Marocaine' germent plus facilement respectivement sur le milieu OM et MS avec 0.5 mg l⁻¹ de Zéatine et donnent des plantules enracinées avec de 2 à 4 feuilles alors qu'un milieu dépourvu d'hormones et riche en sucre induit plus de prolifération chez les ES. Dans notre cas, la présence d'une combinaison de la BAP avec l'AIB particulièrement en milieu OM solide améliore légèrement la germination des ES mais beaucoup plus le développement des plantules obtenues alors que l'inverse se produit en culture liquide où l'addition d'hormones réduisent faiblement la conversion à partir des ES. Par conséquent, l'inclusion des hormones notamment les cytokinines dans le milieu de germination est directement déterminée par le degré de maturité des ES (Merkle et *al.*, 1995). Dans ce sens, Bradai et *al.* (2016b) soulignent que les ES blanc-opaques bien structurés (bipolaires ou cotylédonaire) germent facilement (100%) sur MS sans hormones contrairement aux

embryons moins développés (globulaires) dont la germination varie entre 30 et 70%. Ces observations sont confirmées par Toufik et *al.* (2017) indiquant que la présence de régulateurs de croissance notamment de la Zéatine dans le milieu OMe n'est pas indispensable pour la germination des ES globulaires du cultivar 'Dahbia' et peut même inhiber l'émergence de leurs racines tandis que l'utilisation d'embryons cotylédonaire bien structurés permet environ 25% de germination produisant des plantules bien enracinées avec 2 à 6 feuilles après 8 à 12 semaines. De même, Pires et *al.* (2020) ont obtenu 60% de germination des ES cotylédonaire et issus des radicules du cultivar 'Galega Vulgar' après 12 semaines de culture sur un milieu OMc sans hormones produisant des plantules normales avec des racines et une partie aérienne bien développée comportant plusieurs feuilles. Récemment, Mazri et *al.* (2020) ont démontré l'effet du type des régulateurs de croissance ainsi que leur combinaison sur la germination des ES des radicules du cultivar 'Dahbia' sur ½ OM. En outre, l'addition de l'ANA avec GA3 permet 40 à 45% de conversion tandis que la Zéatine seule inhibe la germination et provoque une forte nécrose des explants et ce quelque soit sa concentration.

c. Régénération et acclimatation des plantules après germination des ES

Au cours de cette étude, des plantules sans anomalies phénotypiques et possédant plusieurs feuilles bien développées et des racines très longues plus ou moins ramifiées sont obtenues à partir d'embryons somatiques d'olivier après plus de huit semaines de culture. Chez l'olivier, la majorité des études montrent qu'un embryon somatique individualisé génère un seul plant après sa germination toutefois Bradaï et *al.* (2016b) et Hegazi et *al.* (2017) indiquent qu'il est possible d'avoir plus d'une pousse à partir d'un seul embryon somatique germé sur lequel une callogenèse basale se développe. De même, Mazri et *al.* (2020) ont observé la formation de bourgeons adventifs et d'embryons secondaires sur les cals développés à la partie radulaire des embryons notamment en présence d'hormones. La séparation et le repiquage de ces néoformations sur un milieu neuf permet leur développement en plantules.

Dan notre cas, chaque ES germé produit un plant dont les parties caulinaires et racinaires sont bien distinctes (Planche 22 d et j) quoique les embryons cultivés en présence d'hormones développent un cal à la zone basale en contact avec le milieu notamment solide toutefois sans formation de bourgeons ou d'embryogenèse secondaire.

Plusieurs travaux affirment que les plantules régénérées par embryogenèse somatique présentent un phénotype stable et similaire à celui des plantes mères (Brhadda et *al.*, 2003a et 2008) produites par microbouturage (Shibli et *al.*, 2001) et par méthodes conventionnelles de propagation (Leva et *al.*, 1995). De plus, en dépit de leur fragilité, ces vitroplants s'acclimatent facilement aux conditions naturelles et montrent une croissance normale sous serre (Brhadda et *al.*, 2007 ; Pires et *al.*, 2020) et un bon développement après transfert sur champ (Leva et *al.*, 1995 ; Leva, 2009). Toutefois, Leva (2009) et Bradaï et *al.* (2016a) indiquent l'apparition de plusieurs variations morphologiques et structurelles chez les plantes issues des ES de lignées cellulaires maintenues durant une longue période en prolifération quoique leur développement *in vitro* après germination apparaît identique à celui des vitrosemis issus des embryons zygotiques (Bradaï et *al.*, 2016b). De même, Bradaï et Sánchez-Romero (2021a) indiquent que les embryons somatiques du cultivar 'Picual' issus après un long séjour *in vitro* génèrent après 12 semaines des plantules de petite taille variant entre 0.9 et 1.2 cm mais avec des racines qui peuvent dépasser 3 cm de longueur.

Dans notre cas, les plantes régénérées malgré leur taille réduite notamment en absence d'hormones ont montré un phénotype normal (phyllotaxie, forme de feuilles, etc.) sans aucune anomalie morphologique durant la culture *in vitro* (Planche 22 j) ainsi qu'une acclimatation plus ou moins facile notamment chez les vitroplants bien développés (Planche 22 k et l).

1.4. Micropropagation et acclimatation des plantules régénérées

Les plants issus de la germination des ES peuvent être directement acclimatés aux conditions naturelles mais aussi multipliés et enracinés d'une manière identique à celle des pousses obtenues par microbouturage (Bradaï et *al.*, 2016b). Toutefois, la multiplication *in vitro* des plantules régénérées par embryogenèse somatique est peu pratiquée du fait que la majorité des études décrivent l'acclimatation des plants directement après germination. En effet, le milieu DKW (Driver et Kuniyuki, 1984) modifié par Revilla et *al.* (1996) additionné d'une balance hormonale plus riche en cytokinine est souvent utilisé malgré que la formulation chimique du milieu OM (Rugini, 1984) est fréquemment employée pour la micropropagation de plusieurs cultivars d'olivier (Vidoy-Mercado et *al.*, 2012 ; Lambardi et *al.*, 2013) vu sa richesse nutritive notamment en micro-éléments (Rugini et *al.*, 2020).

a. *Débourrement des microboutures et développement des pousses obtenues*

La capacité de multiplication des cultures *in vitro* est déterminée par le nombre et la taille des pousses produites à partir de chaque microbouture. De plus, cette capacité est fortement dépendante du génotype mais influencée beaucoup plus par les conditions de culture notamment la présence des régulateurs de croissance. Pérez-Barranco *et al.* (2009) et Cerezo *et al.* (2011) indiquent que les microboutures prélevées après germination des ES du cultivar 'Picual' présentent près 25% de réactivité après 12 semaines de culture sur le milieu DKW additionné de 1 mg l^{-1} BAP et 0.01 mg l^{-1} AIB avec le débourrement des 2 bourgeons dont la hauteur moyenne des pousses obtenues varie entre 0.72 et 1.38 cm. Sous les mêmes conditions, Bradai *et al.* (2016b) ont démontré que la multiplication des plantules issues de la germination des ES est significativement influencée par le génotype (lignée de cal) et l'âge de la culture. Ces auteurs ont obtenu plus de bourgeons axillaires débouffés produisant des pousses vigoureuses atteignant 7 cm de taille à partir de jeunes cultures alors que moins de bourgeons réactifs chez les lignées âgées donnant de petites pousses.

Ces observations corroborent avec nos résultats puisque les deux lignées utilisées ayant de moins de trois ans présentent une réactivité significativement différente sur un milieu DKW additionné de BAP et AIB avec près de 2 bourgeons réactifs par microboutures générant des pousses dépassant 3 cm de taille avec plusieurs feuilles cependant après 8 semaines de culture sans renouvellement du milieu de multiplication (Tableau 9, Planche 20).

Récemment, Narváez *et al.* (2018) ont évalué le développement *in vitro* des boutures bi-nodales prélevées de plantules régénérées après transformation génétique sur un milieu RP consistant en DKW modifié par Roussos et Pontikis (2002) et additionné de Zéatine. Après 8 semaines, les explants génèrent en moyenne deux pousses axillaires d'environ 5 cm de long portant 8 à 10 feuilles. Ces résultats concordent parfaitement avec notre cas où la présence de la Zéatine s'est avérée plus efficace que la BAP pour le débourrement (100%) et développement des pousses ayant 4 à 5 cm de long et 8 feuilles en moyenne et ce indépendamment de la lignée du cal ou de la composition chimique du milieu (Tableau 9 et 9). En revanche, nos résultats concordent aussi avec les résultats obtenus par plusieurs auteurs sur l'effet bénéfique de la Zéatine ainsi que la formulation

chimique du milieu OM sur la stimulation rapide des bourgeons axillaires lors de la multiplication *in vitro* de plusieurs variétés (Lambardi et al., 2013 ; Rugini et al., 2020).

b. Callogenèse basale et enracinement des microboutures

Dans cette étude, les microboutures introduites sur des milieux solides notamment additionnés de régulateurs de croissance produisent des cals verdâtres de différentes tailles sur lesquels des racines se développent. Nos observations confirment celles de Pérez-Barranco et al. (2009), Cerezo et al. (2011) et Bradai et al. (2016b) indiquant la formation d'un cal verdâtre plus ou moins large à la base des microboutures des ES du cultivar 'Picual' après 12 semaines de culture sur le milieu DKW en présence d'hormones, accompagnée souvent de l'émission d'une ou plusieurs racines. Cependant, en suivant la méthode de Revilla et al. (1996) ; le transfert de pousses bien développées (1.5 cm) en présence d'AIB seule permet une apparition de racines après 8 à 10 jours sur de petits cals avec formation de 2 à 3 racines suivant la lignée de cal. Ces résultats corroborent en partie avec notre cas où les racines apparaissent après plus de 3 semaines de l'initiation des cultures (Tableau 10, Planche 20) et après 9 à 12 jours du débourrement des boutures ayant générées des pousses assez développées (1.7 à 3.1 cm) avec plusieurs feuilles (2.7 à 3.4) (Tableau 9, Planche 20). Selon Bhojwani et Razdan (1996) les pousses ont besoin d'atteindre une taille minimale pour s'enraciner facilement du fait que les petites plantes peuvent ne pas survivre lors de l'acclimatation.

En effet, l'enracinement de l'olivier *in vitro* peut se faire en une phase par l'utilisation de pousses allongées sur un milieu avec auxine généralement l'AIB ou l'ANA (Revilla et al., 1996) ou en deux étapes impliquant une induction racinaire pendant 2 semaines en présence d'auxine particulièrement l'AIB suivie d'un transfert en absence d'hormones pour l'élongation des racines induites (Cañas et al., 1987). Selon Sánchez-Romero (2018) l'enracinement des pousses assez développées issus des ES peut être réalisé sur un milieu DKW additionné d'AIB pendant une semaine sous obscurité suivi d'un transfert en conditions de photopériode.

Toutefois, nos résultats démontrent la possibilité d'avoir un bon développement de pousses avec enracinement acceptable (Tableau 9 et 10, Planche 20) en une seule phase de culture sur un milieu contenant une balance hormonale riche en cytokinine qu'en auxine ce qui confirme l'importance du génotype (cultivar et lignée cellulaire) et de la composition

chimique du milieu dans la réussite de la technique à produire des plants aptes à passer en acclimatation. De plus, le choix d'une combinaison hormonale adéquate reste un élément fondamental dans le développement et l'enracinement des plantules.

2. Variation somaclonale par le filtrat de la culture de *Verticillium dahliae* Kleb.

La variation somaclonale peut être une source très importante pour augmenter la variabilité génétique existante chez l'olivier. Cependant, jusqu'à ce jour peu d'études sur l'induction de variants somaclonaux sont réalisées chez cette espèce (Rugini et Gutiérrez-Pesce, 2006). Plusieurs facteurs peuvent influencer le succès de l'induction de la variation somaclonale, généralement liés à l'espèce (génotype, explant, etc.), à l'agent inducteur (composition, concentration, etc.) ainsi qu'aux conditions d'induction (durée du traitement, type et composition chimique du milieu de sélection, etc.).

Dans notre étude, le filtrat brut du milieu de culture de deux souches de *Verticillium dahliae* Kleb. est utilisé comme agent sélectif pour induire des variants somaclonaux chez les cals embryogènes de trois lignées. La sélection est appliquée soit en milieu liquide pendant trois semaines avant de transférer les cals sur un milieu solide sans filtrat, ou une sélection continue sur milieu solide contenant différentes concentrations du filtrat par des repiquages successifs chaque trois semaines. En outre, le succès de l'induction de la variation somaclonale par sélection *in vitro* dépend de plusieurs facteurs relatifs au génotype en culture ainsi qu'à l'agent sélectif et notamment sa nature, concentration en plus de la méthode et la durée de la sélection appliquée (Baldoni et Rugini, 2002).

Types de culture et de sélection

Plusieurs types de tissus peuvent être utilisés en sélection *in vitro* quoique le cal particulièrement embryogène est le tissu le plus utilisé du fait la facilité de le produire et sa capacité de régénération de plantes entières. De plus, l'absence de cuticule facilite l'absorption de petites molécules telles que les phytotoxines (Patiño Torres, 2010). Néanmoins, lors de la sélection les cellules des masses callogènes ne sont pas toutes exposées à l'agent sélectif et ne subissent pas la même pression sélective (Neumann et *al.* 2009). De ce fait, l'utilisation des cultures en suspension notamment avec des cellules plus isolées (suspension cellulaire, protoplastes) permet de soumettre un grand nombre de cellules à une sélection rigoureuse suite à un contact plus important avec l'agent sélectif

(Van Den Bulk, 1991 ; Bhojwani et Razdan, 1996) tandis que l'inefficacité de la sélection sur milieu solide peut être attribuée à la formation d'un gradient de pression de l'agent sélectif au sein du tissu en culture, de telle sorte que les cellules éloignées de la surface du milieu de culture peuvent échapper à la pression sélective et proliférer activement. Par conséquent, l'apparition de variations épigénétiques en sélection liquide avec des amas cellulaires plus friables est minime par rapport au milieu solide ou semi-solide surtout avec des cals plus compacts (Jayasankar, 2005 ; Msikita et *al.* 2006).

Dans notre cas, les cals des trois lignées utilisées présentent une bonne friabilité avec de nombreuses masses embryogènes faciles à détacher rendant la pression sélective exercée plus efficace en suspension qu'en milieu solide. En effet, après trois semaines de sélection en milieu liquide la prolifération des cals des trois lignées était fortement affectée avec une importante nécrose même en présence d'une faible concentration du filtrat, alors que sur milieu solide bien que les masses embryogènes deviennent plus nécrotiques avec la durée de sélection ainsi que l'augmentation de la concentration du filtrat fongique ; elles montrent toujours une certaine prolifération cellulaire surtout dans leurs parties supérieures ce qui indique une adaptation à la présence du filtrat dans le milieu de sélection.

Concentration du filtrat fongique

Selon Gentile et *al.* (1992) la présence du filtrat fongique dans le milieu de sélection influence négativement la prolifération du cal en induisant la nécrose des amas cellulaires grâce à la présence de la phytotoxine et, d'autre part, par sa concentration modifiant la composition du milieu de culture notamment le supplément hormonal et la teneur en azote (Neumann et *al.*, 2009). Selon Van Den Bulk (1991) quoique la prolifération cellulaire diminue avec la concentration du filtrat fongique dans le milieu de culture ; un repiquage sur un milieu sans filtrat permet une reprise de la capacité de régénération par rapport à une sélection avec une forte concentration ou un maintien continu avec l'agent sélectif même en faibles concentrations. Dans ce sens, Jayasankar et Litz (1998) indiquent que la nécrose des cultures embryogènes de la mangue après un mois de culture liquide augmente avec la concentration du filtrat de *Colletotrichum gloeosporoides*. Néanmoins, certains cals reprennent facilement après un transfert sur milieu sans filtrat à l'exception de ceux cultivés en présence d'une forte concentration. Les mêmes observations sont signalées par Quaglia et Zizzerini (2007) sur le cal du tournesol en présence du filtrat de *Diaporthe helianthi*.

Nos résultats coïncident avec ces observations, puisque la nécrose des cals augmente proportionnellement avec la concentration du filtrat de *Verticillium* dans le milieu de sélection liquide ou solide. Toutefois, en présence de la concentration la plus élevée (60%) ; les cals ont perdu non seulement leur capacité de prolifération mais aussi la capacité à régénérer assez de plantes acclimatables notamment après sélection en milieu liquide tandis qu'en présence de 40% de filtrat, une certaine prolifération cellulaire est observée chez les masses cellulaires d'une apparence complètement nécrosée, à partir de laquelle des plantules sont régénérées et dont l'acclimatation et / ou la multiplication n'étaient pas possibles vu leur très faible développement. Ganesan et Jayabalan (2006) ont obtenu des plantes à partir de cals de cotonnier, qui étaient complètement nécrotiques après sélection en présence de 40 % de filtrat de *Fusarium*. De même, Vijaya Kumar et al. (2008) ont réussi à obtenir des plantes à partir de cals de carthame complètement nécrosés sur milieu solide en présence de 40 % de filtrat d'*Alternaria carthami*.

Cet effet de la présence du filtrat fongique en milieu de sélection est déterminé par la concentration inhibitrice du filtrat dépendant directement de la souche du pathogène ainsi que de son degré de pathogénicité. En effet, Gentile et al. (1992) indiquent que les cals de différents agrumes sont affectés différemment par l'augmentation de la concentration du filtrat de *Phoma tracheiphila* dans le milieu solide. Dans cette étude, les cals des différentes lignées réagissent différemment à la présence du filtrat des deux souches de *Verticillium* dans le milieu de sélection. En effet, en milieu liquide la lignée C2 était la plus sensible au filtrat fongique alors qu'en milieu solide la lignée C3 présentait la plus faible prolifération à cause d'une forte nécrose des masses cellulaires. De plus, les différentes lignées étaient plus sensibles au filtrat de la souche S2 indépendamment de la méthode de sélection appliquée. En outre, plusieurs auteurs indiquent qu'après trois semaines de sélection ; une concentration supérieure à 20% induit une forte nécrose et affecte significativement la prolifération cellulaire des cals de l'œillet (Thakur et al., 2002) et du petit-pois (Sharma et al., 2010) avec le filtrat de *Fusarium* sp. ainsi que le haricot (Fernández et al., 2000) en présence du filtrat de *Colletotrichum* sp. tandis que Ahmed et al. (1996) et Quaglia et Zizzerini (2007) ont constaté qu'avec une concentration supérieure à 30 % de filtrat fongique l'accroissement du poids frais est fortement réduit à cause d'une importante nécrose des amas cellulaires du blé et du tournesol respectivement. Nos résultats concordent en partie avec ces observations du fait que les cals en présence de 20% de filtrat présentent une nécrose modérée par rapport au contrôle après trois semaines en

milieu de sélection, alors que cet effet était beaucoup plus prononcé avec des concentrations plus élevées. Cependant, en milieu solide même après quinze semaines de sélection aucune concentration n'a inhibé complètement la croissance des cals.

Durée de sélection

La durée de la pression sélective ainsi que le nombre de cycles utilisés, peuvent affecter le succès de la sélection par filtrat ou toxines fongiques. Habituellement, après une courte période de sélection, certaines cellules peuvent échapper à la pression sélective appliquée tandis qu'une durée très longue même en présence d'une faible concentration du filtrat peut conduire à des altérations inattendues notamment une diminution de la capacité de régénération (Van Den Bulk, 1991) comme c'est le cas avec les cals du citron rugueux (*Citrus jambhiri* Lush.) en présence du filtrat de *Phytophthora parasitica* (Savita et al., 2011). Par conséquent, la durée de sélection optimale garantissant que les cals survivants soient réellement résistants et capables de régénérer des plantes ne peut être prévue et elle doit être empiriquement déterminée (Van Den Bulk, 1991).

Dans notre cas, la durée de sélection était de près de 4 mois dont les trois premières semaines en milieu liquide suivie par des repiquages sur un milieu solide sans filtrat, ou bien un maintien continu par des repiquages chaque trois semaines sur un milieu solide contenant la même concentration du filtrat. Après uniquement les trois premières semaines, les cals issus du milieu liquide notamment de 60% de filtrat étaient complètement nécrosés et ne montraient aucune prolifération après transfert en absence du filtrat. Tandis qu'à la fin du processus en milieu solide, une prolifération était encore observée même en présence de concentrations élevées (60%) de filtrat. Sengar et al. (2009) ont observé une prolifération chez les cals de betterave en présence de 20% de filtrat de *Colletotrichum falcatum* après deux repiquages de 5 semaines chacun, suggérant ainsi une adaptation ou une tolérance au filtrat utilisé à une faible dose tandis qu'avec des concentrations plus élevées les cals étaient entièrement nécrosés.

3. Transformation génétique et capacité d'enracinement

Plusieurs cultivars d'olivier économiquement importants présentent une faible capacité d'enracinement par bouturage semi-ligneux (Rugini et Fedeli, 1990) comme c'est le cas des principaux cultivars Algériens 'Chemlal' et 'Azeradj' (Fabbri et al., 2004). Par

ailleurs, la transformation génétique par *Agrobacterium rhizogenes* est largement utilisée pour améliorer l'enracinement de plusieurs espèces végétales particulièrement arborescentes y compris l'olivier (Rugini, 1992) dont les premiers essais de transformation génétique datent des années 80 et traitaient principalement l'amélioration de la capacité d'enracinement de certains cultivars.

En effet, Rugini (1986) indique une amélioration significative de l'enracinement des boutures du cultivar 'Moraiolo' et apparition de racines après 10 jours chez plus de 50% des explants suite à une inoculation basale par *A. rhizogenes* souche 1855 et mise en culture sur un milieu ½ MS sans auxines. Toutefois, Rugini (1992) indique que l'efficacité de l'inoculation par *A. rhizogenes* peut être améliorée par la présence d'auxines ou de polyamines dans le milieu d'enracinement. En outre, l'AIB et la putrescine permettent les meilleurs résultats.

Nos résultats sont nettement supérieurs à ceux de Rugini (1992) du fait que 86 à 94% des explants inoculés par la souche A4 d'*A. rhizogenes* s'enracinent dès les trois premières semaines lorsqu'ils sont mis en culture sur un milieu OM en présence d'AIB. Toutefois, en absence d'AIB l'enracinement n'a commencé qu'à partir de la 3^{ème} semaine pour atteindre un taux variant entre 46 et 60% après 6 semaines de culture. Cette différence des résultats obtenus est due d'une part aux génotypes des cultivars étudiés et d'autre part aux conditions d'enracinement particulièrement la souche bactérienne utilisée ainsi que la composition chimique et hormonale du milieu d'enracinement.

De même, Strobel *et al.* (1988) ont démontré l'effet bénéfique de l'inoculation par *Agrobacterium rhizogenes* souche 232 et *A. radiobacter* souche NTI sur l'amélioration de l'enracinement, développement végétatif ainsi que la productivité des plants de plusieurs cultivars d'olivier 'Manzenilo', 'Miski', 'Pishoriline' et 'Chamlali'. Ces auteurs suggèrent que la multiplication de la masse racinaire des plants résulte de la transformation génétique des racines existantes. De plus, le développement végétatif, floraison et l'entrée en production sont largement améliorés chez les plants inoculés par *A. rhizogenes*.

Nos résultats corroborent en partie avec ces observations du fait que la masse racinaire estimée par le nombre moyen de racine par explant est presque doublée après inoculation bactérienne. De même, le développement végétatif des pousses obtenues ainsi que de leurs racines émises sont nettement améliorés après inoculation par *Agrobacterium*.

Par ailleurs, Pirannezhad et *al.* (2010) indiquent que l'inoculation des microboutures du cultivar iranien 'Zard' par *A. rhizogenes* en association avec 1 mg l⁻¹ d'AIB en plus de la réduction de la taille du cal formé à la base des explants ; améliore significativement le taux d'enracinement (70%), le nombre et la longueur des racines émises par rapport au témoin sans inoculation bactérienne et en présence uniquement de l'auxine ayant permis 30% d'enracinement. Nos résultats rejoignent parfaitement ces observations du fait l'amélioration de l'enracinement des explants d'environ 40% par rapport à la culture en présence d'AIB en plus de la taille du cal basal réduite et l'émergence de plusieurs racines longues permettant une acclimatation facile des plantules obtenues.

En Algérie, l'application de la transformation génétique pour l'amélioration génétique de l'olivier est très peu étudiée. Les seules études réalisées sont dans l'objectif d'améliorer l'enracinement par bouturage herbacée des principaux cultivars algériens qui sont souvent récalcitrants à ce type de multiplication (Fabbri et *al.*, 2004).

Dans ce contexte, Allag (2008) indique une amélioration significative de la capacité d'enracinement en bouturage herbacé de trois cultivars Algériens (Chemlal, Ferkani et Boukaila) après inoculation basale par la souche A4 d'*Agrobacterium rhizogenes* activée par 10µM d'acétyrsyngone. Allag (2008) souligne que l'effet de l'inoculation bactérienne dépend du cultivar ainsi que la période de prélèvement du matériel végétal mais beaucoup plus du niveau d'insertion de la bouture. En effet, les boutures médianes portant plusieurs nœuds et prélevées durant la période printanière permettent les meilleurs résultats d'émission de plusieurs racines plus longues par rapport aux autres types d'explants (boutures uninodales, feuilles, etc.). Chez le cultivar 'Chemlal' plus de 82% des boutures médianes ont montré une callogenèse basale précédant l'émission de racines atteignant 60% avec plus de 10 racines par plant dont la longueur moyenne dépasse les 6.5 cm, tandis que les deux autres cultivars (Ferkani et Boukaila) étaient plus récalcitrants à l'enracinement même après inoculation par *A. rhizogenes*. Néanmoins, les feuilles et les boutures uninodales en dépit de l'émission de racines ne développent pas des pousses pouvant être acclimatées. Nos résultats obtenus en conditions *in vitro* et sans activation de la souche A4 par l'acétyrsyngone confirment l'effet bénéfique de l'inoculation par *A. rhizogenes* indiqué dans ces observations du fait que l'inoculation bactérienne a permis

entre 33 et 53% d'enracinement chez les microboutures généralement médianes avec plus de 2 racines en moyenne par explant dont la longueur varie entre 1.5 et 3.4 cm.

Par ailleurs, l'insertion des gènes *rolABC* d'*A. rhizogenes* responsables de l'induction du chevelu racinaire dans le génome de l'olivier était d'une part très difficile à réaliser et, d'autre part, provoque des modifications indésirables chez les plantes régénérées par la suite. En effet, à partir des années 90, plusieurs travaux sont réalisés afin d'établir des protocoles efficaces de régénération après transformation génétique par des souches d'*Agrobacterium tumefaciens* désarmées avec des plasmides binaires portant uniquement les gènes *rolABC* ainsi que des gènes de sélection par résistance aux antibiotiques. Mencuccini et al. (1991) ont pu obtenir pour la première fois des néoformations sur des cals de pétioles du cultivar 'Moraiolo' après introduction des gènes *rolABC* portés dans un plasmide binaire Bin19 cependant sans aboutir à des pousses ou plantules entières. De même, Mencuccini et al. (1999 a et b) ont sélectionné des cals issus des pétioles du cultivar 'Dolce Agogia', transformés par les gènes *rolABC*, en présence de la kanamicine et dont la nature transgénique est confirmé par Southern blot et test ELISA. Les cals ainsi sélectionnés produisent des racines même en faible présence d'auxine toutefois sans régénérer des plantes. En fin, en utilisant des masses embryogènes, Rugini et al. (2000) et Miano et al. (2004) ont pu régénérer des plantules entières du cultivar 'Canino' transformées avec les gènes *rolABC* dont la capacité d'enracinement est améliorée toutefois l'aspect des plants est modifié (plusieurs ramifications et entre-nœuds en plus d'un forte teneur en chlorophylle et réduction significative de la surface foliaire) (Rugini et al., 2008). Par conséquent, la transformation génétique uniquement de la partie basale des pousses d'olivier, comme c'est le cas de notre étude, permet d'induire la formation des racines et d'éviter la modification du génotype entier de la plante aboutissant généralement à des anomalies phénotypiques chez les plants régénérés.

Partie V. Conclusion Générale et Perspectives

Partie V. Conclusion générale et perspectives

L'objectif global du travail était l'élaboration d'une approche biotechnologique pour l'obtention de plants d'olivier (*Olea europaea* L.) tolérants aux pathogènes fongiques avec une capacité d'enracinement améliorée chez le principal cultivar en Algérie 'Chemlal'. En effet, notre étude décrit pour la première fois la régénération efficace de plantes entières d'olivier sans anomalies morphologiques par embryogenèse somatique induite à partir d'un matériel juvénile, les radicules d'embryons zygotiques matures. De plus, l'effet de la présence du filtrat brut de la culture du *Verticillium dahliae* Kleb., agent causal de la verticilliose d'olivier, dans le milieu de prolifération sur la sélection du cal embryogène afin d'induire une variation somaclonale et régénérer des plants résistants au *Verticillium* est évalué. Enfin, l'amélioration de l'enracinement *in vitro* des microboutures issues après germination des embryons somatiques à l'aide d'inoculation par *Agrobacterium rhizogenes* est testée. Les résultats obtenus lors de l'optimisation des différentes parties montrent que :

1. Embryogenèse somatique : Établissement des cultures embryogènes

L'induction d'une culture embryogène compétente est fortement influencée par la composition chimique et hormonale du milieu d'induction de cals mais beaucoup plus par le type d'auxine additionnée. En effet, une culture sur le milieu OMc additionné d'AIB et Zéatine pendant trois semaines suivie par un transfert sur le même milieu pendant un mois avec réduction de la concentration de l'auxine, et enfin, un maintien sur un milieu ECO contenant l'AIB en combinaison avec la Zéatine et BAP permettent l'obtention de plusieurs cals embryogènes.

La capacité embryogène du cal d'olivier est fortement influencée par le génotype (lignée cellulaire) du cal, composition chimique et hormonale du milieu de culture ainsi que les conditions de culture. En effet, un maintien sur un milieu ECO solide additionné d'AIB, Zéatine et BAP et contenant plus de 20 g l⁻¹ de saccharose pendant 6 à 8 semaines permet une meilleure prolifération cellulaire (accroissement du poids frais) et une bonne expression embryogène avec moins de nécrose cellulaire. De plus, l'addition du charbon actif au milieu de culture notamment liquide sous agitation pendant 3 à 4 semaines améliore significativement la capacité embryogène du cal.

L'obtention de plantules d'olivier par embryogenèse somatique dépend directement du génotype des embryons somatiques (lignée cellulaire) mais beaucoup plus des conditions de culture particulièrement la présence d'hormones. En effet, un milieu OM solide additionné de BAP et AIB permet une émergence racinaire et une entrée en germination plus avancées aboutissant à des plantules bien développées avec plusieurs feuilles facilement acclimatables. De même, le milieu OM additionné de Zéatine et d'AIB permet une meilleure réactivité des microboutures prélevées après germination des embryons somatiques générant des pousses bien développées avec plusieurs racines émises facilitant leur acclimatation aux conditions naturelles.

2. Variation somaclonale : Induction par pression sélective

L'induction de la variation somaclonale chez les cultures embryogènes d'olivier par pression sélective exercée par le filtrat brut de la culture du *Verticillium dahliae*, diffère d'une lignée cellulaire à une autre et dépend directement de la concentration du filtrat fongique dans le milieu de sélection, type du milieu ainsi que la souche du *Verticillium* utilisée. En effet, une sélection en milieu liquide avec agitation pendant trois semaines en présence du filtrat fongique même à une faible concentration, suivie d'un transfert sur un milieu solide dépourvu de l'agent sélectif, est plus efficace qu'un long maintien sur un milieu solide additionné du filtrat. Toutefois, la mise en germination des embryons isolés à partir des amas cellulaires proliférées après sélection en présence du filtrat fongique a permis la régénération de plantules dont l'acclimatation et / ou multiplication n'étaient pas possibles vu leur très faible développement.

3. Transformation génétique : Enracinement par inoculation bactérienne

L'enracinement des microboutures prélevées des vitroplants obtenus après germination d'embryons somatiques d'olivier dépend fortement du génotype (lignée cellulaire) et il est significativement influencé par le procédé appliqué pour l'induction des racines notamment l'addition d'auxines au milieu de culture ou l'inoculation des bases des explants par *Agrobacterium rhizogenes*. En effet, l'inoculation bactérienne combinée avec la présence d'AIB dans le milieu de culture améliorent significativement la réactivité des bourgeons, le développement des pousses obtenues mais beaucoup plus l'enracinement des microboutures par une émission rapide de plusieurs racines d'une longueur assez importante facilitant, ainsi, leur acclimatation aux conditions externes.

L'approche élaborée dans le présent travail est une contribution à l'application des techniques biotechnologiques de multiplication, de conservation et d'amélioration génétique sur l'olivier comme alternatives aux méthodes classiques de propagation et de création variétale chez cette espèce. En guise de perspectives, il serait intéressant de :

- **Essayer** la régénération de l'olivier par embryogenèse somatique induite à partir d'un matériel végétal adulte tel que les feuilles, inflorescences et racines assurant une conformité génétique plus sûre.
- **Appliquer** le processus d'embryogenèse somatique sur d'autres cultivars Algériens d'olivier aussi importants tels que 'Sigoise' et 'Azeradj'.
- **Utiliser** les cultures embryogènes comme source de matériel biologique pour d'autres techniques biotechnologiques d'amélioration telles que l'isolement et la culture de protoplastes ou les suspensions cellulaires.
- **Vérifier** la stabilité morpho-génétique des plants issus des embryons somatiques à l'aide des marqueurs biométriques et moléculaires.
- **Evaluer** le comportement *in vivo* des plants régénérés par embryogenèse somatique après leur acclimatation aux conditions naturelles.
- **Optimiser** davantage le processus de sélection par filtrat fongique notamment la régénération et l'acclimatation des plantules après pression sélective.
- **Déterminer** le type de variation induite suite à l'application de la pression sélective.
- **Tester** l'induction de la variation somaclonale par d'autres agents de sélection tels que les toxines isolées à partir des filtrats fongiques.
- **Tenter** l'amélioration de l'enracinement des pousses par d'autres souches d'*Agrobacterium rhizogenes* ou d'*A. tumefaciens* portant des plasmides avec les gènes responsables de l'induction du chevelu racinaire.
- **Régénérer** des plantules à partir des racines émises après transformation génétique des cals embryogènes ou inoculation basale des microboutures.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abdessemed, S., Abdessemed, A., Boudchicha, R.H., Benbouza, H. 2018. Caractérisation et identification de quelques écotypes d'olivier *Olea europaea* L. en Algérie. *Agriculture Journal*, 8(2):26-43.
2. Abdessemed, S. 2017. Contribution à la caractérisation et à l'identification des écotypes d'olivier *Olea europaea* L dans la région des Aurès. Thèse de doctorat en sciences, Université de Batna, 138p.
3. Abdessemed, S., Muzzalupo, I., Benbouza, H. 2015. Assessment of genetic diversity among Algerian olive (*Olea europaea* L.) cultivars using SSR marker. *Scientia Horticulturae*, 192:10-20.
4. Abousalim, A., Brhadda, N., Walali, L.D. 2005. Essais de prolifération et d'enracinement de matériel issu de rajeunissement par bouturage d'oliviers adultes (*Olea europaea* L.) et de germination *in vitro* : effets de cytokinine et d'auxines. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 9(4): 237-240.
5. Acebedo, M.M., Lavee, S., Liñán, J., Troncoso, A. 1997. *In vitro* germination of embryos for speeding up seedling development in olive breeding programmes. *Scientia Horticulturae*, 69: 207-215.
6. Aguilar-Hernández, V., Loyola-Vargas, V.M. 2018. Advanced proteomic approaches to elucidate somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1658.
7. Ahmed, K.Z., Mesterházy, Á., Bartók, T., Sági, F. 1996. *In vitro* techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for *Fusarium*-resistance. II. Culture filtrate technique and inheritance of *Fusarium*-resistance in the somaclones. *Euphytica*, 91: 341-349.
8. Aït Mouloud, M. 2014. La valorisation de la qualité de l'huile d'olive de la région Kabyle : quel signe de qualité mettre en place ? In : Fort, F. (ed). *Terroirs en Méditerranée : concepts, théories, pratiques et perspectives de recherche*. Séminaire doctoral "Terroirs en Méditerranée", Montpellier, France. UMR MOISA, 2014. Série de recherches n°9, pp : 67-81.
9. Allag, A., 2008. Induction de l'enracinement par *Agrobacterium rhizogenes* chez 3 variétés d'olivier: Chemlal, Ferkani et Boukaila. Thèse Magister, Université de Tébessa, 145p.

10. Alvarado, M., Civantos, M., Durán, J.M., 2017. Plagas. In El cultivo del olivo, 2017, Barranco, D., Fernandez-Escobar, F., Rallo, L., (eds). 7ª Ed. Coed. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, España, 1008 p, pp: 509-593.
11. Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 411-421.
12. Antonopoulou, C., Dimassi, K., Chatzissavidis, C., Papadakis, I., Therios, I. 2012. The effect of explant type and nutrient medium on the *in vitro* proliferation of olive (*Olea europaea* L. 'Chondrolia Chalkidikis'). *Acta Horticulturae*, 949: 185-189.
13. APG. 2016. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181:1-20.
14. Bahrami, M.K., Motallebi Azar, A., Dadpour, M.R. 2010. Influence of Thidiazuron in direct shoot regeneration from segments of *in vitro* Leaves, and axillary and apical buds of olive (*Olea europaea*). *Acta Horticulturae*, 884: 383-390.
15. Baldoni, L., Belaj, A. 2009. Olive. In *Handbook of plant breeding Oil crops*, 2009, Vollmann, J., Rajcan, I. (eds). Springer, USA, 548p, pp: 397-421.
16. Barranco, D. 1994. Caracterización del material vegetal en olivo. In «Avances en olivicultura» Fundación «La Caixa». *Fruticultura profesional*, Barcelona, 3-7.
17. Barranco, D., Rallo, L. 2000. Olive cultivars in Spain. *Hortechology*, 10(1): 107-110.
18. Barranco, D., Rallo, L. 1984. Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. *Consejería de la junta de Andalucía, MAPA, Madrid, Espagne*, 250p.
19. Barranco, D., Cimato, A., Fiorino, P., Rallo, L., Touzani, A., Castaneda, C., Trujillo, I. 2000. *World catalogue of olive varieties*. International Olive Oil Council, Madrid, Espagne, 360p.
20. Bartolini, G., Leva, A.R., Benelli, A. 1990. Advances in *in vitro* culture of the olive propagation of cv. Maurino. *Acta Horticulturae*, 286: 41-44.
21. Belaj, A., Trujillo, I., De la Rosa, R., Rallo, L. 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126(1): 64-71.
22. Benelli, C., Fabri, A., Grassi, S., Lambardi, M., Rugini, E. 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76: 112-119.

23. Benzekri, H., Sánchez-Romero, C. 2012. Maturation of olive somatic embryos. *Acta Horticulturae*, 961: 441-447.
24. Ben Mohamed, M.B., Zelasco, S., Ben Ali, S., Guasmi, F., Triki, T., Conforti, F.L., Naziha, G.K. 2017. Exploring olive tree genetic variability in the southeast of Tunisia. *Genetics and Molecular Research*, 16(4): 15p.
25. Besnard, G., Bervillé, A. 2000. Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Comptes-Rendus de l'Académie des Sciences III*, 323(2): 173-181.
26. Besnard, G., Terral, J.F., Cornille, A. 2018. On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Annals of Botany*, 121: 385-403.
27. Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., Khadari, B., Bervillé, A. 2001. Cultivar identification in olive based on RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126: 668-675.
28. Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1996. *Plant tissue culture: theory and practice*, a revised edition. Elsevier, Netherlands, 767p.
29. Binet, M.N., Lemoine, M.C., Martin, C., Chambon, C., Gianinazzi, S. 2007. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43: 473-478.
30. Bogani, P., Cavalieri, D., Petruccelli, R., Roselli, G. 1994. Identification of olive tree cultivars by using Random Amplified Polymorphic DNA. *Acta Horticulturae*, 356: 98-101.
31. Boskou, D. 2006. Characteristics of the olive tree and olive fruit. In *Olive oil Chemistry and Technology*, 2006, Boskou, D. (eds). 2^a Ed. Aocs Press, USA, 253 p, pp: 13-20.
32. Boudi, M., Chehat, F., Cheriet, F. 2013. Compétitivité de la filière huile d'olive en Algérie : cas de la wilaya de Béjaïa. *Les cahiers du CREAD*, 105: 89-112.
33. Boukhari, R., Ameer Ameer, A., Innal, H., Gaouar, S.B.S. 2020. First morphological characterization of autochthonous olive (*Olea europaea* L.) denominations from central and eastern of Algeria. *Acta Agriculturae Slovenica*, 116(2): 311-325.
34. Breviglieri, N., Battaglia, E. 1954. Ricerche cariologiche in *Olea europaea* L. *Cariologia*, 6: 271-273.
35. Bradai, F., Almagro-Bastante, J., Sánchez-Romero, C. 2023. Effect of sucrose preculture and culture inoculum density on cryopreservation of olive somatic embryos. *Scientia Horticulturae*, 322: 112385.

36. Bradaï, F., Sánchez-Romero, C. 2021a. Effect of cryopreservation on the *ex vitro* establishment of olive plants regenerated via somatic embryogenesis. *Plants*, 10(396): 12p.
37. Bradaï, F., Sánchez-Romero, C. 2021b. Effect of cryopreservation on olive (*Olea europaea* L.) plant regeneration via somatic embryogenesis. *Plants*, 10(34): 13p.
38. Bradaï, F., Sánchez-Romero, C., Martín, C. 2019. Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on genetic stability. *Scientia Horticulturae*, 251: 260-266.
39. Bradaï, F., Almagro-Bastante, J., Sánchez-Romero, C. 2017. Cryopreservation of olive somatic embryos using the droplet-vitrification method: The importance of explant culture conditions. *Scientia Horticulturae*, 218: 14-22.
40. Bradaï, F., Pliego-Alfaro, F., Sánchez-Romero, C. 2016a. Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on phenotypic stability. *Scientia Horticulturae*, 213: 208-215.
41. Bradaï, F., Pliego-Alfaro, F., Sánchez-Romero, C. 2016b. Long-term somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.): Influence on regeneration capability and quality of regenerated plants. *Scientia Horticulturae*, 199: 23-31.
42. Braybrook, S.A., Harada, J.J. 2008. LECs go crazy in embryo development. *Trends in Plant Science*, 13: 624–630.
43. Brhadda, N., Walali, L.D.M., Abousalim, A. 2008. Effet du sucre sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. 'Picholine Marocaine'. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 12(3): 245-250.
44. Brhadda, N., Walali, L.D.M., Abousalim, A. 2007. Étude histologique de l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. 'Picholine marocaine'. *Fruits*, 62(2): 115-124.
45. Brhadda, N., Abousalim, A., Walali, L.D.M. 2003a. Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv Picholine marocaine. *Fruits*, 58(3): 167-174.
46. Brhadda, N., Abousalim, A., Walali, L.D.M., Benali, D. 2003b. Effet du milieu de culture sur le microbouturage de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. Picholine Marocaine. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 7(3-4):177-182.
47. Brhadda, N., Walali, L.D.M., Abousalim, A., Benali, D. 2000. Effet de la température et de l'endosperme sur la dormance et la germination des embryons d'olivier *Olea europaea* L. variété Picholine marocaine. *Agronomie*, 20(6): 643-653.

48. Briccoli Bati, C., Godino, G., Monardo, D., Nuzzo, V. 2006. Influence of propagation techniques on growth and yield of olive trees cultivars 'Carolea' and 'Nocellara Etnea'. *Scientia Horticulturae*, 109: 173-182.
49. Brito, G., Santos, C. 2009. Basal medium improvement for routine plant micropropagation of *Olea maderensis*: physiological comparative studies. *Canadian Journal of Forest Research*, 39: 814-822.
50. Brito, G., Lopes, T., Loureiro, J., Rodriguez, E., Santos, C. 2010. Assessment of genetic stability of two micropropagated wild olive species using flow cytometry and microsatellite markers. *Trees*, 24:723-732.
51. Caballero, J.M., Del Rio, C., 1999. Conservation des ressources génétiques de l'Olivier. Séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oléiculture et oléotechnie, Florence, 10-12 Mars, Italie.
52. Camposeo, S. 2017. Nuevas variedades de olivo obtenidas del cruzamiento entre genotipos italianos y españoles adaptadas a los sistemas de cultivo superintensivos. *Olint*, 31: 15–16.
53. Cantini, C., Cimato, A., Graziano, S. 1999. Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica*, 109: 173-181.
54. Cançado, G.M.A., Setotaw, T.A., Ferreira, J.L., 2013. Applications of biotechnology in olive. *African Journal of Biotechnology*, 12(8): 767-779.
55. Capelo, A.M., Silva, S., Brito, G., Santos, C. 2010. Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(2): 237-242.
56. Cardoso, H., Figueiredo, A., Serrazina, S., Pires, R., Peixe, A., 2019. Genome modification approaches to improve performance, quality, and stress tolerance of important Mediterranean fruit species (*Olea europaea* L., *Vitis vinifera* L., and *Quercus suber* L.). In: Sathishkumar, R., Kumar, S.R., Hema, J., Baskar, V. (eds.), *Advances in Plant Transgenics: Methods and Applications*, Springer, 273–312.
57. Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F., Giorio, G. 2002. Identification of Simple Sequence Repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 301–307.
58. Cañas, L.A., Benbadis, A., 1988. *In vitro* regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europea* L.). *Plant Science*, 54: 65-74.
59. Cañas, L.A., Carramolino, L., Vicente, M. 1987. Vegetative propagation of the olive tree from *in vitro* cultured embryos. *Plant Science*, 50: 85-90.

60. Cerezo, S., Palomo-Ríos, E., Ben Mariem, S., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. 2019. Use of fluorescent reporter genes in olive (*Olea europaea* L.) transformation. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41:49.
61. Cerezo, S., Hernández, M.L., Sicardo, M.D., Mercado, J.A., Sanz, C., Narváez, I., Barceló-Muñoz, A., Martínez-Rivas, J.M., Pliego-Alfaro, F. 2015. Transformación genética de olivo con el gen OeHPL para el análisis funcional del papel de la enzima 13-hidroperóxido liasa (13-HPL) en la producción de compuestos volátiles. XI Reunión de la Sociedad Española de Cultivo In vitro de Tejidos Vegetales, 3-4 Septiembre 2015, Valence, Espagne.
62. Cerezo, S., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. 2011. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106: 337-344.
63. Cerezo, S., Samach, A., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. 2010. *Agrobacterium*-mediated transformation of olive (*Olea europaea* L.) with a *Medicago truncatula* gene encoding an Ft-like protein. *Proceeding du XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010):22/10/2010*, Lisbon, Portugal.
64. Chaari-Rkhis, A., Maalej, M., Chelli-Chaabouni, A., Fki, L., Drira, N. 2015. Photosynthesis parameters during acclimatization of *in vitro*-grown olive plantlets. *Photosynthetica*, 53: 613-616.
65. Chaari-Rkhis, A., Maalej, M., Drira, N., Standardi, A. 2011. Micropropagation of olive tree *Olea europaea* L. 'Oueslati'. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 35: 403-412.
66. Chaari-Rkhis, A., Maalej, M., Ouled Messaoud, S., Drira, N. 2006. *In vitro* vegetative growth and flowering of olive tree in response to GA3 treatment. *African Journal of Biotechnology*, 5(22): 2097-2302.
67. Chamandoosti, F. 2014. *In vitro* plant regeneration from callus of adult zygotic embryo in olive (*Olea europaea* L.). *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 4(4): 253-256.
68. Charbaji, T., Ayyoubi, Z., Karajouli, L. 2008. *In vitro propagation* of some Syrian varieties of olive. *Acta Agronomica Hungarica*, 56(1): 107-111.
69. Chevalier, A. 1948. L'origine de l'olivier cultivé et ses variations. *Revue Internationale de Botanique Appliquée et d'Agriculture Tropicale*, 28: 303-304.
70. Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Marconi, R., Cimato, A. 2002. Microsatellite markers isolated in Olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 223-228.

71. Clavero-Ramírez, I., Pliego-Alfaro, F. 1990. Germinación *in vitro* de embriones maduros de olivo (*Olea europaea*). Acta Horticulturae, 1: 512-516.
72. COI, 2022. Production mondiale en olives et huile d'olives.
73. COI. 1997. Méthodologie pour la caractérisation primaire des variétés d'Olivier. Projet RESGEN-CT(67/97), Union Européenne/COI.
74. Contento, A., Ceccarelli, M., Gelati, M.T., Maggini, F., Baldoni, L., Cionini, P.G. 2002. Diversity of *Olea* genotypes and the origin of cultivated olives. Theoretical and Applied Genetics. 104: 1229-1238.
75. Cozza, R., Turco, D., Briccoli-Bati, C., Bitonti, M.B. 1997. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51: 215-223.
76. Cunill, M., Duran, S. 2014. "OLIANA®", una nueva variedad de olivo adaptada al sistema superintensivo. Olint, 25: 21-29.
77. Czapek, F. 1901. Studies on nitrogen production and protein formation of plants (en Allemand). The FEBS Journal, 1(12): 538-560.
78. Diamantoglou, S., Mitrakos, K. 1979. Sur la culture *in vitro* de l'embryon d'olivier (*Olea europaea* L. var *Oleaster*). Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Série 'D', 288: 1537-1940.
79. Díez, C.M., Moral, J., Barranco, D., Rallo, L. 2016. Genetic diversity and conservation of olive genetic resources. In: Ahuja, M.R., Jain, S.M. (eds), Genetic diversity and erosion in plants-Case histories Vol 2, Sustainable development and biodiversity 8, Springer, 337-356.
80. Dimassi, K. 1999. Micropropagation studies of the cv. Kalamon olives (*Olea europaea* L.). Acta Horticulturae, 474: 83-86.
81. Dominguez-Garcia M.C., Laib M., De La Rosa R., Belaj A. 2012. Characterization and identification of olive cultivars from North-eastern Algeria using molecular markers. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 87(2):95-100.
82. Donini, L.P., Schuch, M.W., Ribeiro, M.F., De Souza, J.A., Soares, G.C. 2008. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. "Arbequina" para início da micropropagação. Ciência Rural, 38(6): 1769-1772.
83. Dridi, J., Fendri, M., Breton, C.M., Msallem, M. 2018. Characterization of olive progenies derived from a Tunisian breeding program by morphological traits and SSR markers. Scientia Horticulturae, 236: 127-136.

84. Driver, J.A., Kuniyuki, A.H., 1984. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock. HortScience, 19: 507-509.
85. D'Angeli, S., Altamura, M.M. 2007. Osmotin induces cold protection in olive trees by affecting programmed cell death and cytoskeleton organization. Planta, 225: 1147-1163.
86. D'Angeli, S., Gutierrez-Pesce, P., Altamura, M.M., Biasi, R., Ruggiero, B., Muganu, M., Bressan, R., Rugini, E. 2001. Genetic transformation of olive tree (*Olea europaea* L.) with osmotin gene and *in situ* protein localisation in the transgenic tissues In Proc. Società Italiana di Genetica Agraria, Salsomaggiore Terme, 26-29 Sept 2001.
87. D'Imperio, M., Viscosi, V., Scarano, M.T., D'Andrea, M., Zullo, B.A., Pilla, F. 2011. Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea*). Scientia Horticulturae, 130: 229-240.
88. El Bakkali, A., Essalouh, L., Tollo, C., Rivallan, R., Mournet, P., Moukhli, A., et al., 2019. Characterization of Worldwide Olive Germplasm Banks of Marrakech (Morocco) and Córdoba (Spain): Towards management and use of olive germplasm in breeding programs. PLoS ONE, 14(10): e0223716.
89. Emmanouilidou, M.G., Kyriacou, M.C. 2018. Characterization and identification of indigenous olive germplasm from Cyprus using morphological and simple sequence repeat markers. HortScience, 53(9): 1306-1313.
90. Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M., Kailis, S. 2004. Olive propagation manual. Ed. Landlinks Press, Australia, 141 p.
91. FAOSTAT. 2022. Statistiques Agricoles, Olives.
92. FAO. 2010. The second report on the state of the world's plant genetic resources for food and agriculture, Rome, Italy, 399p.
93. Farahani, F., Yari, R., Noormohammadi, Z., Sheidai, M. 2018. Study of morphological trait changes in in-vitro plantlets of three olive cultivars ('Dezful Baghmalek', 'Dezful Safiabad' and 'Roughani') domesticated in Iran. Acta Horticulturae, 1199: 87-90.
94. Farahani, F., Yari, R., Sheidai, M. 2011a. Molecular C-value and morphological analyses of somaclonal variation in three olive cultivars. African Journal of Plant Science, 5(9): 493-499.
95. Farahani, F., Yari, R., Sheidai, M. 2011b. Somaclonal variation in Dezful cultivar of olive (*Olea europaea* subsp. *europaea*). Gene Conserve, 40: 216-233.
96. Farahani, F., Razeghi, S., Peyvandi, M., Attaii, S., Mazinani, M.H. 2011c. Micrografting and micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) Iranian cultivar: Zard. African Journal of Plant Science, 5(11): 671-675.

97. Farahani, F., Peyvandi, M., Hosseini-Mazinani, M. 2008. Effect of sucrose and mannitol on *in vitro* regeneration of Iranian olive Cv. 'Rowghani', *Acta Horticulturae*, 791: 203-208.
98. Farooq, Q.U.A., Fatima, A., Murtaza, N., Ferdosi, F.H. 2017. *In vitro* propagation of olive cultivars 'Frontio', 'Earlik', 'Gemlik'. *Acta Horticulturae*, 1152: 249-255.
99. Farzaneh Behelgardy, M., Motamed, N., Rastgar Jazii, F. 2012. Expression of the P5CS gene in transgenic versus nontransgenic olive (*Olea europaea*) under salinity stress. *World Applied Sciences Journal*, 18(4):580-583.
100. Fernández, M.T., Fernández, M., Centeno, M.L., Cañal, M.J., Rodriguez, R. 2000. Reaction of common bean callus to culture filtrate of *Colletotrichum lindemuthianum*: Differences in the composition and toxic activity of fungal culture filtrates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61: 41-49.
101. Fontanazza, G., Bartolozzi, F., Vergati, G. 1998. Fs-17. *Rivista Frutticoltura*. 5, 61.
102. Galun, E., Breiman, A. 1997. *Transgenic plants*, Imperial College Press, London, 392p.
103. Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 50(1): 151-158.
104. Ganesan, M., Jayabalan, N. 2006. Isolation of disease-tolerant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2) plants by screening somatic embryos with fungal culture filtrate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87: 273-284.
105. Ganeshan, S., Chibbar, R.N. 2010. Gene transfer methods. In *Transgenic crop plants Vol.1: Principles and development*, 2010, Kole, C., Michler, C.H., Abbott, A.G., Hall, T.C. (eds). Springer, USA, 315 p, pp: 57-83.
106. García, J.L., Troncoso, J., Sarmiento, R., Troncoso, A. 2002. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 95-100.
107. García-Férriz, L., Ghorbel, R., Ybarra, M., Marí, A., Belaj, A., Turjillo, I. 2002. Micropropagation from adult olive trees. *Acta Horticulturae*, 586: 879-882.
108. Gartland, J.S. 1995. *Agrobacterium* virulence. In *Methods in molecular biology*, Vol. 44: *Agrobacterium* protocols, 1995, Gartland, K.M.A., Davey, M.R. (eds). Humana Press Inc, USA, 412p, pp: 15-28.
109. Gelvin, S.B. 2003. *Agrobacterium*-Mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1): 16-37.

- 110.** Gentile, A., Tribulato, E., Continella, G., Vardi, A. 1992. Differential responses of citrus calli and protoplasts to culture filtrate and toxin of *Phoma tracheiphila*. Theoretical and Applied Genetics, 83: 759-764.
- 111.** Gemas, V.J., Rijo-Johansen, M.J., Tenreiro, R., Fevereiro, P. 2000. Inter- and intra-varietal analysis of three *Olea europaea* L. cultivars using the RAPD technique. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 75(3): 312–319.
- 112.** Germanà, M.A., Chiancone, B., Hammami, S.B.M., Rapoport, H.F. 2014. Olive embryo *in vitro* germination potential: role of explant configuration and embryo structure among cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 118: 409-417.
- 113.** Gould, A.R. 1984. Control of the cell cycle in cultured plant cells. Critical Reviews in Plant Sciences, 1: 315-344.
- 114.** Green P.S. 2002. A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). Kew Bulletin, 57:91-140.
- 115.** Grigoriadou, K., Vasilakakis, M., Tzoulis, T., Eleftheriou, E.P. 2005. Experimental use of a novel temporary immersion system for liquid culture of olive microshoots. In: Hvoslef-Eide, A.K., et Preil, W., (eds.), Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp: 263–274.
- 116.** Grigoriadou, K., Vasilakakis, M., Eleftheriou, E.P. 2003. Rooting and Acclimatization of *in vitro* propagated olive tree microshoots (*Olea europaea* L.) cv. Chondrolia Chalkidikis. Acta Horticulturae, 616: 193-195.
- 117.** Grigoriadou, K., Vasilakakis, M., Eleftheriou, E.P. 2002. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar ‘Chondrolia Chalkidikis’. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 71: 47–54.
- 118.** Grossoni, P., 1979. Problems concerning the *in vitro* culture of *Olea europaea* L. Giornale Botanico Italiano, 113: 75-88.
- 119.** Haberman, A., Bakhshian, O., Cerezo, S., Paltiel, J., Adler, C., Ben-Ari, G., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., Lavee, S., Samach, A. 2017. A possible role for flowering locus T-encoding genes in interpreting environmental and internal cues affecting olive (*Olea europaea* L.) flower induction. Plant, Cell and Environment, 40: 1263-1280.
- 120.** Haddad, B., Silvestre Gristina, A., Mercati, F., Saadi, A., Aiter, N., Martorana, A., Sharaf, A., Carimi, F. 2020. Molecular analysis of the official Algerian olive collection highlighted a hotspot of biodiversity in the central Mediterranean basin. Genes, 11, 303.
- 121.** Haddad, B., Carra, A., Saadi, A., Haddad, N., Mercati, F., Gristina, A.S., Boukhalfa, S., Djillali, A., Carimi, F. 2017. *In vitro* propagation of the relict laperinne’s olive (*Olea europaea* L. subsp. *Laperrinei*). Plant Biosystems, 10p.

- 122.** Haddadi, M., Yakoub-Bougdal, S. 2010. Production de porte-greffes d'olivier à partir des embryons d'*Olea europea* var. Chemlal cultivés *in vitro*. Cahiers Agriculture, 19(4): 288-91.
- 123.** Hadiddou, A., Oukabli, A., Moudaffar, C., Mamouni, A., Gaboun, F., Mekaoui, A., H'ssaini, L., El Fechtali, M. 2013. Evaluation des performances de production de 14 variétés d'olivier (*Olea europaea* L.) nationales et méditerranéennes dans deux systèmes contrastés de culture (pluvial et irrigué) au Maroc. Al Awamia, 127: 21-43.
- 124.** Hadjou, L., Lamani, O., Cheriet, F. 2013. Labellisation des huiles d'olive algériennes: contraintes et opportunités du processus? New Medit N., 2: 35-46.
- 125.** Halford, N.G. 2003. Genetically modified crops. Ed. Imperial College Press, UK, 112 p.
- 126.** Hannachi, H., Martín-Gómez, J.J., Saadaoui, E., Cervantes, E. 2017. Stone diversity in wild and cultivated olive trees (*Olea europaea* L.). Dendrobiology, 77: 19-32.
- 127.** Hannachi, H., Breton, C., Msallem, M., Ben El Hadj, S., El Gazzah, M., Bervillé, A. 2008. Are olive cultivars distinguishable from oleaster trees based on morphology of drupes and pits, oil composition and microsatellite polymorphisms? Acta Botanica Gallica, 155(4): 531-545.
- 128.** Haslam, T.M., Yeung, E.C. 2011. Zygotic embryo culture: An overview. In Thorpe, T.A., Yeung, E.C. (eds.), Plant embryo culture - Methods and protocols, Methods in molecular biology, vol. 710, pp: 3-15.
- 129.** Hassan, S.A.M., Abd Allatif, A.M., Mahfouze, H.A. 2016. Assessment of genetic stability of micropropagated olive (*Olea euopaea* L.) cultivars using RAPD marker. International Journal of PharmTech Research, 9(12): 816-825.
- 130.** Hauville A., 1953. La répartition des variétés d'olivier en Algérie et ses conséquences pratiques. Bulletin de la Société Agricole d'Algérie, 580:1-8.
- 131.** Hegazi, E.S., Abd Allatif, A.M., Abd Elraof, O.A. 2017. Effect of growth regulators on callus induction and somatic embryogenesis in olive. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 8(4):274–280
- 132.** Hernández, P., De la Rosa, R., Rallo, L., Martín, A., Dorado, G. 2001. First evidence of a retrotransposon-like element in olive (*Olea europaea*): implications in plant variety identification by SCAR-marker development. Theoretical and Applied Genetics, 102: 1082–1087.

133. Hervé, P., Jauneau, A., Pâques, M., Marien, J.N., Boudet, A.M., Teulière, C. 2001. Organogenetic pathways of *in vitro* shoot regeneration from different organs of elite *Eucalyptus gunnii* clones. *Plant Science*, 161: 645–653.
134. Idrissi, A., Ouazzani, N. 2006. Apport des descripteurs morphologiques à l'inventaire et à l'identification des variétés d'olivier (*Olea europaea* L.). *Bulletin de ressources phytogénétiques*, 136: 1-10.
135. INRAA, 2006. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques. Ed. FAO, 67p.
136. Isleem, W.R., Sadler, M.T. 2005. Callus induction and maintenance in seven local olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 1(1): 119-124.
137. Jafarzadeh-Bajestani, M., Khodai-Kalaki, M., Motamed, N., Noorayin, O. 2011. Genetic transformation of olive somatic embryos through *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants. *African Journal of Biotechnology*, 10(28): 5468-5475.
138. Jain, S.M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118: 153-166.
139. Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S. 1998. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, UK, 627 p.
140. Jayasankar, S. 2005. Variation in tissue culture. In *Plant development and biotechnology*, 2005, Trigiano, R.N., Gray, D.J. (eds). CRC Press, USA, 358 p, pp: 301-309.
141. Jayasankar, S., Litz, R.E. 1998. Characterization of embryogenic mango cultures selected for resistance to *Colletotrichum gloeosporoides* culture filtrate and phytotoxin. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 823-831.
142. Jayasankar, S., Zhijian, L., Gray, D.J. 2000. *In vitro* selection of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. *Planta*, 211: 200-208.
143. Jiménez-Díaz, R. M., Cirulli, M., Bubici, G., Jiménez-Gasco, M. M., Antoniou, P., Tjamos, E. 2012. *Verticillium* wilt, a major threat to olive production current status and future prospects for its management. *Plant Disease*, 96(3): 304–329.
144. Johnson, L.A.S. 1957. A review of the family *Oleaceae*. Contribution from the NSW National Herbarium, 2: 395-418.
145. Kaur, A., Malhotra, P.K., Manchanda, P., Gosal, S.S. 2018. Micropropagation and somatic embryogenesis in sugarcane. In Gosal, S.S., Wani, S.H. (eds.), *Biotechnologies of crop improvement*, Vol. 1: Cellular approaches, pp: 57-91.

- 146.** Khan, M.R., Rashid, H., Quraishi, A. 2002. *In vitro* shoot development from cuttings of field-grown olive (*Olea europaea* L.) cv. Leccino. Online Journal of Biological Sciences, 2(7): 438-440.
- 147.** Kiani, M., Zamani, Z., Ebadi, A. 2006. *In vitro* germination of three olive cultivars. Acta Horticulturae, 725: 333-336.
- 148.** Lamani, O., Ilbert, H. 2016. Spécificités de l'oléiculture en montagne (région kabyle en Algérie) : pratiques culturelles et enjeux de la politique oléicole publique. In : Ater, M., Essalouh, L., Ilbert, H., Moukhli, A. et Khadari, B. (eds). L'oléiculture au Maroc de la préhistoire à nos jours : pratiques, diversité, adaptation, usages, commerce et politiques. Montpellier : CIHEAM, 2016. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens, 118 :149-159.
- 149.** Lamani, O. 2014. Huile d'olive de Beni Maouche : critères d'identification et perspectives de valorisation. In : Fort, F. (ed). Terroirs en Méditerranée : concepts, théories, pratiques et perspectives de recherche. Séminaire doctoral "Terroirs en Méditerranée", Montpellier, France. UMR MOISA, 2014. Série de recherches n°9, pp : 42-53.
- 150.** Lambardi, M., Ozudogru, E.A., Roncasaglia, R. 2013. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) by nodal segmentation of elongated shoots. In Lambardi et al. (eds.), Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants, Methods in molecular biology, vol. 994, pp: 33-44.
- 151.** Lambardi, M., Caccavale, A., Rugini, E., Caricato, G. 1999a. Histological observation on somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.). Acta Horticulturae, 474: 67-70.
- 152.** Lambardi, M., Benelli, C., Amorosi, S., Branca, C., Caricato, G., Rugini, E. 1999b. Microprojectile-DNA delivery in somatic embryos of olive (*Olea europaea* L.). Acta Horticulturae, 474: 505-509.
- 153.** Larkin, P.J., Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60: 197-214.
- 154.** Lavee, S. 1977. The growth potential of olive fruit mesocarp *in vitro* (*Olea europaea* L.) Tissue culture for horticultural purposes. Acta Horticulturae, 78: 115-122.
- 155.** Lavee, S., Messer, G. 1969. The effect of growth regulating substances and light on olive callus growth *in vitro*. Journal of Experimental Botany, 20(3): 604-614.

- 156.** Lavee, S., Avidan, B., Meni, Y. 2003. Askal, a new high-performing oil variety for intensive and super-intensive olive orchard. *Olivae*, 97: 53–59.
- 157.** Lestari, E.G. 2006. *In vitro* selection and somaclonal variation for biotic and abiotic stress tolerance. *Biodiversitas*, 7(3): 297-301.
- 158.** Leva, A. 2011. Innovative protocol for “*ex vitro* rooting” on olive micropropagation. *Central European Journal of Biology*, 6(3): 352-358.
- 159.** Leva, A.R. 2009. Morphological evaluation of olive plants propagated *in vitro* culture through axillary buds and somatic embryogenesis methods. *African Journal of Plant Science*, 3(3): 37-43.
- 160.** Leva, A.R., Petruccelli, R. 2012. Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. *Biologia Plantarum*, 56(2): 373–376.
- 161.** Leva, A.R., Sadeghi, H., Petruccelli, R. 2012a. Carbohydrates modulate the *in vitro* growth of olive microshoots. I. The analysis of shoot growth and branching patterns. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32: 53-60.
- 162.** Leva, A.R., Petruccelli, R., Rinaldi, L.M.R. 2012b. Somaclonal variation in tissue culture: a case study with olive. In: Leva, A., Rinaldi, L. (Eds) *Recent advances in plant in vitro culture*. IntechOpen Edition, pp: 10-17.
- 163.** Leva, A., Muleo, R., Petruccelli, R. 1995. Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *Journal of Horticultural Science*, 70(3): 417-421.
- 164.** Leva, A.R., Petruccelli, R., Bartolini, G. 1994. Mannitol *in vitro* culture of *Olea europaea* L. (cv. Maurino). *Acta Horticulturae* 356, 43–46.
- 165.** Liang, G.H., Skinner, D.Z. 2004. *Genetically modified crops: their development, uses and risks*. Food Product Press, USA, 416p.
- 166.** Litz, R.E., Witjaksono, Raharjo, .S, Efendi, D., Pliego-Alfaro, F., Barceló-Muñoz, A. 2005. *Persea americana* avocado. In: Litz RE (ed) *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. CABI, Wallingford, Oxfordshire, pp: 326–347.
- 167.** Lloyd, G., McCown, B. 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Proceedings of the International Plant Propagator’s Society*, 30: 421–427.
- 168.** Lopes, T., Capelo, A., Brito, G., Loureiro, J., Santos, C. 2009. Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea* spp. Using nuclear microsatellites. *Trees*, 23(1): 29-36.
- 169.** Lynch, P.T., Siddika, A., Johnston, J.W., Trigwell, S.M., Mehra, A., Benelli, C., Lambardi, M., Benson, E.E. 2011. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress,

- antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. *Plant Science*, 181: 47–56.
- 170.** Maalej, M., Chaari-Rkhis, A., Drira, N. 2006. Contribution to the improvement of olive tree somatic embryogenesis by mineral and organic analysis of zygotic embryos. *Euphytica*, 151: 31-37.
- 171.** Maalej, M., Drira, N., Chaari-Rkhis, A., Trigui, A. 2002. Preliminary results of somatic embryogenesis from young zygotic embryos of olive tree. *Acta Horticulturae*, 586: 899-902.
- 172.** MADR, 2019. Statistiques Agricoles, Série B.
- 173.** Mansouri S. 2014. Contribution à la caractérisation morphologique et moléculaire de quelques cultivars d'olivier (*Olea europaea* L.) locaux dans la région des Aurès. Thèse Magister, Université de Batna, 121p.
- 174.** Margara, J. 1984. Bases de la multiplication végétative. INRA, Paris, 262 p.
- 175.** Mataix, J., Barbancho, F.J. 2006. Olive oil in Mediterranean food. In *Olive oil and health*, 2006, Quiles, J.L., Ramirez-Tortorosa, M.C., Yaqoob, P. (eds). Ed. CABI International, USA, 381 p, pp: 1-44.
- 176.** Mazri, M.A., Naciri, R., Belkoura, I. 2020. Maturation and conversion of somatic embryos derived from seeds of olive (*Olea europaea* L.) cv. Dahbia: Occurrence of secondary embryogenesis and adventitious bud formation. *Plants*, 9(1489): 14p.
- 177.** Mazri, M.A., Belkoura, I., Pliego-Alfaro, F., Belkoura, M. 2013. Somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dahbia. *Scientia Horticulturae*, 159: 88–95.
- 178.** Mazri, M.A., Belkoura, I., Pliego-Alfaro, F., Belkoura, M. 2012. Embryogenic capacity of embryo-derived explants from different olive cultivars. *Acta Horticulturae*, 929: 397-403.
- 179.** Mazri, M.A., Elbakkali, A., Belkoura, M., Belkoura, I. 2011. Embryogenic competence of calli and embryos regeneration from various explants of Dahbia cv, a Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.). *African Journal of Biotechnology*, 10(82): 19089-19095.
- 180.** Mencuccini, M. 2003. Effect of medium darkening on in vitro rooting capability and rooting seasonality of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 97: 129-139.

- 181.** Mencuccini, M., Micheli, M., Angiolillo, A., Baldoni, L. 1999a. Genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Horticulturae*, 474: 515-519.
- 182.** Mencuccini, M., Micheli, M., Angiolillo, A., Baldoni, L., Frugis, G., Mariotti, D. 1999b. *Agrobacterium*-mediated DNA transfer in olive callus (*Olea europaea* L.). *Advances in Horticultural Science*, 13: 25-28.
- 183.** Mencuccini, M., Rugini, E. 1993. *In vitro* shoot regeneration from olive cultivars tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32: 283-288.
- 184.** Mencuccini, M., Corona, C., Mariotti, D. 1991. Plant regeneration and first attempt of *in vitro* genetic improvement of olive (cv. Moraiolo). *Acta Horticulturae* 300: 261-264.
- 185.** Mendil, M. 2009. L'oléiculture ; Expériences algériennes. Filaha Innove, N°4, p6.
- 186.** Mendil, M., Sebai, A. 2006. Catalogue des variétés algériennes de l'olivier. Ed. ITAFV, Algérie, 97p.
- 187.** Mendoza-de Gyves, E., Rosana Mira, F., Ruiu, F., Rugini, E. 2008. Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92: 233-238.
- 188.** Merkle, S.A., Parrot, W.A., Flinn, B.S. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (Ed.), *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 155–204.
- 189.** Miano, D., Gutierrez-Pesce, P., Lupi, R., Dradi, G., Roncasaglia, R., Taratufolo, C., Rugini, E., Muleo, R. 2004. RolABC genes are differently regulated in the organs and modify gene expression and morphology of olive cultivar Canino. In: Proceedings of XLVIII Italian society of agricultural genetics SIFV-SIGA, Joint Meeting, Lecce, 15–18 September 2004 Book of Abstracts.
- 190.** Micheli, M., Standardi, A., El Behi, A.W., Zakhour, D., Yasin, M. 2010. *In vitro* proliferation of olive 'Dolce Agogia' and 'Moraiolo': Effect of different cytokinins. *Acta Horticulturae*, 884: 587-590.
- 191.** Mirzaei, L., Yadollahi, A., Jafarkhani Kermani, M., Naderpour, M., Asghar Zeinanloo, A., Farsi, M., Davoodi, D. 2021. Evaluation of genetic stability in olive callus-induced and meristem-induced shoots using flow cytometry and amplified fragment length polymorphism techniques. *Plant Methods*, 17: 31, 15p.
- 192.** Mitrakos, K., Alexaki, A., Papidimitriou, P. 1992. Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. *Journal of Plant Physiology*, 139: 269-273.

- 193.** Mnasri, S.R., Saddoud, O.D., Rouz, S., Ben Saleh, M., Ferchichi, A. 2017. Morphological analysis of the autochthon olive varieties cultivated in the North West of Tunisia. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, 37(4): 2042-2048.
- 194.** Montilon, V., Susca, L., Potere, O., Roseti, V., Campanale, A., Saponari, A., Montemurro, C., Fanelli, V., Venerito, P., Bottalico, G. 2023. Embryo cultura, *in vitro* propagation, and molecular identification for advanced olive breeding programs. *Horticulturae*, 8(36): 11p.
- 195.** Msikita, W., Ihemere, U., Siritunga, D., Sayre, R.T. 2006. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). In *Methods in molecular biology 344, Agrobacterium protocols Vol.2*, 2006, Wang, K. (eds). 2^{ème} Ed. Humana Press Inc, USA, 485p, pp: 13-24.
- 196.** Murashige, T. et Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- 197.** Muzzalup, I., Vendramin, G.G., Chiappetta, A. 2014. Genetic biodiversity of Italian olives (*Olea europaea*) germplasm analyzed by SSR markers. *The Scientific World Journal*, 12p.
- 198.** Narváez, I., Pliego Prieto, C., Palomo-Ríos, E., Fresta, L., Jiménez-Díaz, R.M., Trapero-Casas, J.L., López-Herrera, C., Arjona-Lopez, J.M., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., 2020. Heterologous expression of the *AtNPR1* gene in olive and its effects on fungal tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 11:308.
- 199.** Narváez, I., Martín, C., Jiménez-Díaz, R.M., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. 2019. Plant regeneration via somatic embryogenesis in mature wild olive genotypes resistant to the defoliating pathotype of *verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1471.
- 200.** Narváez, I., Titouh, K., Pliego, C., Cerezo, S., Jiménez-Díaz, R.M., Trapero-Casas, J.L., López-Herrera, C., Arjona-Girona, I., Martín, C., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. 2018. Usage of the heterologous expression of the antimicrobial gene *afp* from *Aspergillus giganteus* for increasing fungal resistance in olive. *Frontiers in Plant Science*, 9:680.
- 201.** Neumann, K.H., Kumar, A., Imani, J. 2009. *Plant cell and tissue culture – a tool in biotechnology Basics and application*. Springer, USA, 333 p.
- 202.** Niaounakis, M., Halvadakis, C.P. 2006. Olive processing waste management: Literature review and patent survey. *Waste management series. Vol 5. 2^{ème} Ed. Ed. Elsevier, USA, 498 p.*
- 203.** Noormohammadi, Z., Kangarloo-Haghighi, B., Farahani, F., Ghasemazadeh-Baraki, S. 2014. Genetic stability versus somaclonal variation in tissue culture regenerated

- olive plants (*Olea europaea* cv. Koroneiki). European Journal of Experimental Biology, 4(3): 135-142.
- 204.** Oražem, P., Štajner, N., Bohanec, B. 2013. Effect of X-ray irradiation on olive shoot culture evaluated by morphological measurements, nuclear DNA content and SSR and AFLP markers. *Trees: Structure and Function*, 27: 1587–1595.
- 205.** Orinos, T., Mitrakos, K. 1991. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europaea* Var *Sylvestris* (Miller) Lehr) mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27: 183-187.
- 206.** Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur, P. 1996. Genetic variation in the Olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco. *Euphytica*, 91: 9–20.
- 207.** Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur P. 1995. Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Agronomie*, 15: 31-37.
- 208.** Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur, P., Di Giusto, F. 1993. Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L.). *Journal of Heredity*, 84: 34-42.
- 209.** Oulbi, S., Kohaich, K., Baaziz, M., Belkoura, I., Loutfi, K. 2021. Peroxidase enzyme fractions as markers of somatic embryogenesis capacities in olive (*Olea europaea* L.). *Plants*, 10: 901, 15p.
- 210.** Oulbi, S., Belkoura, I., Loutfi, K. 2018. Somatic embryogenesis from somatic explants of a Moroccan olive (*Olea europaea* L.) cultivar, 'Moroccan Picholine'. *Acta Horticulturae*, 1199: 91-96.
- 211.** Ozair, M., Hafiz, I.A, Abbasi, N.A, Mahmood, M.A., Bibi, N. 2014. Effect of different concentrations of Oryzalin on *in vitro* growth of explants of Olive cv. Moraiolo. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences*, 4(1): 51–59.
- 212.** Padilla, I.M.G., Vidoy, I., Encina, C.L. 2009. Influence of indole-butyric acid and electro-pulse on *in vitro* rooting and development of olive (*Olea europaea* L.) microshoots. *Plant Cell Reports*, 28: 1411-1420.
- 213.** Palomo-Ríos, E., Narvàez, I., Pliego-Alfaro, F., Mercado, J.A. 2021. Olive (*Olea europaea* L.) genetic transformation: current status and future prospects. *Genes*, 12: 386, 16p.
- 214.** Palomo-Ríos, E., Cerezo, S., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. 2017. Generation and selection of transgenic olive plants. *Bio-protocol*, 7(22): 9p.

- 215.** Pannelli, G., Famiani, F., Rugini, E., Bignami, D., Natali, S. 1990. Preliminary characteristics of olive somatic mutants from gamma irradiated ‘Frantoio’ and ‘Leccino’ plantlets. *Acta Horticulturae*, 286: 77–80.
- 216.** Patiño Torres, C. 2010. Variación somaclonal y selección *in vitro* con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión. *RIAA*, 1(1): 7-15.
- 217.** Peixe, A., Raposo, A., Lourenço, R., Cardoso, H., Macedo, E. 2007. Coconut water and BAP successfully replaced zeatin in olive (*Olea europaea* L.) micropropagation. *Scientia Horticulturae*, 113: 1-7.
- 218.** Pereira, J., Bernal, J., Martinelli, L., Villamil, J.J., Conde, P. 2018. Original olive genotypes found in Uruguay identified by morphological and molecular markers. *Acta Horticulturae*, 1199: 7-14.
- 219.** Peyvandi, M., Farahani, F., Hosseini-Mazinani, M., Noormohammadi, Z., Ataii, S., Asgharzade, A. 2010a. *Pseudomonas fluorescent* and its ability to promote root formation of olive microshoots. *International Journal of Plant Production*, 4(1): 63-66.
- 220.** Peyvandi, M., Nemat Farahzadi, H., Arbabian, S., Noormohammadi, Z., Hosseini-Mazinani, M. 2010b. Somaclonal variation among somatic-embryo derived plants of *Olea europaea* L “cv. Kroneiki”. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 21(1): 7-14.
- 221.** Peyvandi, M., Farahani, F., Noormohamadi, Z., Banihashemi, O., Hosseini, M., Mazinani, Atae, S. 2009a. Mass production of *Olea europaea* L. (cv. Rowghani) through micropropagation. *General and Applied Plant Physiology*, 35(1-2): 35-43.
- 222.** Peyvandi, M., Noormohamadi, Z., Banihashemi, O., Farahani, F., Majd, A., Hosseini-Mazinani, M., Sheidai, M. 2009b. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Olea europaea* L. (cv. Dezful). *Asian Journal of Plant Science*, 8(2): 146–152.
- 223.** Peyvandi, M., Ebnrahimzadeh, H., Madjd, A. 2008. Somatic embryos at different maturity stages in two olive cultivars. *Acta Horticulturae*, 791: 213-216.
- 224.** Peyvandi, M., Dadashian, A., Ebrahimzadeh, H., Madjd, A. 2001. Embryogenesis and rhizogenesis in mature zygotic embryos of olive (*Olea europaea* L.) cultivars Mission and Koroneiki. *Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran*, 12(1): 9-15.
- 225.** Pérez-Barranco, G., Torreblanca, R., Padilla, I.M.G., Sánchez-Romero, C., Pliego-Alfaro, F., Mercado, J.A. 2009. Studies on genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos: I. Evaluation of different aminoglycoside antibiotics for *nptIII*

- selection. II. Transient transformation via particle bombardment. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 97: 243–251.
- 226.** Pérez-Barranco, G., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., Sánchez-Romero, C. 2007. Genetic transformation of olive somatic embryos through biolistic. *Acta Horticulturae*, 738: 473–477.
- 227.** Pirannezhad, A., Vatanpour, A., Rahnama, H., Jaliani, N., Bozorgipour, R. 2010. Improvement of rooting and acclimatization of tissue cultured plantlets of olive (*Olea europaea* l. Cv. Zard) by *Agrobacterium rhizogenes* and *Trichoderma harzianum*. *Seed and plant production journal*, 26-2(1): 85-93. (Texte en Persian).
- 228.** Pires, R., Cardoso, H., Ribeiro, A., Peixe, A., Cordeiro, A. 2020. Somatic embryogenesis from mature embryos of *Olea europaea* L. cv. ‘Galega Vulgar’ and long-term management of calli morphogenic capacity. *Plants*, 9(758): 15p.
- 229.** Pliego-Alfaro, F., Barceló-Muñoz, A. 2001. Morfogénesis *in vitro*. In *Introducción a la biotecnología vegetal: Métodos y aplicaciones*, 2001, Caballero, J.L., Valpuesta, V. et Muñoz-Blanco, J. (eds). Publicaciones obra social y cultural Cajasur, España, 399 p, pp: 231-242.
- 230.** Polymerou-Kamilakis, A. 2006. The culture of the olive tree (Mediterranean world). In *Olive oil Chemistry and Technology*, 2006, Boskou, D. (eds). 2^{ème} Ed. Aocs Press, USA, 253 p, pp: 1-12.
- 231.** Pontikis, C.A., Loukas, M., Kousounis, G. 1980. The use of biochemical markers to distinguish olive cultivars. *Journal of Horticultural Science*, 55: 333-343.
- 232.** Pritsa, T.S., Voyiatzis, D.G. 1999. The *in vitro* morphogenetic capacity of olive embryos as affected by their developmental stage and the L-Arginine and L-Glutamine concentration in the nutrient substrate. *Acta Horticulturae*, 474: 87-90.
- 233.** Pritsa, T.S., Voyiatzis, D.G., Matsi, T.A. 1999. The buffering effect of olive embryos on the pH of the substrate, during their *in vitro* germination. *Acta Horticulturae*, 474: 71-74.
- 234.** Quaglia, M., Zizzerini, A. 2007. *In vitro* screening for sunflower (*Helianthus annuus* L.) resistant calli to *Diaporthe helianthi* fungal culture filtrate. *European Journal of Plant Pathology*, 118: 393-400.
- 235.** Rache-Cardenal, L., Rojas-Pinzón, E., Pacheco-Maldonado, J., 2008. Reinvigoration and clonation of mature buds from olive trees: *in vitro* micrografts establishment. *Bioagro*, 20(1): 57-65.

- 236.** Rallo, L., Barranco, D., Díez, C.M., Rallo, P., Suárez, M.P., Trapero, C., Pliego-Alfaro, F. 2018. Strategies for Olive (*Olea europaea* L.) breeding: cultivated genetic resources and crossbreeding. In *Advances in plant breeding strategies: Fruits*, 2018, Al-Khayri, J.M., Jain, S.M. et Johnson, D.V. (Eds). Springer, Switzerland, 990 p, pp: 535-600.
- 237.** Rallo, L., Barranco, D., De La Rosa, R., Lorenzo, L. 2008. “Chiquitita” olive. *Hortscience*, 43(2): 529-531.
- 238.** Ramezani, S., Shekafandeh, A. 2009. Callus induction from anther explant of olive (*Olea europaea* L.) influenced by plant growth regulators. *Advances in Environmental Biology*, 3(1): 21-24.
- 239.** Rapoport, H.F., Fabbri, A., Sebastiani, L. 2016. Biology. In: Rugini, E., Baldoni, L., Muleo, R., Sebastiani, L. (eds) *The olive tree genome, Compendium of plant genomes*. Springer, New York, pp: 13–25.
- 240.** Revilla, M.A., Pacheco, J., Casares, A., Rodriguez, R. 1996. *In vitro* reinvigoration of mature olive trees (*Olea europaea* L.) through micrografting. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 32: 257-261.
- 241.** Roselli, G., Donini, B. 1982. ‘Briscola’. Nuova cultivar di olivo a sviluppo compatto. *Rivista di Ortoflorofruitticoltura Italiana*, 66(2): 103–114.
- 242.** Rostami, A.A., Shahasavar, A.R. 2012. *In vitro* micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) ‘Mission’ by nodal segmentation. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 6(17): 155-159.
- 243.** Rostami, A.A., Shahasavar, A. 2009. Nano-silver particles eliminate the *in vitro* contaminations of olive ‘Mission’ explants. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8: 505.
- 244.** Roussos, P.A., Pontikis, C.A. 2002. *In vitro* propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Koroneiki. *Plant Growth Regulation*, 37: 295-304.
- 245.** Rotondi, A., Magli, M., Ricciolini, C., Baldoni, L. 2003. Morphological and molecular analyses for the characterization of a group of Italian olive cultivars. *Euphytica*, 132:129-137.
- 246.** Rugini, E. 1995. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In *Somatic embryogenesis in woody plants*, 1995, Jain, S.M., Gupta, P.K., Newton, R.J. (eds). Vol. 2. Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 515 p, pp: 171-189.
- 247.** Rugini, E. 1992. Involvement of Polyamines in Auxin and *Agrobacterium rhizogenes* - induced rooting of fruit trees *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(3): 532–536.

- 248.** Rugini, E. 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14: 207-214.
- 249.** Rugini, E. 1986. Olive (*Olea europaea* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (Ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 1: Trees I. Springer, Berlin, pp: 253–266.
- 250.** Rugini, E. 1984. *In vitro* propagation of some olive cultivars with different rootability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae.*, 24:123-134.
- 251.** Rugini, E., De Pace, C., 2016. Olive breeding with classical and modern approaches. In: Rugini, E., Baldoni, L., Muleo, R., Sebastiani, L. (eds) *The olive tree genome, Compendium of Plant Genomes*. Springer, New York, pp: 163–193.
- 252.** Rugini, E., Silvestri, C., 2016. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sativa* and var. *sylvestris*). In: Germanà, M.A., Lambardi, M., (eds). *In vitro* embryogenesis in higher plants, *Methods in molecular biology*, Vol. 1359, Springer, pp: 341-348.
- 253.** Rugini, E., Gutiérrez-Pesce, P. 2006. Genetic improvement of olive. *Pomologia Croatica*, 12: 43-74.
- 254.** Rugini, E., Baldoni, L. 2005. *Olea europaea* Olive. In *Biotechnology in agriculture series, N°29: Biotechnology of fruit nut crops, 2005*, Litz, R.E. (eds). Ed. CABI International, USA, 723 p, pp: 403-428.
- 255.** Rugini, E., Caricato, G. 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) “Canino” and “Moraiolo”. *Plant Cell Reports*, 14:257-260.
- 256.** Rugini, E., Fedeli, E. 1990. Olive (*Olea europaea* L.) as an oilseed crop. In: Y.P.S. Bajaj (ed.) *Legumes and oilseed crops I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 10 Springer, Berlin Heidelberg New York, pp: 593–641.
- 257.** Rugini, E., Tarini, P. 1986. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). *Conference Fruit Tree Biotechnology*, Paris, pp: 62.
- 258.** Rugini, E., Cristofori, V., Silvestri, C., 2016. Genetic improvement of olive (*Olea europaea* L.) by conventional and *in vitro* biotechnology methods. *Biotechnology Advances*, 34: 687-696.
- 259.** Rugini, E., Gutiérrez-Pesce, P., Muleo, R. 2008. Olive In : Kole, C. et Hall, T., (eds), *Compendium of transgenic crop plants: Transgenic temperate fruits and nuts*, Wiley-Blackwell, USA, 4: 233-258.

- 260.** Rugini, E., Rita, B., Rosario, M. 2000. Olive (*Olea europaea* var. *sativa*) transformation. In Molecular biology of woody plants, 2000, Jain, S.M., Minocha, S.C. (eds). Vol.2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 517p, pp: 245-279.
- 261.** Rugini, E., Jacoboni, A., Luppino, M. 1993. Role of basal darkening and exogenous putrescine treatment on in vitro rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to-root woody species. *Scientia Horticulturae* 53: 63-72.
- 262.** Rugini, E., Bazzoffia, A., Jacoboni, A. 1988. A simple *in vitro* method to avoid the initial dark period and to increase rooting in fruit trees. *Acta Horticulturae*, 227: 438-440.
- 263.** Rugini, E., Mencuccini, M., Biasi, R., Altamura, M.M. 2005. Olive (*Olea europaea* L.). In Protocol for somatic embryogenesis in woody plants, 2005, Jain, S.M., Gupta, P.K. (eds). Springer, Netherlands, 585 p, pp: 345-360.
- 264.** Rugini, E., Pezza, A., Muganu, M., Caricato, G. 1995. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In Biotechnology in agriculture and forestry. Somatic embryogenesis and synthetic seed, 1995, Bajaj, Y.P.S. (eds). Vol.1. Springer-Verlag, Alemania, 30: 404-414.
- 265.** Rugini, E., Baldoni, L., Silvestri, C., Mariotti, R., Narváez, I., Cultrera, N., Cristofori, V., Bashir, M.A., Mousavi, S., Palomo-Ríos, E., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F., 2020. *Olea europaea* Olive. In: Litz, R.E. et Pliego-Alfaro, F. et Hormaza, J.I., (eds), Biotechnology of fruit and nut crops, 2^{ème} édition, CABI International, pp: 343-376.
- 266.** Sabella, E., Luvisi, A., Aprile, A., Negro, C., Vergine, M., Nicoli, F., Miceli, A., De Bellis, L. 2018. *Xylella fastidiosa* induces differential expression of lignification related-genes and lignin accumulation in tolerant olive trees cv. Leccino. *Journal of Plant Physiology*, 220: 60-68.
- 267.** Sánchez-Romero, C. 2021. Somatic embryogenesis in olive. *Plants*, 10(433): 13p.
- 268.** Sánchez-Romero, C. 2019. Somatic embryogenesis in *Olea* spp. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 138: 403-426.
- 269.** Sánchez-Romero, C. 2018. Olive *Olea europaea* L. In: Jain, S.M., Gupta, P., (eds). Step wise protocols for somatic embryogenesis of important woody plants, *Forestry sciences* 85, Springer, pp: 25-38.
- 270.** Sánchez-Romero, C., Swennen, R., Panis, B. 2009. Cryopreservation of olive embryogenic cultures. *CryoLetters*, 30(5): 359-372.
- 271.** Savita, A., Virk, G.S., Nagpal, A. 2011. *In vitro* selection of calli of *Citrus jambhiri* Lush. for tolerance to culture filtrate of *Phytophthora parasitica* and their regeneration. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 17(1): 41-47.

- 272.** Sengar, A.S., Thind, K.S., Kumar, B., Pallavi, M., Gosal, S.S. 2009. *In vitro* selection at cellular level for red rot resistance in sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Growth Regulation*, 58: 201-209.
- 273.** Sghir, S., Chatelet, P., Ouazzani, N., Dosba, F., Belkoura, I. 2005. Micropropagation of eight moroccan and french olive cultivars. *HortScience*, 40(1): 193-196.
- 274.** Sharma, A., Rathour, R., Plaha, P., Katoch, V., Khalsa, G.S., Patial, V., Singh, Y., Pathania, N.K. 2010. Induction of *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*) resistance in garden pea using induced mutagenesis and *in vitro* selection techniques. *Euphytica*, 173: 345-356.
- 275.** Shibli, R.A., Shatnawi, M., Abu-Ein, Al-Juboory, K.H. 2001. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' Olive (*Olea europaea* L.). *Scientia Horticulturae*, 88: 243-256.
- 276.** Shibli, R.A., Al-Juboory, K.H. 2000. Cryopreservation of 'Nabali' olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos by encapsulation-dehydration and encapsulation-vitrification. *CryoLetters*, 21(6): 357-366.
- 277.** Souza, R.A.V., Braga, F.T., Setotaw, T.A., Neto, J.V., Azevedo, P.H., Azevedo, V.H., Almeida Cançado, G.M. 2013. Effect of coconut water on growth of olive embryos cultured *in vitro*. *Ciência Rural*, 43(2): 290-296.
- 278.** Souza, R.A.V., Braga, F.T., Azevedo, P.H., Ferreira, J.L., Almeida Cançado, G.M., 2012. Effect of light on germination *in vitro* of zygotic embryos of olive genotypes. *Revista Ceres*, 59(3): 299-304.
- 279.** Strobel, G., Nachmias, A., Hess, W.M., 1988. Improvements in the growth and yield of olive trees by transformation with the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Canadian Journal of Botany*, 66: 2581-2585.
- 280.** Taamalli, W., Geuna, F., Banfi, R., Bassi, D., Daoud, D., Zarrouk, M. 2006. Agronomic and molecular analyses for the characterization of accessions in Tunisian olive germplasm collections. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9: 467-481.
- 281.** Thakur, M., Sharma, D.R., Sharma, S.K. 2002. *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Plant Cell Reports*, 20: 825-828.
- 282.** Therios, I. 2009. *Crop production science in horticulture: Olives*. CABI Press, UK, 409 p.

- 283.** Thomas, T.D. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue cultura. *Biotechnology Advances*, 26: 618-631.
- 284.** Titouh, K., Bradaï, F., Allam, A., Madani, H., Taleb, B., Aït Meziane, M.Z. 2021. Varietal identification in olive tree (*Olea europaea* L.) by morphological and biometric characterization of fruits and stones of Algerian cultivars. *European Journal of Horticultural Science*, 86(3): 280-288.
- 285.** Titouh, K., Mazari, A., Aït Meziane, M.Z. 2020. Contribution to improvement of the traditional extraction of olive oil by pressure from whole and stoned olives by addition of a co-adjuvant (talc). *Oilseeds & Crops and Lipids*. 27: 23, 7p.
- 286.** Torreblanca, R., Cerezo, S., Palomo-Ríos, E., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. 2010. Development of high throughput system for genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103: 61-69.
- 287.** Torreblanca, R., Palomo-Ríos, E., Cerezo, S., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. 2009. *Agrobacterium*-mediated transformation of olive (*Olea europaea* L.) embryogenic cultures. *Acta Horticulturae*, 839: 387-391.
- 288.** Toufik, I., Belkoura, I., Guenoun, F. 2017. Improving germination conditions of somatic embryos derived from radicle explants of Moroccan olive cultivar Dahbia. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 5(3): 51-56.
- 289.** Toufik, I., Guenoun, F., Belkoura, I. 2014. Embryogenesis expression from somatic explants of olive (*Olea europaea* L.) cv. Picual. *Moroccan Journal of Biology*, 11: 17-25.
- 290.** Trabelsi, E.B., Najja, S., Elloumi, N., Belfeleh, Z., Msllem, M., Ghezal, R., Bouzid, S. 2011. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive (*Olea europaea* L.) 'Chetoui'. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 319-324.
- 291.** Trabelsi, E.B., Bouzid, S., Bouzid, M., Elloumi, N., Belfeleh, Z., Benabdallah, A., Ghezal, R. 2003. *In vitro* Regeneration of olive tree by somatic embryogenesis. *Journal of Plant Biology*, 46(3): 173-180.
- 292.** Trapero, A., Blanco, M.A., 2017. Enfermedades. In *El cultivo del olivo*, 2017, Barranco, D., Fernandez-Escobar, F. et Rallo, L. (eds). 7^{ème} Ed. Coed. Junta de Andalucía y Ediciones Mundi-Prensa, España, 1008 p, pp: 597-656.
- 293.** Troncoso, A., Cantos, M., Liñan, J., Troncoso, J., Rapoport, F. 2003. *In vitro* development and germination of immature olive embryos. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(5): 728-733.

- 294.** Troncoso, A., Liñan, J., Cantos, M., Acebedo, M.M., Rapoport, H.F. 1999. Feasibility and anatomical development of an *in vitro* olive cleft-graft. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74: 584-587.
- 295.** Trujillo, I., Rallo, L. 1995. Identifying olive cultivars by Isozyme Analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120(2): 318-324.
- 296.** Trujillo, I., Ojeda, A.M., Urdiroz, M.N., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., Diez M.C. 2014. Identification of the worldwide olive germplasm bank of Córdoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics and Genomes*, 10:141-155.
- 297.** Tzfira, T., Citovsky, V. 2008. *Agrobacterium: from biology to biotechnology*, Springer, USA, 750p.
- 298.** Van Den Bulk, R.W. 1991. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding – a review. *Euphytica*, 56: 269-285.
- 299.** Vargas, P., Kadereit, J.W. 2001. Molecular fingerprinting evidence (ISSR, Inter-simple Sequence Repeats) for a wild status of *Olea europaea* L. (*Oleaceae*) in the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula. *Flora*, 196: 142-152.
- 300.** Veilleux, R.E., Johnson, A.A.T. 1998. Somaclonal variation: Molecular analysis, transformation, interaction, and utilization. *Plant Breeding Reviews*, 16: 229-268.
- 301.** Vergari, G., Patuma, M., Fontanazza, G. 1996. Utilisation des marqueurs RAPD pour la caractérisation du germoplasme d'olivier. *Olivae*, 60: 19-22.
- 302.** Vidoy-Mercado, I., Imbroda-Solano, I., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F. 2012. Differential *in vitro* behaviour of Spanish olive (*Olea europaea* L.) cultivars 'Arbequina' and 'Picual'. *Acta Horticulturae*, 949: 27-30.
- 303.** Vijaya Kumar, J., Ranjitha Kumari, B.D., Sujatha, G., Castaño, E. 2008. Production of plants resistant to *Alternaria carthami* via organogenesis and somatic embryogenesis of safflower cv. NARI-6 treated with fungal culture filtrates. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 85-96.
- 304.** Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Ed. IBP. 164p.
- 305.** Von Arnold, S. 2008. Somatic embryogenesis. In *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1: The background, 2008, George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G-J. (eds). 3^{ème} Ed, Springer, Netherlands, 501 p, pp: 335-354.
- 306.** Voyiatzis, D.G. 1995. Dormancy and germination of olive embryos as affected by temperature. *Physiologia Plantarum*, 95: 444-448.

- 307.** Yakoub-Bougdal, S., Chérifi, D., Bonaly, J. 2007. Production de vitroplants d'*Olea europea* var. Chemlal. Cahiers Agriculture, 16(2): 125-127.
- 308.** Yari, R., Farahani, F., Sheidai, M., Kouhsarri, S.M., Fahimi, H. 2011. The effects of prolonged vegetative reproduction of the two Iranian olive cv. tree cultivars (Dezful Baghmalek and Dezful Safiabad) on morphological traits. African Journal of Biotechnology, 10(45): 9076-9081.
- 309.** Zacchini, M., De Agazio, M. 2004. Micropropagation of local olive cultivar for germplasm preservation. Biologia Plantarum, 48(4): 589-592.
- 310.** Zienkiewicz, A., Jiménez-López, J.C., Zienkiewicz, K., Alché, J.D., Rodríguez-García, M.I. 2011. Development of the cotyledon cells during olive (*Olea europaea* L.) *in vitro* seed germination and seedling growth. Protoplasma, 248: 751-765.

Annexes

Annexes (Analyses statistiques)

1. Annexe 1 : Embryogenèse somatique

a. Annexe 1a : Induction des cals embryogènes

- **Taux de callogenèse** (après 3 semaines sur les 1^{ers} milieux d'induction (Ind1))

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
109,057	16,919	9	< 0,0001	0,05

- **Taux d'élongation** (après 3 semaines sur les 1^{ers} milieux d'induction (Ind1))

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
192,258	16,919	9	< 0,0001	0,05

- **Taux de callogenèse** (après 4 semaines sur les 2^{èmes} milieux d'induction (Ind2))

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
54,000	16,919	9	< 0,0001	0,05

- **Taux de nécrose** (après 4 semaines sur les 2^{èmes} milieux d'induction (Ind2))

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
96,200	16,919	9	< 0,0001	0,05

- **Taux d'embryogenèse** (après 8 semaines sur le milieu ECO)

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
17,014	16,919	9	0,048	0,05

- **Taux de nécrose** (après 8 semaines sur le milieu ECO)

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
104,553	16,919	9	< 0,0001	0,05

b. Annexe 1b : Estimation de la capacité de prolifération des cals embryogènes

• **Facteur 1 : Milieu de culture**

- **Solide**

➤ **Accroissement du poids frais (g)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	8	0,128	0,016	12,045	< 0,0001
Erreur	18	0,024	0,001		
Total corrigé	26	0,152			

- **Liquide**

➤ **Accroissement du poids frais (g)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	8	0,101	0,013	15,991	< 0,0001
Erreur	18	0,014	0,001		
Total corrigé	26	0,115			

• **Facteur 2 : Balance hormonale**

- **Solide**

➤ **Accroissement du poids frais (g)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	14	0,248	0,018	9,004	< 0,0001
Erreur	30	0,059	0,002		
Total corrigé	44	0,307			

- **Solide**

➤ **Accroissement du poids frais (g)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	14	0,296	0,021	17,909	< 0,0001
Erreur	30	0,035	0,001		
Total corrigé	44	0,331			

- **Facteur 3 : Concentration du saccharose**

- **Solide** (Corrélation Accroissement du poids frais/Concentration du saccharose $r = 0.96$)

- **Accroissement du poids frais (g)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	17	0,380	0,022	26,038	< 0,0001
Erreur	36	0,031	0,001		
Total corrigé	53	0,411			

- **Liquide** (Corrélation Accroissement du poids frais/Concentration du saccharose $r = 0.98$)

- **Accroissement du poids frais (g)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	17	0,494	0,029	56,746	< 0,0001
Erreur	36	0,018	0,001		
Total corrigé	53	0,512			

- **Facteur 4 : Charbon actif**

- **Solide** (Corrélation Accroissement du poids frais/Concentration du CA $r = 0.83$)

- **Accroissement du poids frais (g)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	8	0,115	0,014	4,976	0,002
Erreur	18	0,052	0,003		
Total corrigé	26	0,168			

- **Liquide** (Corrélation Accroissement du poids frais/Concentration du CA $r = 0.90$)

- **Accroissement du poids frais (g)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	8	0,057	0,007	9,388	< 0,0001
Erreur	18	0,014	0,001		
Total corrigé	26	0,071			

- **Facteur 5 : Durée d'incubation**

- **Solide**

- **Accroissement du poids frais (g)** (Corrélation Accroissement du poids frais/Durée d'incubation sur milieu solide $r = 0.95$)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	23	11,645	0,506	19,002	< 0,0001
Erreur	48	1,279	0,027		
Total corrigé	71	12,924			

- **Vitesse d'accroissement du poids frais (g/s)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	23	0,052	0,002	5,564	< 0,0001
Erreur	48	0,020	0,000		
Total corrigé	71	0,072			

- **Liquide**

- **Accroissement du poids frais (g)** (Corrélation Accroissement du poids frais/Durée d'incubation en milieu liquide $r = 0.94$)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	17	0,502	0,030	19,742	< 0,0001
Erreur	36	0,054	0,001		
Total corrigé	53	0,556			

- **Vitesse d'accroissement du poids frais (g/s)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	17	0,012	0,001	3,928	0,000
Erreur	36	0,006	0,000		
Total corrigé	53	0,018			

c. Annexe 1c : Production des embryons somatiques

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	2301,556	1150,778	38,077	0,000
Erreur	6	181,333	30,222		
Total corrigé	8	2482,889			

d. Annexe 1d : Différenciation et maturation des embryons somatiques

➤ Taux de nécrose

Khi ² (Valeur observée)	Khi ² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
1,110	5,991	2	0,574	0,05

➤ Taux de prolifération

Khi ² (Valeur observée)	Khi ² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
6,700	5,991	2	0,048	0,05

➤ Taux de différenciation

Khi ² (Valeur observée)	Khi ² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
9,934	5,991	2	0,007	0,05

➤ Nombre moyen d'embryons produits

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	2	25,021	12,510	127,346	< 0,0001
Erreur	66	6,484	0,098		
Total corrigé	68	31,505			

e. Annexe 1e : Germination des embryons somatiques et régénération de plantules

➤ Taux de germination

Khi ² (Valeur observée)	Khi ² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
25,535	24,996	15	0,0414	0,05

➤ Durée moyenne de germination (Jours)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	15	855,930	57,062	11,769	< 0,0001
Erreur	112	543,050	4,849		
Total corrigé	127	1398,980			

➤ Durée moyenne d'émergence de la racine (Jours)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Lignée	15	1282,820	85,521	17,489	< 0,0001
Erreur	112	547,667	4,890		
Total corrigé	127	1830,487			

➤ Taille moyenne des vitroplants (cm)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	15	31,152	2,077	62,178	< 0,0001
Erreur	112	3,741	0,033		
Total corrigé	127	34,893			

➤ Nombre moyen de feuilles

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	15	245,556	16,370	53,144	< 0,0001
Erreur	112	34,500	0,308		
Total corrigé	127	280,056			

f. Annexe 1f : Micropropagation des pousses issues des embryons somatiques

➤ Taux de débourrement

Khi ² (Valeur observée)	Khi ² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
125,397	19,675	11	< 0,0001	0,05

➤ Nombre moyen de bourgeons débourrés

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	12,378	1,125	10,296	< 0,0001
Erreur	72	7,869	0,109		
Total corrigé	83	20,247			

➤ Durée moyenne de débourrement (Jours)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	9961,956	905,632	47,810	< 0,0001
Erreur	72	1363,833	18,942		
Total corrigé	83	11325,789			

➤ Taille moyenne de la pousse (cm)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	160,776	14,616	19,454	< 0,0001
Erreur	72	54,094	0,751		
Total corrigé	83	214,869			

➤ Nombre moyen de feuilles

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	553,289	50,299	20,125	< 0,0001
Erreur	72	179,949	2,499		
Total corrigé	83	733,239			

➤ **Taux de callogenèse basale**

Khi ² (Valeur observée)	Khi ² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
72,800	19,675	11	< 0,0001	0,05

➤ **Taux d'enracinement**

Khi ² (Valeur observée)	Khi ² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
47,395	19,675	11	< 0,0001	0,05

➤ **Durée moyenne d'enracinement (Jours)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	20312,142	1846,558	183,332	< 0,0001
Erreur	72	725,200	10,072		
Total corrigé	83	21037,342			

➤ **Nombre moyen de racines**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	45,094	4,099	46,868	< 0,0001
Erreur	72	6,298	0,087		
Total corrigé	83	51,391			

2. Annexe 2 : Variation somaclonale*a. Annexe 2a : Sélection en milieu liquide (Sélection discontinue)*➤ **Accroissement du poids frais (g) (après 3 semaines)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	20	0,811	0,041	13,898	< 0,0001
Erreur	42	0,123	0,003		
Total corrigé	62	0,934			

➤ **Taux de brunissement** (après 3 semaines)

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
390,873	31,410	20	< 0,0001	0,05

➤ **Poids frais total (g)** (après 3 mois)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	20	26,272	1,314	426,610	< 0,0001
Erreur	42	0,129	0,003		
Total corrigé	62	26,402			

b. Annexe 2b : Sélection en milieu solide (Sélection continue)➤ **Accroissement du poids frais (g)** (après 3 semaines)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	20	0,363	0,018	17,823	< 0,0001
Erreur	42	0,043	0,001		
Total corrigé	62	0,406			

➤ **Taux de brunissement** (après 3 semaines)

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
423,259	31,410	20	< 0,0001	0,05

➤ **Poids frais total (g)** (après 15 semaines)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	20	1,858	0,093	36,866	< 0,0001
Erreur	42	0,106	0,003		
Total corrigé	62	1,964			

3. Annexe 3 : Transformation génétique

➤ Taux de débourrement

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
66,434	14,067	7	< 0,0001	0,05

➤ Nombre moyen de bourgeons débourrés

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	7	14,648	2,093	18,890	< 0,0001
Erreur	112	12,407	0,111		
Total corrigé	119	27,056			

➤ Durée moyenne de débourrement (Jours)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	7	5876,260	839,466	31,889	< 0,0001
Erreur	112	2948,373	26,325		
Total corrigé	119	8824,634			

➤ Taille moyenne de la pousse (cm)

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	7	189,344	27,049	111,383	< 0,0001
Erreur	112	27,199	0,243		
Total corrigé	119	216,543			

➤ Nombre moyen de feuilles

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	7	614,263	87,752	239,257	< 0,0001
Erreur	112	41,078	0,367		
Total corrigé	119	655,341			

➤ **Taux d'enracinement**

Khi² (Valeur observée)	Khi² (Valeur critique)	DDL	p-value	alpha
44,182	14,067	7	< 0,0001	0,05

➤ **Durée moyenne d'apparition de la 1^{ère} racine (Jours)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	7	6190,942	884,420	44,389	< 0,0001
Erreur	112	2231,546	19,925		
Total corrigé	119	8422,488			

➤ **Durée moyenne d'apparition des racines (Jours)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	7	9122,898	1303,271	62,917	< 0,0001
Erreur	272	5634,256	20,714		
Total corrigé	279	14757,154			

➤ **Nombre moyen des racines**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	7	38,484	5,498	16,862	< 0,0001
Erreur	112	36,516	0,326		
Total corrigé	119	74,999			

➤ **Longueur moyenne des racines (cm)**

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	7	143,052	20,436	11,455	< 0,0001
Erreur	112	199,811	1,784		
Total corrigé	119	342,864			

Résumés

Résumé

Les outils biotechnologiques peuvent être une alternative efficace pour la création variétale et la multiplication de l'olivier vu que les méthodes classiques sont devenues incapables d'achever des acquis significatifs notamment dans le contexte actuel du changement climatique. Dans l'objectif d'élaborer une approche biotechnologique pour l'obtention de plants d'olivier tolérants aux pathogènes fongiques avec une capacité d'enracinement améliorée chez le principal cultivar en Algérie 'Chemlal' ; il fallait établir un protocole efficace de régénération *in vitro* par embryogenèse somatique induite à partir de radicules d'embryons zygotiques. Par la suite, induire une variation somaclonale par sélection des cals en présence du filtrat de culture de *Verticillium dahliae* Kleb. causant la verticilliose d'olivier afin de régénérer des plants résistants au pathogène. Enfin, améliorer la capacité d'enracinement *in vitro* par inoculation avec *Agrobacterium rhizogenes* des microboutures issues après germination d'embryons somatiques.

Les résultats obtenus lors de l'optimisation des différentes parties de l'étude montrent que :

☞ Une induction de callogenèse sur le milieu OMc additionné d'AIB et Zéatine permet l'obtention de plusieurs cals embryogènes dont le maintien sur le milieu ECO additionné d'AIB, Zéatine et BAP permet une meilleure prolifération et expression embryogène. Enfin, un milieu OM solide additionné d'hormones permet une bonne germination des embryons somatiques et le développement de plantules facilement acclimatables.

☞ Une sélection en milieu liquide pendant trois semaines en présence du filtrat de culture de *Verticillium* est plus efficace qu'un long maintien sur un milieu solide additionné du filtrat fongique. Toutefois, les embryons isolés après sélection génèrent des plantules dont l'acclimatation ou la multiplication pour évaluer leur résistance aux pathogènes fongiques n'étaient pas possibles vu leur très faible développement.

☞ Une inoculation par *Agrobacterium rhizogenes* combinée avec la présence de l'auxine AIB dans le milieu de culture améliorent significativement le développement de pousses mais beaucoup plus l'enracinement des microboutures à travers une émission rapide de plusieurs longues racines facilitant leur acclimatation.

Mots clés : Embryogenèse somatique, Enracinement, Olivier, Régénération *in vitro*, Résistance, Sélection *in vitro*, Transformation génétique, Variation somaclonale.

Summary

Biotechnological tools can be an efficient alternative for the varietal creation and multiplication of olive tree given that conventional methods became unable to achieve significant results particularly in the current context of climate change. With the aim to elaborate a biotechnological approach for obtaining olive plants tolerant to fungal pathogens with improved rooting capacity in the main cultivar in Algeria ‘Chemlal’; it was necessary to establish an effective protocol for *in vitro* regeneration by somatic embryogenesis induced from radicles of zygotic embryo. Subsequently, induce somaclonal variation by callus selection in the presence of *Verticillium dahliae* Kleb. culture filtrate, causing olive verticillium wilt in order to regenerate plants resistant to the pathogen. Finally, improve the *in vitro* rooting capacity by inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* of micro-cuttings obtained after germination of somatic embryos.

The results obtained during the optimization of the different parts of the study show that:

☞ Induction of callogenesis on OMc medium supplemented with IBA and Zeatin allows the production of several embryogenic calli which the maintenance on ECO medium supplemented with IBA, Zeatin and BA allows a better cell proliferation and embryogenic expression. Finally, a solid OM medium supplemented with hormones allowed a good germination of somatic embryos and development of easily acclimatized plantlets.

☞ Selection in a liquid medium for three weeks in the presence of *Verticillium* filtrate culture was more effective than a long maintenance on solid medium with fungal filtrate. However, the embryos isolated after selection generated plantlets whose acclimatization or multiplication to assess their resistance to fungal pathogens was not possible due their very poor development.

☞ Inoculation with *Agrobacterium rhizogenes* combined with the presence of the auxin IBA in the culture medium significantly improved the development of shoots as well as the rooting of micro-cuttings through a rapid emission of several long roots facilitating their acclimatization.

Keywords: Somatic embryogenesis, Rooting, Olive tree, *In vitro* regeneration, Resistance, *In vitro* selection, Genetic transformation, Somaclonal variation.

يُمكن لتقنيات التكنولوجيا الحيوية أن تكون بديلاً فعالاً لتطوير أصناف جديدة و تكثير شجرة الزيتون بالنظر إلى أن الطرق التقليدية غير قادرة على تحقيق نتائج مهمة بمفردها لا سيما في السياق الحالي لتغيّر المناخ. لذا، بهدف تطوير مقارنة بيوتكنولوجية للحصول على نباتات زيتون مقاومة للأمراض الفطرية مع قدرة تجذير محسّنة عند الصنف الأهم للزيتون في الجزائر "شمال"؛ كان من الضروري ضبط منهجية فعالة للتجدد عن طريق تكوّن الأجنة من خلايا جسمية مستحثة من جذيرات الأجنة الزيجوتية. بعد ذلك، تم تحفيز التباين النسيلى الجسمي عن طريق إنتقاء الكالوس في وجود مستخلص استنبات *Verticillium dahliae* Kleb. المسبب لذبول الزيتون؛ من أجل تجديد نباتات مقاومة للمرض. وأخيراً، تحسين قدرة التجذير عن طريق إلقاح القطع الدقيقة المتحصل عليها بعد إنبات الأجنة الجسمية باستخدام بكتيريا *Agrobacterium rhizogenes*.

أظهرت النتائج المُحصّلة عليها من خلال تحسين المراحل المختلفة للدراسة ما يلي :

☞ سمح تحفيز الكالوس على وسط OMC المكمل بـ AIB و Zeatin بإنتاج العديد من الكالوس المؤلّد للأجنة الجسمية، والذي سمح حفظها على وسط ECO المكمل بـ AIB و Zeatin و BAP بتكاثر خلوي وتولّد جنيني أفضل. أخيراً، سمح وسط OM الصلب المكمل بمنظّمات النمو بالإنبات الجيد للأجنة الجسمية وتطوير شتلات سهلة التأقلم.

☞ يُعدّ الإنتقاء في وسط سائل لمدة ثلاثة أسابيع في وجود مستخلص *Verticillium* أكثر فعالية من الإبقاء الطويل المدى فوق وسط صلب مع إضافة المستخلص الفطري ومع ذلك، فإنّ الأجنة المعزولة بعد الإنتقاء وُلدت شتلات لم يكن من الممكن أقلمتها أو تكثيرها لتقييم مقاومتها للمرض نظراً لضعف نموها.

☞ يؤدي الإلقاح باستخدام البكتيريا *Agrobacterium rhizogenes* بالإضافة إلى وجود الأكسين AIB في وسط الإستنبات إلى تحسّن في نمو البراعم وبشكل ملحوظ في تجذّر العقل الدقيقة نتيجة تكوّن سريع لعدة جذور طويلة التي سهلت أقلمة النباتات.

كلمات المفتاح : تكون الأجنة من خلايا جسمية ، التجذير، الزيتون، التجذد الدقيق، المقاومة، الإنتقاء، التحوير الوراثي، التباين الجسمي النسيلى.

Articles publiés

Somatic embryogenesis and plant regeneration from radicles of olive (*Olea europaea* 'Chemlal') zygotic embryos

Khayreddine TITOUH^{1,2,3}, Khadidja HADJ-MOUSSA^{1,3}, Nazim BOUFIS⁴, Lakhdar KHELIFI³

Received February 28, 2022; accepted November 14, 2022.
Delo je prispelo 28. februarja 2022, sprejeto 14. novembra 2022

Somatic embryogenesis and plant regeneration from radicles of olive (*Olea europaea* 'Chemlal') zygotic embryos

Abstract: Olive improvement by biotechnological tools such as genetic transformation requires an efficient *in vitro* regeneration system. Somatic embryogenesis seems the most suitable process. Our work describes for the first time the regeneration of whole plants in the main olive cultivar in Algeria 'Chemlal' via somatic embryogenesis induced from radicles of mature zygotic embryos. The obtained results showed that the establishment of a competent embryogenic culture is highly influenced by the chemical composition of the calli induction and maintenance media as well as addition of growth regulators. More than 10 and 13 % of nodular calli were obtained after callogenesis respectively on MS and OMc solid media containing IBA and zeatin followed by transfer to the same media without zeatin and a reduced concentration of auxin, while embryogenesis rates of 3.3 and 6.7 % were obtained respectively with IAA on MS medium and NAA on both tested media. However, no embryogenesis was observed with 2, 4-D or control which induced less callogenesis. Subsequently, an ECO medium with IBA, zeatin and BA particularly in liquid culture, allows better calli proliferation and embryogenic expression compared to OM and MS media. Finally, matured somatic embryos germinate quickly on a solid OM basal medium and generate normal well-developed plantlets easily acclimatized to natural conditions.

Key words: embryogenic callus; growth regulators; olive; proliferation rate; somatic embryo

Somatska embriogeneza in vzgoja rastlin iz radikule zigotskih embrijev oljke (*Olea europaea* 'Chemlal')

Izveček: Izboljšanje oljke z biotehnološkimi orodji kot jer genetska transformacija zahteva učinkovit *in vitro* sistem vzgoje rastlin. V tem pogledu se zdi somatska embriogeneza najprimernejši način vzgoje. Raziskava opisuje prvič vzgojo rastlin najvažnejše sorte oljke Chemlal v Alžiriji s somatsko embriogenezo iz radikule zrelih zigotskih embrijev. Rezultati so pokazali, da je vzpostavitev primerne embriogene kulture močno odvisna od kemične sestave gojišča, v katerem poteka indukcija kalusa in gojišča za njegovo vzdrževanje kot tudi od dodatka rastnih regulatorjev. Več kot 10 in 13 % nodularnih kalusov je bilo pridobljenih na trdih MS in OMc gojiščih, ki sta vsebovali IBA in zeatin, čemur je sledil prenos v isto gojišče brez zeatina in zmanjšano koncentracijo auksina, 3,3 in 6,7 % embriogeneze pa je bilo doseženo z IAA na MS gojišču in dodatkom NAA na obeh preiskovanih gojiščih. Nasprotno pa ni bilo embriogeneze pri dodatku 2,4-D ali pri kontroli, kjer je bila indukcija kalogeneze slabša. Naknadno je ECO gojišče z IBA, zeatinom in BA, še posebej v tekoči kulturi, omogočilo boljšo proliferacijo in pojav embriogeneze v primerjavi z OM in MS gojiščem. Na koncu so zreli somatski embriji hitro vzkalili na trdnem OM osnovnem gojišču in dali normalne, dobro razvite rastlinice, ki so se zlahka prilagodile naravnim razmeram.

Ključne besede: embriogeni kalus; rastni regulatorji; oljka; hitrost proliferacije; somatski embrio

1 National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA), Research Center of Oued Ghir, Béjaia, Algeria

2 Corresponding author, e-mail: khayreddine.titouh@inraa.dz

3 National Higher School of Agronomy (ENSA), Laboratory of Genetic Resources and Biotechnologies (LRG-B), Algiers, Algeria

4 National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA), Research Center of Baraki, Algiers, Algeria

1 INTRODUCTION

The olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the most important crops in the Mediterranean region. In Algeria, several varieties of olive tree exist, of which the most cultivated are 'Chemlal' for oil extraction and 'Sigoise' as a table olive (Haddad et al., 2020) although other more interesting local cultivars also exist (Boukhari et al., 2020). Recently, the emergence of verticillium wilt caused by the fungus *Verticillium dahliae* Kleb. in newly established olive orchards has raised concerns about the development of the culture worldwide (Montes-Osuna and Mercado-Blanco, 2020) including in Algeria (Boutkhil et al., 2016). This soil-borne pathogen penetrates the plant via the roots and causes the necrosis of the organs as consequence of the obstruction of the vessels following the development of the fungal mycelium (Montes-Osuna and Mercado-Blanco, 2020). Indeed, the use of resistant genotypes remains the best solution to control this disease (Boutkhil et al., 2016; Narváez et al., 2019). However, the classical methods of breeding and multiplication achieved limited results and became unable to produce alone significant gains due to the long juvenile period of the species (10 to 15 years) specially in the current context of climate change (Rugini et al., 2020). Therefore, the use of biotechnological methods such as genetic transformation could be of great benefit for varietal creation in olive tree. However, the application of these techniques requires an effective *in vitro* regeneration system mainly for recalcitrant genotypes. Somatic embryogenesis seems to be the most appropriate and powerful *in vitro* method in several woody species including olive tree (Sánchez-Romero, 2019 and 2021).

Somatic embryogenesis has been induced from different explants of several olive cultivars. However, juvenile tissue is generally more successful for recalcitrant species (Von Arnold, 2008). Thus, the best results of olive embryogenic calli formation and regeneration were often obtained with juvenile tissues particularly radicles of mature zygotic embryos (Pires et al., 2020) because they include undifferentiated cells with a very high embryogenic activity (Sánchez-Romero 2019) while the petioles and the external parts of the leaf blade remain the most promising adult tissues for olive regeneration (Mazri et al., 2013) and even in wild olive (Narváez et al., 2019).

Nutritional and hormonal requirement for somatic embryogenesis depends directly on the type of explant and its degree of development and more on the genotype (Von Arnold, 2008). Induction and maintenance of olive embryogenic calli have often been achieved under dark conditions on solid medium based on the chemical composition of Olive Medium 'OM' (Rugini, 1984) or MS (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with

growth regulators. Later, the germination of somatic embryos can be successfully achieved under photoperiod on a simple medium even without hormones (Mazri et al., 2020) or a preliminary rigorous phase of maturation (Sánchez-Romero, 2019). Plants with a stable phenotype are regenerated despite some phenotypic variations observed after long periods of *in vitro* maintenance (Bradā et al., 2016) and easily acclimatized to *ex vitro* conditions. However, the high genotype dependence limits the applicability and standardization of the pre-established protocols (Sánchez-Romero, 2021).

Thereby, our work describes for the first time an efficient protocol for *in vitro* regeneration of whole olive plants by somatic embryogenesis induced from radicles of zygotic embryos of the main cultivar in Algeria 'Chemlal', in order to apply some biotechnological techniques of genetic improvement particularly genetic transformation and induction of somaclonal variation. Thus, the effects of chemical composition of the culture medium and addition of growth regulators on the induction, proliferation of embryogenic calli as well as maturation and germination of somatic embryos were studied. In addition, acclimatization of the obtained plants to natural conditions was tested.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 PLANT MATERIAL AND DISINFECTION

Seeds extracted from the stones of olive cultivar 'Chemlal' mature fruits were sterilized with ethanol 70 % (v/v) for 1 min followed by soaking in sodium hypochlorite (NaClO 12°) at a concentration of 10 % (v/v) during 10 to 15 min. The disinfected seeds were rinsed three times with sterile distilled water for 5 min each time and kept immersed in water for 48 h at 25 ± 2 °C. After that, seeds were sterilized again as previous and conserved under sterile conditions, to extract the zygotic embryos from which radicles were carefully isolated to be used as explants for callus induction.

2.2 INDUCTION OF EMBRYOGENIC CALLI

Callogenesis was induced by culturing the previously isolated radicles during three weeks on two different solid media OMc based on Olive Medium 'OM' (Rugini, 1984) as adapted for callogenesis by Cañas and Benbadis (1988) or MS (Murashige and Skoog, 1962). Both media contain 0.5 mg l⁻¹ of zeatin (Zea) and 5 mg l⁻¹ of one of various auxins: indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-butyric acid (IBA), naphthyl-acetic acid (NAA)

or 2,4-dichloro-phenoxy-acetic acid (2,4-D). Then, explants were transferred during four weeks on the same media but without zeatin and with a reduced concentration of the auxin to $1/10^{\text{th}}$. The obtained calli were maintained for eight weeks on the cyclic embryogenesis olive medium (ECO) (Cerezo et al., 2011) with 0.1 mg l^{-1} of zeatin, 0.1 mg l^{-1} of benzylaminopurine (BA) and 0.05 mg l^{-1} of the previous auxin used during calli induction in addition to 0.55 g l^{-1} of glutamine and 1 g l^{-1} of casein hydrolyzate. All the used media during the establishment step of embryogenic calli contain 20 g l^{-1} of sucrose and 50 mg l^{-1} of myo-inositol. The pH was adjusted to 5.74 with NaOH or HCl (1 N) before adding 6 g l^{-1} of agar. Six radicles per Petri dish containing 25 ml of the culture medium and five dishes per treatment were incubated in the dark at $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. The changes of the radicle shape, appearance of callus as well as its texture and structure have been observed.

2.3 PROLIFERATION OF EMBRYOGENIC CULTURES

Three cell lines of calli induced on OMc with IBA and zeatin and considered as embryogenic for their good friability, nodular structure, low browning and well embryogenic expression were selected to estimate the embryogenic potential based on their proliferation rate (mass increase) in addition to embryo production and degree of necrosis on the maintenance medium. Thus, an embryogenic mass of 0.1 g was cultured on solid medium or in liquid culture with 100 rpm of stirring. Three chemical compositions (ECO, OM and MS) were tested. All the tested media contain 0.1 mg l^{-1} zeatin, 0.1 mg l^{-1} BA and 0.05 mg l^{-1} IBA in addition to 0.55 g l^{-1} glutamine and 1 g l^{-1} casein hydrolyzate. Furthermore, five combinations of growth regulators (including the control) composed of 0.1 mg l^{-1} of BA and 0.05 mg l^{-1} of IBA or NAA combined with 0.1 mg l^{-1} of zeatin or Thidiazuron (TDZ) were added to the ECO basal medium. At least three Petri dishes or three Erlenmeyer flasks of 100 ml containing 25 ml of medium were incubated in the dark at $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. After four weeks, the whole produced callus was recovered, weighed and the increase of the fresh mass in addition to the callus morphological traits such as texture, appearance of embryogenic structures, levels of friability and necrosis were determined, and a new inoculum of 0.1 g has been taken for the next subculture. The follow-up was carried out at least with three successive subcultures. Elsewhere, at the end of the liquid culture, the callus recovered by filtration was weighed and all the somatic embryos produced at different stages of development were determined.

2.4 MATURATION AND GERMINATION OF SOMATIC EMBRYOS

The pro-embryos used for maturation were produced by culturing a mass of 1 g of callus from each embryogenic line under total obscurity in 50 ml of liquid ECO medium containing growth regulators with stirring of 100 rpm. After four weeks, all the embryos at the globular, cordiform or torpedo stages exceeding 2 mm in size were transferred to a basal ECO solid medium supplemented with 1 g l^{-1} of activated charcoal for maturation during eight weeks while the cotyledonary embryos were directly germinated. More than three Petri dishes, containing at least nine pro-embryos each one, were incubated in total darkness at $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Necrosis, cell proliferation and differentiation of mature embryos were recorded.

Germination of the matured and cotyledonary embryos has been achieved on OM basal medium with 20 g l^{-1} of sucrose, 100 mg l^{-1} of myo-inositol and solidified with 6 g l^{-1} of agar. More than sixteen embryos were cultivated individually in test tubes for eight weeks under a 16 h light photoperiod at a temperature of $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Germination, root emergence, shoot length and number of developed leaves were observed. The obtained plantlets exhibiting an acceptable length with several well-developed leaves were acclimatized within laboratory for about two months on a humidified mixture of sand/potting soil/perlite at a rate of 2/2/1 (v/v/v). The reacting plants were transferred under natural conditions in a greenhouse on a substrate rich in organic matter and frequently irrigated before being permanently planted in the field.

2.5 STATISTICAL ANALYSIS

All statistical analyzes of the data (Analysis of variance and tests) were performed using the "XLSTAT" program version 2016.02.27444. In the case of a significant difference, the separation of the means was carried out by Fisher's LSD (Least Significant Difference) test. The percentages were analyzed by the chi-square test. The letters in the tables indicate homogeneous groups at significance level of 5 %.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 INDUCTION OF EMBRYOGENIC CALLI

Callogenesis from radicles of olive zygotic embryos was significantly influenced by the chemical composition of the induction medium as well as the used growth regu-

lators particularly the type of auxin. After three weeks, more calli were observed on OMc medium than on MS independently of the added growth regulators' balance except for 2,4-D with zeatin. The 'OMc' medium adapted for callogenesis by Cañas and Benbadis (1988) has been commonly used with olive juvenile tissues such as radicles and cotyledonary segments while the MS chemical composition was more beneficial for olive petioles and leaves segments (Trabelsi et al., 2011; Mazri et al., 2013) and even wild olive (Narváez et al., 2019). In fact, the best rate of callogenesis (100 %) was obtained on OMc with zeatin and IBA while less than 13 % of calli was obtained on controls and 26.7 % on OMc with 2,4-D (Table 1, Figure 1A and B). Mazri et al. (2012) noted that olive radicles on OMc medium containing IBA and 2iP (6-dimethylallylamino-purine) increase in size from the first week with formation of white calli on the injured part after three weeks in most of explants. However, Rugini (1995) indicated that callus can be formed even in the absence of auxins although obtaining embryogenic calli imperatively requires the combination of growth regulators inducing the conversion of somatic cells to a meristematic state (Maalej et al., 2002). Furthermore, Rugini (1988) indicated that 2, 4-D with BA induces less calli, inhibits cell differentiation and causes rapid and marked browning. These observations corroborate perfectly with our results where a weak amorphous callogenesis was observed on the controls media in addition to a rapid browning of the few calli obtained with 2, 4-D.

Transferring the explants to a medium without zeatin

and with a reduced concentration of auxin induced their browning. However, 53.3 and 56.7 % of calli induced on OMc containing respectively IAA or IBA continue to proliferate better with production of nodules (Figure 1C) while 76.7 and 86.7 % of calli obtained respectively on OMc and MS containing 2,4-D showed a high browning with a low callogenesis (6 to 10 %) close to the control allowing 6.7 % of proliferation (Table 1). Mazri et al. (2012) noted that olive calli in the absence of cytokinin and reduced concentrations of auxins turn brown quickly due to a high accumulation of phenolic compounds reducing cell growth (Trabelsi et al., 2011). Nevertheless, calli produced in the presence of NAA were slightly browned (16 to 30 %) but with a significant loss of their proliferation capacity. Our results agree with the observation of Rugini (1988) indicating that NAA, despite the poor induced callogenesis, promotes embryogenic expression with less necrosis of cell masses.

Later, the passage of the cultures to the ECO solid medium including the appropriate combination of growth regulators indicated that obtaining and establishment of embryogenic calli were more determined by the auxin used during callogenesis than by the chemical composition of the induction medium. Pires et al. (2020) noted that a second transfer to an ECO medium rich in cytokinins allows a slow restart of cell proliferation with a significant embryogenic expression by formation of an easily separated nodules (Cerezo et al., 2011) considered as the initial marker of somatic embryogenesis (Mazri et al., 2013). However, low embryogenesis rates were often

Table 1: Effect of the chemical composition (OMc or MS) of the induction medium and growth regulators combination (different auxins + zeatin) on callogenesis, browning and somatic embryogenesis rates from radicles of olive zygotic embryos, 'Chemlal'

Induction medium	Auxins	Callogenesis (%)		Browning (%)		Embryogenesis (%)	
		3 weeks (+ Growth regulators)	4 weeks (- zeatin)	4 weeks (- zeatin)	+ 8 weeks (ECO)	8 weeks (ECO)	
OMc	Control	13.3 d	6.7 d'	10.0 ef''	23.3 de	0.0 c'	
	IAA	83.3 a	53.3 a'	73.3 ab''	90.0 ab	0.0 c'	
	IBA	100.0 a	56.7 a'	70.0 ab''	83.3 ab	13.3 a'	
	NAA	50.0 b	30.0 b'	30.0 de''	60.0 c	6.7 abc'	
	2,4-D	26.7 cd	6.7 d'	86.7 a''	100.0 a	0.0 c'	
MS	Control	10.0 d	6.7 d'	6.7 f''	20.0 e	0.0 c'	
	IAA	60.0 b	20.0 bcd'	56.7 bc''	73.3 bc	3.3 bc'	
	IBA	93.3 a	26.7 bc'	43.3 cd''	63.3 c	10.0 ab'	
	NAA	46.7 bc	13.3 cd'	16.7 ef''	40.0 d	6.7 abc'	
	2,4-D	43.3 bc	10.0 d'	76.7 ab''	100.0 a	0.0 c'	

*Results are presented as the percentage to the total introduced explants. The different small letters of the same format within columns indicate the homogeneous groups of a significant difference at level of 5 %

obtained and vary between 7 and 13 % in the cultivars 'Picholine Marocaine', 'Dahbia' and 'Arbequina' (Mazri et al., 2012) while Cerezo et al. (2011) and Pires et al. (2020) reported 25 and 17 % of embryogenesis respectively in 'Picual' and 'Galega Vulgar'. Our results agree these observations since IBA combined with zeatin allowed the best rates of embryogenesis with 13.3 and 10 % respectively on OMc and MS (Figure 1D) while nearly 7 % of the calli obtained in the presence of NAA on both media and 3.3 % with IAA on MS were embryogenic (Table 1). In addition, the obtained embryogenic calli present a nodular and friable texture with white-yellowish globules of different sizes easy to separate allowing good proliferation during subculturing, whereas, some calli lines with strongly joined nodules often show marked browning and very slow proliferation capacity as well as few embryogenic structures. However, calli induced with 2,4-D were necrotic without any cell proliferation or subsequent embryogenic expression while apical browning followed by a total necrosis was observed in the radicles of the control media.

3.2 PROLIFERATION OF THE EMBRYOGENIC CULTURES

The obtained results indicated that proliferation capacity of olive embryogenic callus varied significantly among the genotype (cell lines) and according to the culture conditions, particularly the chemical composition of the maintenance medium and the followed method of culture, but much more by the added growth regulators.

3.2.1 Effect of the type and chemical composition of the proliferation medium

Regardless to the callus line and chemical compo-

sition of the medium; suspension culture allowed a significantly greater mass increase (Figure 1F) than solid medium (Figure 1E). Cell proliferation of the lines C1 and C3 was better on ECO liquid medium with 0.3 and 0.26 g of mass increase respectively while the OM chemical composition was more beneficial for the line C2 with nearly 0.2 to 0.3 g of mass increase respectively on solid and liquid media (Table 2). The low increases in mass of C1 and C3 calli with 0.2 and 0.08 g respectively were recorded on solid MS medium while proliferation of C2 seems to be less influenced by the chemical composition of the solid medium allowing between 0.16 and 0.18 g of mass increase (Table 2). Moreover, the best cell proliferation obtained on ECO medium was accompanied by good embryogenic expression and low necrosis of the cell masses (Figure 1E and F) whereas the other media particularly MS in addition to the low mass increase induced a marked browning and formation of compact calli weakly friable with large nodules.

The continued proliferation of embryogenic cultures is determined by several factors related to the nutrient and hormonal composition of the medium but highly by the genotype in culture (Merkle et al., 1995). As in our case, Cerezo et al. (2011) reported a pronounced browning in calli of olive cultivar 'Picual' on OMc with growth regulators whereas ECO liquid medium allowed a better production of less necrotic tissues, friable and nodular masses which contain several globular embryos despite the absence of a significant difference in the mass increase. Furthermore, ECO medium was more beneficial than MS for proliferation of calli induced from leaves and petioles of cultivar 'Dahbia' (Mazri et al., 2013). This beneficial effect of ECO medium may be due to its low content of macroelements, mainly nitrogen, which induces situation of stress favoring the proliferation of embryogenic structures (Cerezo et al., 2011). In addition, the improved result with suspension culture is the result of good cellular organization and synchronization

Table 2: Effect of the type (solid or liquid) and chemical composition (ECO, OM or MS) of the proliferation medium on the mass increase (in gram) of three lines (C1, C2 and C3) of embryogenic olive callus, 'Chemlal' after four weeks of culture*

Type of culture	Solid medium			Liquid medium		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
ECO	0.29 ± 0.03 a	0.16 ± 0.02 b	0.14 ± 0.03 bc	0.29 ± 0.02 ab	0.20 ± 0.03 d	0.26 ± 0.01 abc
OM	0.28 ± 0.04 a	0.18 ± 0.01 b	0.09 ± 0.01 cd	0.22 ± 0.02 cd	0.30 ± 0.02 a	0.13 ± 0.02 e
MS	0.20 ± 0.03 b	0.18 ± 0.00 b	0.08 ± 0.01 d	0.20 ± 0.01 d	0.25 ± 0.03 bcd	0.11 ± 0.01 e

*Results are presented as mean ± standard deviation. The different small letters of the same format within columns indicate the homogeneous groups of a significant difference at level of 5 %. Liquid culture kept under 100 rpm of stirring

(Von Arnold, 2008) as well as a better oxygenation and availability of nutrients provided by continuous agitation (Neumann et al., 2009).

3.2.2 Effect of the growth regulators' combination

The calli of the three lines remained in proliferation even on the control media, although the presence of growth regulators and their combinations were essential for the proliferation of olive embryogenic calli, especially in suspension culture which allowed better proliferation compared to solid medium. According to Sánchez-Romero (2019) the embryogenic olive callus can proliferate even in the absence of growth regulators although these are important for the development of somatic embryos (Trabelsi et al., 2011). Indeed, our best results of mass increase were obtained in the presence of IBA and zeatin with formation of embryogenic masses less browned regardless to the followed type of culture for the line C1 producing more than 0.29 g of mass and line C3 on liquid medium with 0.26 g (Table 3). In concordance with previous studies; the combination of IBA, BA and 2iP instead of zeatin has been widely used for callus proliferation of several olive cultivars such as 'Picual' (Cerezo et al., 2011), 'Picholine Marocaine', 'Dahbia' and 'Arbequina' (Mazri et al., 2012) and 'Galega Vulgar' (Pires et al., 2020). However, Hegazi et al. (2017) observed that TDZ was more efficient when combined with IBA than with NAA to maintain calli obtained from radicles and cotyledons of the cultivar 'Coratina'. These authors suggested the existence of a relationship between the used

auxin and cytokinin, which may be related to the endogenous hormonal balance of the explants directly varying with genotype (Mazri et al., 2012). Our results agree with this suggestion since that TDZ was more efficient when combined with IBA for the proliferation of lines C1 and C2 independently the culture method except for the C3 line for which TDZ combined with NAA allowed a better mass increase particularly in liquid culture with 0.23 g (Table 3). Furthermore, the cell proliferation of C2 and C3 was significantly reduced in presence of NAA combined with zeatin especially on solid medium with 0.04 and 0.06 g of mass increase respectively (Table 3) in addition of a marked browning preventing the appearance of embryogenic structures.

3.3 PRODUCTION AND MATURATION OF SOMATIC EMBRYOS

After one month in ECO liquid medium, the average number of recovered embryos and their degree of differentiation varied from one line of callus to another. Indeed, despite the low proliferation recorded in the lines C2 and C3 (Table 2 and 3); these lines produced more embryos (72.3 and 56 embryos/gfm) sufficiently differentiated (torpedo and cotyledonary) compared to C1 producing 33.3 embryos/gfm generally in the primary stages of differentiation (globular or cordiform) (Table 4). Subsequently, maturation of embryos varied significantly between the studied lines. About 15 % of the C1 pro-embryos turned necrotic more than the two other lines presenting 7.4 % of browning although no signifi-

Table 3: Effect of the growth regulators' combination (IBA or NAA combined with Zea or TDZ in addition to BA) added to the solid and liquid ECO proliferation medium on the mass increase (in gram) of three lines (C1, C2 and C3) of embryogenic olive callus, 'Chemlal' after four weeks of culture*

Type of culture Growth regulators' combination	Solid medium			Liquid medium		
	C1	C2	C3	C1	C2	C3
Control	0.04 ± 0.00 g	0.02 ± 0.00 g	0.02 ± 0.00 g	0.03 ± 0.00 jk	0.04 ± 0.01 ijk	0.02 ± 0.00 k
IBA-Zea	0.29 ± 0.03 a	0.16 ± 0.02 bc	0.14 ± 0.03 bcde	0.29 ± 0.02 a	0.20 ± 0.03 cde	0.26 ± 0.01 ab
IBA-TDZ	0.15 ± 0.03 bcd	0.11 ± 0.02 cdef	0.07 ± 0.01 efg	0.17 ± 0.03 def	0.21 ± 0.03 bcd	0.15 ± 0.01 efg
NAA-Zea	0.21 ± 0.04 b	0.04 ± 0.01 fg	0.06 ± 0.00 fg	0.1 ± 0.01 ghi	0.14 ± 0.02 fg	0.13 ± 0.01 fgh
NAA-TDZ	0.14 ± 0.02 bcde	0.08 ± 0.01 defg	0.17 ± 0.0 bc	0.16 ± 0.02 def	0.06 ± 0.02 hij	0.23 ± 0.02 bc

*Results are presented as mean ± standard deviation. The different small letters of the same format within columns indicate the homogeneous groups of a significant difference at level of 5 %. Liquid culture kept under 100 rpm of stirring

Table 4: Average number of immature somatic embryos (SE) produced per gram of fresh material (gfm) from three lines (C1, C2 and C3) of olive embryogenic callus, 'Chemlal' after four weeks in liquid culture with stirring and maturation after eight weeks on ECO basal solid medium with activated charcoal*

Embryogenic callus lines	Average number of SE produced /gfm	Maturation			Average number of recovered matures SE
		Necrosis (%)	Proliferation (%)	Differentiation (%)	
C1	33.3 ± 5.8 c	14.8 a'	74.1 a''	11.1 b	1.0 ± 0.0 c'
C2	72.3 ± 6.0 a	7.4 a'	44.4 b''	48.1 a	1.3 ± 0.2 b'
C3	56.0 ± 4.6 b	7.4 a'	48.1 b''	44.4 a	2.6 ± 0.4 a'

*Results are presented as mean ± standard deviation. The different small letters of the same format within columns indicate the homogeneous groups of a significant difference at level of 5 %

cant difference has been revealed statistically. Consequently, more than 74.1 % of the C1 embryos proliferated but only 11.1 % of explants differentiated few mature embryos while C2 and C3 explants presenting more differentiation with 48.1 and 44.4 % respectively produced 1.3 and 2.6 mature embryos recovered after eight weeks of incubation (Figure 1G; Table 4).

According to Rugini et al. (2005) olive pro-embryos on the maturation medium may show marked necrosis, amorphous cell proliferation or differentiate to advanced stages of development. Our results are close to those of Cerezo et al. (2011) and Narváez et al. (2019) indicating maturation rates varying from 49 to 59 % in pro-embryos of cultivar 'Picual' and wild olive respectively with an average of 1.7 to 2.2 mature produced embryos whereas about 6 % of embryos turned necrotic. Similarly, Bradai et al. (2016) obtained about 5 mature embryos from young lines of 'Picual' callus.

3.4 GERMINATION OF SOMATIC EMBRYOS AND PLANTS REGENERATION

Germination of olive somatic embryos as well as the development of the resulted plantlets depend directly on the genotype (callus line). Under photoperiod, white-opaque embryos turn greenish with swelling and spreading of the two cotyledons in addition to the elongation of their roots, which turned yellow just before the emergence of a small shoot (Figure 1H). The same observations have been reported by Toufik et al. (2017) on embryos of the cultivar 'Dahbia' resulting in roots emergence and germination after two weeks under photoperiod conditions. In our study, embryos of C2 germinated with root emergence from the second week of introduction whereas no germination or rooting had been

observed before two weeks with embryos of C3 (Data not shown). Rugini (1988) indicated that germination of olive somatic embryos is faster on OM medium. However, low germination rates have been often obtained with numerous cultivars where less than 13 % of germination obtained for 'Picual' (Cerezo et al., 2011) while Mazri et al. (2020) indicated that germination of 'Dahbia' somatic embryos was only achieved in the presence of growth regulators. This low conversion is mainly due to deficiencies in embryogenic maturation and development (Merkle et al., 1995). In our case, using cotyledonary somatic embryos after a maturation step, germination rates of 50 and 31.3 % respectively for C2 and C3 were obtained on OM basal medium. Consequently, C2 embryos resulted in well-developed plants (1.6 cm) with multiple leaves while small plants were obtained from C3 embryos (Data not shown). Finally, well-developed plantlets have been easily acclimatized and exhibited normal growth and phenotype *in vivo* even after transfer to field conditions (Figure 1I).

4 CONCLUSIONS

To our knowledge, our study describes for the first time an efficient regeneration of whole plants without morphological abnormalities in the main olive cultivar in Algeria 'Chemlal' via somatic embryogenesis induced from juvenile material, radicles of zygotic embryos. More embryogenic calli were induced on OMc medium containing IBA and zeatin, while the maintenance of cell lines on ECO medium particularly in liquid culture, allows better cell proliferation and production of embryos easily convertible into whole plantlets. The optimized approach will allow the application of biotechnological improvement methods particularly genetic transformation



Figure 1: Plant regeneration via somatic embryogenesis induced from radicles of olive zygotic embryos, cv. 'Chemlal'. A and B. Aspect of radicles after 1 and 3 weeks on OMc solid medium containing IBA and zeatin. C. Appearance of nodules after 4 weeks on OMc without zeatin and reduced concentration of IBA. D, E and F. Somatic embryos (SE) appearance and callus proliferation after 4 weeks on solid or liquid ECO medium with IBA, zeatin and BA. G. Maturation of SE after 8 weeks on ECO solid basal medium with activated charcoal. H and I. Germination of SE on OM solid basal medium and acclimatized plantlets. (Bars correspond to 1 cm except for A, C and D the bar corresponds to 0.1 cm)

and induction of somaclonal variation as alternatives for varietal creation and improvement in olive tree against various stresses.

5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge funding support from the National Higher School of Agronomy (ENSA) and the Algerian Ministry of High Education and Scientific Research (MESRS).

6 REFERENCES

Boukhari, R., Ameer Ameer, A., Innal, H., Gaouar, S.B.S. (2020). First morphological characterization of autochthonous olive (*Olea europaea* L.) denominations from central

and eastern of Algeria. *Acta Agriculturae Slovenica*, 116(2), 311-325. <https://doi.org/10.14720/aas.2020.116.2.1923>

Boutkhil, S., Benine, M.L., Benzouai, M.Y., Diaf, M., Kaldi, A., Chama, Z., Tifrit, A., Abbouni, B. (2016). Isolation and characterization of *Verticillium* wilt of olive trees in Algeria. *International Journal of Microbiological Research*, 7(3), 93-101. <https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2016.93.101>

Bradaï, F., Pliego-Alfaro, F., Sánchez-Romero, C. (2016). Long-term somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.): Influence on regeneration capability and quality of regenerated plants. *Scientia Horticulturae*, 199, 23-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.010>

Cañas, L.A., Benbadis, A. (1988). *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plant Science*, 54, 65-74. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(88\)90056-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(88)90056-8)

Cerezo, S., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. (2011). An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive.

- Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106, 337-344. <https://doi.org/10.1007/s11240-011-9926-6>
- Haddad, B., Gristina, A.S., Mercati, F., Saadi, A., Aiter, N., Martorana, A., Sharaf, A., Carimi, F. (2020). Molecular analysis of the official Algerian olive collection highlighted a hotspot of biodiversity in the central Mediterranean basin. *Genes*, 11(3), n°303, 17p. <https://doi.org/10.3390/genes11030303>
- Hegazi, E.S., Abd Allatif, A.M., Abd Elraof, O.A. (2017). Effect of growth regulators on callus induction and somatic embryogenesis in olive. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 8(4), 274-280. [https://www.rjpbcs.com/pdf/2017_8\(4\)/\[35\].pdf](https://www.rjpbcs.com/pdf/2017_8(4)/[35].pdf)
- Maalej, M., Drira, N., Chaari-Rkhis, A., Trigui, A. (2002). Preliminary results of somatic embryogenesis from young zygotic embryos of olive tree. *Acta Horticulturae*, 586, 899-902. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.586.196>
- Mazri, M.A., Naciri, R., Belkoura, I. (2020). Maturation and conversion of somatic embryos derived from seeds of olive (*Olea europaea* L.) cv. Dahbia: Occurrence of secondary embryogenesis and adventitious bud formation. *Plants*, 9(11), n°1489, 14p. <https://doi.org/10.3390/plants9111489>
- Mazri, M.A., Belkoura, I., Pliego-Alfaro, F., Belkoura, M. (2013). Somatic embryogenesis from leaf and petiole explants of the Moroccan olive cultivar Dahbia. *Scientia Horticulturae*, 159, 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.002>
- Mazri, M.A., Belkoura, I., Pliego-Alfaro, F., Belkoura, M. (2012). Embryogenic capacity of embryo-derived explants from different olive cultivars. *Acta Horticulturae*, 929, 397-403. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2012.929.57>
- Merkle, S.A., Parrot, W.A., Flinn, B.S. (1995). Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe, T.A. (editor). *In vitro embryogenesis in plants: Current plant science and biotechnology in agriculture*. Vol. 20, Dordrecht, Holland, Springer, pp. 155-204. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0485-2_5
- Montes-Osuna, N., Mercado-Blanco, J. (2020). *Verticillium* wilt of olive and its control: What did we learn during the last decade? *Plants*, 9(6), n°735, 31p. <https://doi.org/10.3390/plants9060735>
- Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Narváez, I., Martín, C., Jiménez-Díaz, R.M., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. (2019). Plant regeneration via somatic embryogenesis in mature wild olive genotypes resistant to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Sciences*, 10(1471), 11p. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01471>
- Neumann, K.H., Kumar, A., Imani, J. (2009). *Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology basics and application*. Berlin, Germany, Springer, 333 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-93883-5>
- Pires, R., Cardoso, H., Ribeiro, A., Peixe, A., Cordeiro, A. (2020). Somatic embryogenesis from mature embryos of *Olea europaea* L. cv. 'Galega Vulgar' and long-term management of calli morphogenic capacity. *Plants*, 9(6), n°758, 15p. <https://doi.org/10.3390/plants9060758>
- Rugini, E. (1995). Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). In: Jain, S.M., Gupta, P.K., Newton, R.J. (editors). *Somatic embryogenesis in woody plants-Angiosperms*. Vol. 2, Dordrecht, Holland, Springer, pp. 171-189. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0491-3_11
- Rugini, E. (1988). Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14, 207-214. <https://doi.org/10.1007/BF00043411>
- Rugini, E. (1984). *In vitro* propagation of some olive cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Scientia Horticulturae*, 24, 123-134. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(84\)90143-2](https://doi.org/10.1016/0304-4238(84)90143-2)
- Rugini, E., Mencuccini, M., Biasi, R., Altamura, M.M. (2005). Olive (*Olea europaea* L.). In: Jain, S.M., Gupta, P.K. (editors). *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants*. Dordrecht, Holland, Springer, pp. 345-360. https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_27
- Rugini, E., Baldoni, L., Silvestri, C., Mariotti, R., Narváez, I., Cultrera, N., Cristofori, V., Bashir, M.A., Mousavi, S., Palomo-Rios, E., Mercado, J.A., Pliego-Alfaro, F. (2020). *Olea europaea* Olive. In: Litz, R.E., Pliego-Alfaro, F., Hormaza, J.I. (editors). *Biotechnology of fruit and nut crops*, 2nd Ed, London, UK, CABI International, pp. 343-376. <https://www.cabi.org/bookshop/book/9781780648279/>
- Sánchez-Romero, C. (2021). Somatic embryogenesis in olive. *Plants*, 10(3), 433: 6p. <https://doi.org/10.3390/plants10030433>
- Sánchez-Romero, C. (2019). Somatic embryogenesis in *Olea* spp. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 138, 403-426. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01652-0>
- Toufik, I., Belkoura, I., Guenoun, F. (2017). Improving germination conditions of somatic embryos derived from radicle explants of Moroccan olive cultivar Dahbia. *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 5(3), 51-56. <http://www.biosciencejournals.com/archives/2017/vol5/issue3/5-3-15>
- Trabelsi, E.B., Naija, S., Elloumi, N., Belfeleh, Z., Msllem, M., Ghezal, R., Bouzid, S. (2011). Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive (*Olea europaea* L.) 'Chetoui'. *Acta Physiologia Plantarum*, 33, 319-324. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0550-6>
- Von Arnold, S. (2008). Somatic embryogenesis. In: George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (editors). *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht, Holland, Springer, pp. 335-354. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5005-3_9

Khayreddine Titouh^{1,2}
Nazim Boufis¹
Khadidja Hadj Moussa²
Lakhdar Khelifi²

Proliferation conditions of olive (*Olea europaea* L.) embryogenic calli

Authors' addresses:

¹ National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA), Research Center of Baraki, Algiers, Algeria.

² National Higher School of Agronomy (ENSA), Laboratory of Genetic Resources and Biotechnologies (LRG-B), Algiers, Algeria.

Correspondence:

Khayreddine Titouh

National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA), Research Center of Baraki, Algiers, Algeria.

Tel: +213 667 11 56 25

e-mail: titouhkhayreddine@gmail.com

Article info:

Received: 26 January 2022

Accepted: 17 April 2022

ABSTRACT

Maintenance of the embryogenic calli in continuous proliferation for a long-time with good expression of their potential remains critical to the utility of the somatic embryogenesis process. The objective of this study is to evaluate the effect of some culture conditions on the cell proliferation of embryogenic calli induced from radicles of mature olive zygotic embryos. Our results showed that cell proliferation and embryogenic expression of olive callus were markedly enhanced by the availability of sucrose at concentrations of 20 to 40 g l⁻¹, especially in a liquid culture medium. Likewise, the addition of activated charcoal improved significantly the increase in callus weight but also the texture of the callus by promoting the maturation of pro-embryos as well as a clear reduction in the browning of cell masses. In addition, the culture duration promoted the growth of calli, although cultures exceeding six to eight weeks on solid medium or three to four weeks in suspension with stirring negatively affected the rate of proliferation due to browning.

Key words: Activated charcoal, embryogenic calli, olive, proliferation, subculture, sucrose

Introduction

The olive tree (*Olea europaea* L.) includes an important genetic diversity of which a large part is kept in living collections used in breeding programs (Rallo *et al.*, 2018). However, classical breeding methods became unable to achieve alone significant gains (Rugini *et al.*, 2016) due to the long juvenile period of the species (10 to 15 years), especially in the current context of climate change (Rugini *et al.*, 2020). Therefore, biotechnological methods such as genetic transformation and cryopreservation could be an alternative for the varietal creation and preservation of the species. However, these techniques require an efficient method of in vitro regeneration. Somatic embryogenesis provides the plant material suitable for the application of these techniques (Sánchez-Romero, 2019).

Somatic embryogenesis has been achieved in several olive cultivars using different types of explants. The best results have often been obtained from juvenile tissues, particularly radicles of zygotic embryos formed by undifferentiated cells with a very high morphogenetic potential (Sánchez-Romero, 2019). Indeed, embryogenic cultures are a set of cellular masses characterized by continuous mitotic activity allowing secondary somatic

embryogenesis that can be maintained by monthly subcultures on a new medium (Merkle *et al.*, 1995; Von Arnold, 2008; Rugini *et al.*, 2020). The maintenance of calli in proliferation is determined by several factors related to the genotype and the initial explant but also to the culture conditions; mainly the chemical and hormonal formulation of the culture medium, as well as duration and frequency of subcultures which can induce marked repercussions on the practical applicability of the whole process (Sánchez-Romero, 2019). Among the various media used during this phase; the ECO medium of cyclic olive embryogenesis developed by Pérez-Barranco *et al.* (2007) significantly improves the formation of mature embryos, and currently, it is widely used for the maintenance of olive embryogenic cultures (Bashir *et al.*, 2022).

Therefore, our work aims to evaluate the effect of the mode and duration of cultures as well as the addition of sucrose and activated charcoal (AC) on the cell proliferation of embryogenic calli induced from radicles of olive zygotic embryos, cv. Chemlal; in order to maintain for a long-term period the embryogenic calli, providing the plant material necessary to the application of some biotechnological techniques of genetic improvement, particularly genetic transformation and induction of somaclonal variation.

Materials and Methods

Establishment of embryogenic cultures

Embryogenic cultures were obtained from radicles of olive zygotic embryos of the cultivar 'Chemlal' according to a modified method of Cerezo *et al.* (2011). After disinfection of the seed extracted from stones of mature olives; the radicles were cultured in a solid OMc medium (Cañas & Benbadis, 1988) in the presence of 0.5 mg l⁻¹ of zeatin and 5 mg l⁻¹ of indole-3-butyric acid (IBA) for three weeks under obscurity. Subsequently, the explants were transferred to the same medium without zeatin and with a concentration of IBA reduced to 1/10th (0.5 mg l⁻¹) during the period of four weeks. After that, the calli were transferred to a basal solid ECO medium (Pérez-Barranco *et al.*, 2007) supplemented with 0.1 mg l⁻¹ of zeatin, 0.1 mg l⁻¹ of Benzylaminopurine (BAP), and 0.05 mg l⁻¹ of IBA in addition to 0.55 g l⁻¹ of glutamine and 1 g l⁻¹ of casein hydrolyzate. All the media contained 20 g l⁻¹ of sucrose and 50 mg l⁻¹ of Myo-Inositol. The pH was adjusted to 5.74 with NaOH or HCl (1 N) before adding 6 g l⁻¹ of agar. The cultures were incubated in total darkness at a temperature of 25±2°C.

Proliferation of embryogenic cultures

The capacity of proliferation was evaluated by the weight increase of three lines of embryogenic calli selected for their good friable and nodular structure suitable for this type of study. An embryogenic mass of 0.1 g was cultured on 25 ml of solid or liquid basal ECO medium. The effect of some factors (concentration of sucrose, the addition of activated charcoal, and culture duration) was studied. Therefore, the sucrose was added at a concentration of 0, 5, 10, 20, 30, or 40 g l⁻¹ to the ECO basal medium while the activated charcoal was added, in addition to the control (without AC), at a concentration of 0.5 or 1 g l⁻¹ to the medium containing 20 g l⁻¹ of sucrose. In these cases, the cultures were maintained for four weeks while the effect of culture duration was evaluated by culturing the calli for two to sixteen weeks on a solid medium or one to six weeks in a liquid medium with 100 rpm of stirring.

At least, three Petri dishes or three Erlenmeyer flasks of 100 ml were incubated in total darkness at 25±2°C. At the end of each incubation, the whole callus was collected, weighed and the increase in fresh weight, as well as the rate of proliferation (weight of cellular mass produced per week) in addition to morphological traits such as texture, the appearance of embryogenic structures of different development stages, friability, and necrosis of the callus, were determined, and a new inoculum was taken for the next subculture. The follow-up was carried out for at least three successive subcultures.

Statistical analysis

The experiments were carried out according to the total randomization design. All statistical analyzes of the data (Analysis of variance and tests) were performed using the "XLSTAT" program version 2016.02.27444. In the case of a significant effect, the separation of the means was carried out by Fisher's LSD (Least Significant Difference) test. In all analyzes, a significance level of 5% was considered. The obtained results were represented graphically using the Excel program of Microsoft Office 2007. The letters on the graphs indicate homogeneous groups.

Results

Effect of the medium additives

Our results indicated that the presence of sucrose as a carbon source in the medium is essential for the continued proliferation of the embryogenic olive callus. Indeed, the weight of the different lines increased proportionally with the concentration of sucrose, particularly in liquid culture (Figures 1 and 3). However, doses greater than 20 g l⁻¹ did not considerably improve proliferation, especially in solidified medium, despite the significant reduction of the cell necrosis and the accelerated differentiation of embryogenic structures (Figure 3). Consequently, the best results on solid medium were recorded in the presence of 40 g l⁻¹ of sucrose for C1 and C3 with 0.29 and 0.15 g respectively while 30 g l⁻¹ allowed more than 0.16 g of increase in the C2 line (Figure 1 A). Likewise, in liquid culture, the best weight increases of 0.33, 0.21, and 0.32 g respectively for the three lines were obtained in the presence of 40 g l⁻¹ of sucrose (Figure 1 B).

In addition, the inclusion of activated charcoal in the proliferation medium, especially in liquid culture, improved significantly the weight increase of the three calli lines but also their degree of friability and embryogenic differentiation with a significant reduction in the browning of the cell masses (Figure 3). In a solid medium, the best proliferation results were obtained in the presence of 0.5 g of AC for C1 and C2 with 0.34 and 0.25 g of increase respectively, while the addition of 1 g of CA was more beneficial for C3 with 0.19 g (Figure 2 A). Furthermore, a positive correlation was revealed between the weight increase and the concentration of AC added to the liquid medium allowing 0.35, 0.25, and 0.32 g of increase respectively for the three lines in the presence of 1 g of AC (Figure 2 B).

Effect of the culture duration

RESEARCH ARTICLE

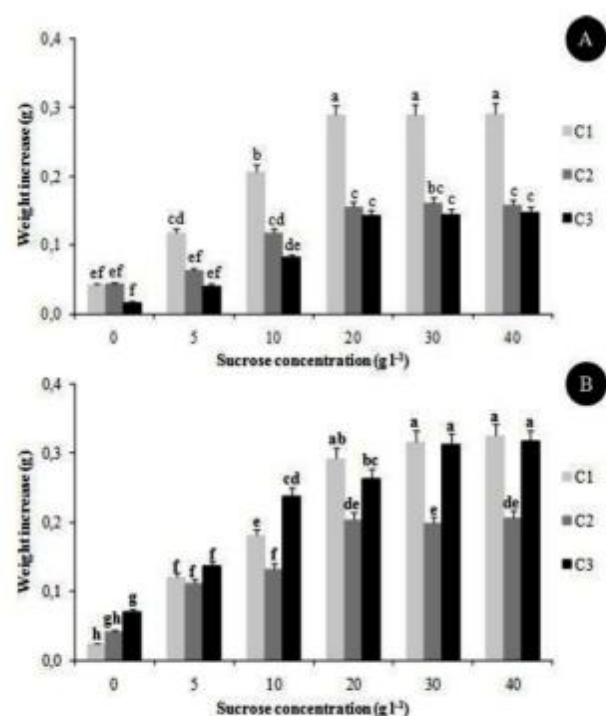


Figure 1. Effect of sucrose concentration in solid (A) and liquid (B) ECO proliferation medium on the weight increase of three lines of embryogenic olive calli, *cv. Chemlal*.

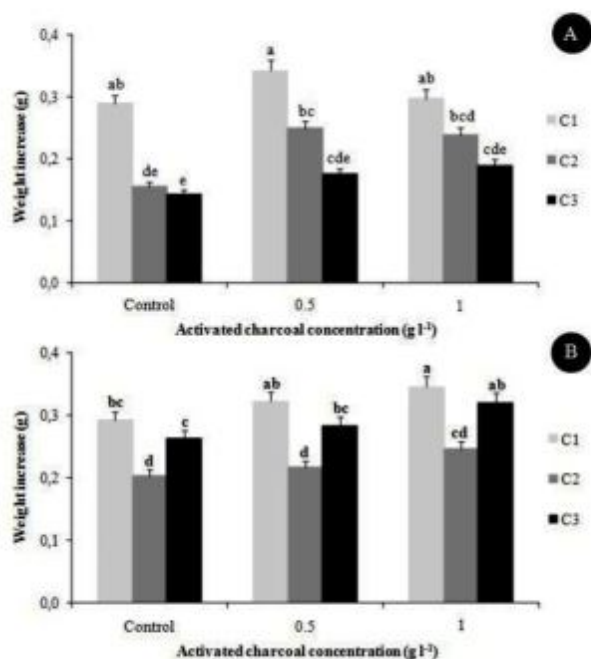


Figure 2. Effect of the activated charcoal in solid (A) and liquid (B) ECO proliferation medium on the weight increase of three lines of embryogenic olive calli, *cv. Chemlal*.

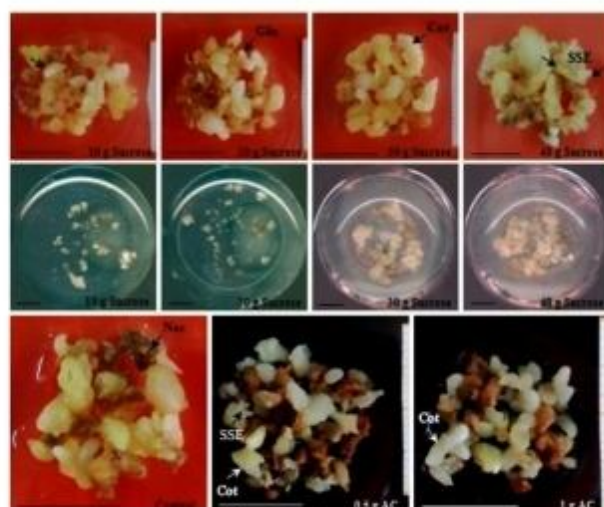


Figure 3. Effect of sucrose and activated charcoal added to solid and liquid ECO medium on the proliferation of embryogenic olive calli, *cv. Chemlal*. (→: arrows indicate embryogenic structures, Bars correspond to 1 cm). (Abbreviations: Cot: Somatic embryo at the cotyledonary stage, SSE: Secondary somatic embryogenesis, Glo: Globule, Nec: Necrosis).

The maintenance duration of callus in a culture strongly influences its proliferation. The weight increase was positively correlated with the incubation duration of cultures (Figure 4 A and B) although a period exceeding eight to ten weeks on solid medium and three to four weeks in suspension did not improve significantly the calli proliferation (Figure 4 A and B) but caused the browning of cell masses accompanied by a marked reduction in the rate of proliferation especially on liquid medium (Figure 4 C and D) in addition to the appearance of embryogenic structures more differentiated (cotyledonary stage) (Figure 5).

Conversely, the short culture incubations allowed the formation of several globules on less necrotic cell masses (Figure 5). Indeed, the best results of weight increase on solid medium were recorded after fourteen weeks of culture with 1.3, 1.1, and 0.47 g, respectively for the three lines (Figure 4 A) while 0.3, 0.2, and 0.29 g of increase were obtained from the fourth week in suspension (Figure 4 B). Nevertheless, the best proliferation rates were recorded with durations of six to eight weeks of culture on a solid medium with 0.11, 0.10, and 0.04 g/week, respectively for the three lines (Figure 4 C) and between the third and fourth week in liquid culture with 0.08, 0.05 and 0.07 g/week respectively for the lines (Figure 4 D).

Discussion

RESEARCH ARTICLE

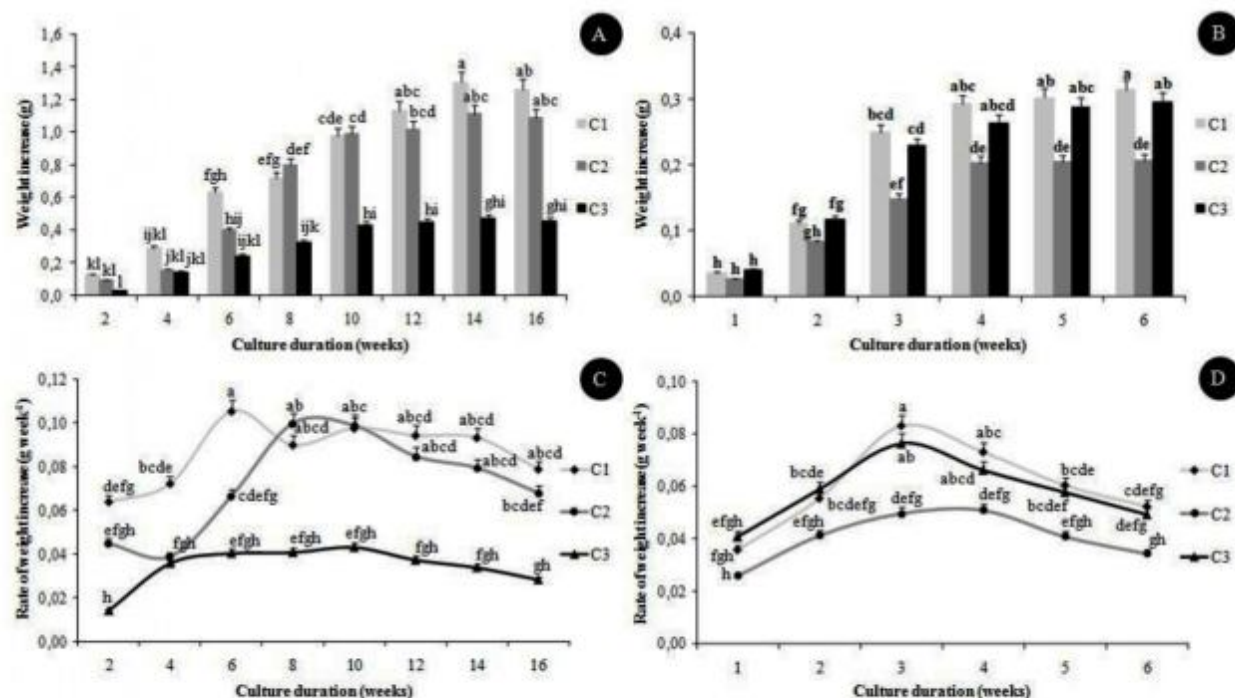


Figure 4. Effect of the incubation time of cultures in solid (A and C) and liquid (B and D) ECO proliferation medium on the increase in weight and proliferation rate of the three lines of olive embryogenic calli, cv. Chemlal.

Sucrose was often used during the whole process of somatic embryogenesis in olive trees (Brhadha *et al.*, 2008). According to Shibli *et al.* (2001), doubling the concentration of sucrose from 30 to 60 g l⁻¹ in the culture medium markedly improves the number of embryos produced by the calli of the cultivar 'Nabali', while a too high dose reduces the embryogenic expression. Furthermore, 30 to 40 g of sucrose allowed good proliferation and production of embryos from calli of the cultivar 'Chetoui' (Trabelsi *et al.*, 2003). These authors suggested that sucrose indirectly influences secondary embryogenesis through the induction of non-embryogenic cells. However, Brhadha *et al.* (2008) observed that sucrose concentration above 30 g l⁻¹ improves callogenesis but not embryogenic expression. Therefore, the optimal concentration of sucrose is directly related to the genotype and explant although the majority of studies indicated the addition of 20 to 30 g l⁻¹ of sucrose for the proliferation of calli induced from embryo radicles of several olive cultivars (Cerezo *et al.*, 2011; Mazri *et al.*, 2011 and 2012; Hegazi *et al.*, 2017; Toufik *et al.*, 2017; Pires *et al.*, 2020). Our results confirm these observations since the concentration of sucrose allowed a proportional increase of the calli weight, although a dose exceeding 20 or 30 g l⁻¹ did not improve significantly the cell proliferation but favored the appearance of more differentiated embryos with a

reduction of the necrosis degree particularly in suspension culture.

The addition of activated charcoal to the tissue culture medium improves the cell growth and development of several species (Thomas, 2008) mainly via the reduction of the explants browning by the adsorption of inhibitory substances

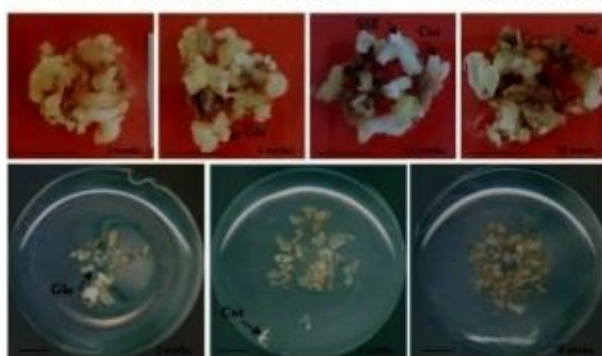


Figure 5. Effect of the culture duration in solid and liquid ECO medium on the proliferation of embryogenic olive callus, cv. Chemlal. (→: arrows indicate embryogenic structures, Bars correspond to 1 cm). (Abbreviations: Cot: Somatic embryo at the cotyledonary stage, SSE: Secondary somatic embryogenesis, Glo: Globule, Nec: Necrosis).

RESEARCH ARTICLE

such as the released phenolic compounds while improving their morphogenetic capacity (Merkle *et al.*, 1995). In olive trees, AC has often been used during embryo maturation to reduce the effects of residual auxins (Pérez-Barranco *et al.*, 2007), although its addition during callogenesis significantly improves the production of embryogenic calli (Maalej *et al.*, 2002) with a beneficial effect on the maintenance of their embryogenic capacity (Benelli *et al.*, 2001). Indeed, Pérez-Barranco *et al.* (2007) indicated that maintenance of calli induced from radicles of the cultivar 'Picual' on an ECO medium containing 1 g l^{-1} of AC causes a radical change in its mode of multiplication from cyclic cell proliferation with the formation of primary embryos (globules) to the production of more structured white-opaque embryos that may even germinate on the medium as a sign of strong secondary somatic embryogenesis (Rugini and Silvestri, 2016). Similarly, Benelli *et al.* (2001) found that embryogenic lines of the cultivar 'Canino' on OMc medium supplemented with 0.1% of AC were less browned and able to differentiate embryos at advanced stages of development (cotyledonary). Therefore, the effect of AC on the process seems to be qualitative rather than quantitative since Benzekri and Sánchez-Romero (2012) indicated that the spreading of embryogenic masses of the cultivar 'Picual' on ECO medium supplemented with AC did not affect the total number of embryos produced but significantly improved their germination thereafter. These observations corroborate our case where the incorporation of AC clearly improves the proliferation of the three lines, particularly in liquid culture, in addition to a marked reduction in the browning of cell masses as well as the appearance of white-opaque embryos at very advanced developmental stages (cotyledonary).

The establishment of a competent olive embryogenic culture requires a considerable amount of time, particularly its maintenance in continuous proliferation (Bradař *et al.*, 2016) which duration and frequency of subcultures were determined by the tissue characteristics and the culture conditions mainly the depletion of the medium and the accumulation of substances harmful to growth as ethylene (Bashir *et al.*, 2022). Shibli *et al.* (2001) recommended subculturing every three weeks for calli of the cultivar 'Nabali' on a solid medium supplemented with hormones to induce a proportional increase in weight followed by stability after nine weeks. Similarly, Pérez-Barranco *et al.* (2009), Cerezo *et al.* (2011) and Bradař *et al.* (2016) suggested four to six weeks of incubation for calli of the cultivar 'Picual' on a solid ECO medium to reduce the browning of cell masses and stabilize their proliferation and embryogenic expression. Recently, Pires *et al.* (2020) observed a significant increase in the number of embryos produced by the calli of the cultivar 'Galega Vulgar' with the duration of culture on a solid ECO medium although a strong reduction in the embryogenic

expression was noted after sixteen weeks. Our results agree perfectly with these observations since the calli of the three lines tested showed a proportional increase of their weight according to the duration of culture with stability from ten weeks of incubation despite the decrease in the rate of proliferation due to the marked browning.

Suspension cultures have several biotechnological applications. In olive trees, embryogenic cultures in a liquid medium were often used as a pre-treatment for the maturation of somatic embryos only for a few weeks (Sánchez-Romero, 2019) because they are subjected since the first days of incubation to phenolic oxidations inducing their rapid browning. However, cell growth restarts weakly from the second week, especially in the presence of hormones (Trabelsi *et al.*, 2011). Pérez-Barranco *et al.* (2007 and 2009) and Cerezo *et al.* (2011) indicated that embryogenic calli obtained from radicles of the cultivar 'Picual' tolerate well the culture in a liquid medium under stirring for three to four weeks permitting a higher increase (0.9 g) compared to culture on solid medium (0.5 to 0.6 g) with the formation of many globular embryos. This beneficial effect of the liquid medium is the result of better cellular organization and synchronization (Von Arnold, 2008; Sánchez-Romero, 2019) in addition to good oxygenation and availability of nutrients assured by continuous agitation (Neumann *et al.*, 2009). Our results confirm these observations since all the embryogenic lines tested proliferated better in a liquid culture although culture duration exceeding four weeks did not really improve the weight increase but caused a marked tissue browning with a significant decrease in the rate of proliferation.

In conclusion, our study showed that texture and proliferation of the embryogenic olive callus vary significantly with the culture conditions, particularly the presence of some additives within the medium as well as the incubation period between the successive subcultures. Consequently, frequent monthly subcultures on a solid medium rich in sucrose alternated with passages in suspension in the presence of activated charcoal allow better maintenance of the calli embryogenic potential.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge funding support from the National Higher School of Agronomy (ENSA) and the Algerian Ministry of High Education and Scientific Research (MESRS).

References

- Bashir MA, Silvestri C, Salmonti A, Rugini E, Cristofori V, Zelasco S. 2022. Can ethylene inhibitors enhance the success of olive somatic embryogenesis? *Plants*, 11(168): 10.

RESEARCH ARTICLE

- Benelli C, Fabri A, Grassi S, Lambardi M, Rugini E. 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissue of olive (*Olea europaea* L.). *J. Hort. Sci. Biotech.*, 76: 112-119.
- Benzekri H, Sánchez-Romero C. 2012. Maturation of olive somatic embryos. *Acta Hort.*, 961: 441-447.
- Bradaï F, Pliego-Alfaro F, Sánchez-Romero C. 2016. Long-term somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.): Influence on regeneration capability and quality of regenerated plants. *Sci. Hort.*, 199: 23-31.
- Brhadda N, Wakli LDM, Abousalim A. 2008. Effet du sucre sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv. 'Picholine Marocaine'. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 12(3): 245-250.
- Cañas LA, Benbadis A. 1988. *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). *Plant Science*, 54: 65-74.
- Cerezo S, Mercado JA, Pliego-Alfaro F. 2011. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 106: 337-344.
- Hegazi ES, Abd Allatif AM, Abd Elraof OA. 2017. Effect of growth regulators on callus induction and somatic embryogenesis in olive. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.*, 8(4): 274-280.
- Maalej M, Drira N, Chaari-Rkhis A, Trigui A. 2002. Preliminary results of somatic embryogenesis from young zygotic embryos of olive tree. *Acta Hort.*, 586: 899-902.
- Mazri MA, Belkoura I, Pliego-Alfaro F, Belkoura M. 2012. Embryogenic capacity of embryo-derived explants from different olive cultivars. *Acta Hort.*, 929: 397-403.
- Mazri MA, Elbakkali A, Belkoura M, Belkoura I. 2011. Embryogenic competence of calli and embryos regeneration from various explants of Dahbia cv, a Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.). *Afri. J. Biotechnol.*, 10(82): 19089-19095.
- Merkle SA, Parrot WA, Finn BS. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. – In: Thorpe TA. (eds), *In vitro Embryogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 155-204.
- Neumann KH, Kumar A, Imani J. 2009. *Plant cell and tissue culture – a tool in biotechnology Basics and application*. Springer, USA, 333 p.
- Pérez-Barranco G, Torreblanca R, Padilla IMG, Sánchez-Romero C, Pliego-Alfaro F, Mercado JA. 2009. Studies on genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos: I. Evaluation of different aminoglycoside antibiotics for *nptII* selection. II. Transient transformation via particle bombardment. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 97: 243-251.
- Pérez-Barranco G, Mercado JA, Pliego-Alfaro F, Sánchez-Romero C. 2007. Genetic transformation of olive somatic embryos through biolistic. *Acta Hort.*, 738: 473-477.
- Pires R, Cardoso H, Ribeiro A, Peixe A, Cordeiro A. 2020. Somatic embryogenesis from mature embryos of *Olea europaea* L. cv. 'Galega Vulgar' and long-term management of calli morphogenic capacity. *Plants*, 9(758): 15p.
- Rallo L, Barranco D, Díez CM, Rallo P, Suárez MP, Trapero C, Pliego-Alfaro F. 2018. Strategies for Olive (*Olea europaea* L.) breeding: cultivated genetic resources and crossbreeding. – In: Al-Khayri JM, Jain SM. & Johnson DV. (eds), *Advances in plant breeding strategies: Fruits*. Springer, Switzerland, p. 535-600.
- Rugini E, Silvestri C. 2016. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *sativa* and var. *sylvestris*). – In: Germanà MA. & Lambardi M. (eds), *In vitro embryogenesis in higher plants, Methods in molecular biology*. Vol. 1359, Springer, p. 341-348.
- Rugini E, Cristofori V, Silvestri C. 2016. Genetic improvement of olive (*Olea europaea* L.) by conventional and *in vitro* biotechnology methods. *Biotechnol. Adv.*, 34: 687-696.
- Rugini E, Baldoni L, Silvestri C, Mariotti R, Narváez I, Cultrera N, Cristofori V, Bashir MA, Mousavi S, Palomo-Ríos E, Mercado JA, Pliego-Alfaro F. 2020. *Olea europaea* Olive. – In: Liz RE, Pliego-Alfaro F. & Hormaza JI. (eds), *Biotechnology of fruit and nut crops*, 2nd ed., CABI International, p. 343-376.
- Sánchez-Romero C. 2019. Somatic embryogenesis in *Olea* spp. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 138: 403-426.
- Shibli RA, Shatnawi M, Abu-Ein Al-Juboory KH. 2001. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' Olive (*Olea europaea* L.). *Sci. Hort.*, 88: 243-256.
- Thomas TD. 2008. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol. Adv.*, 26: 618-631.
- Toufik I, Belkoura I, Guenoun F. 2017. Improving germination conditions of somatic embryos derived from radicle explants of Moroccan olive cultivar Dahbia. *European J. Biotechnol. Biosc.*, 5(3): 51-56.
- Trabelsi EB, Najja S, Eloumi N, Belfeleh Z, Msllem M, Ghezal R, Bouzid S. 2011. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive (*Olea europaea* L.) 'Chetoui'. *Acta Physiol. Plant.*, 33: 319-324.
- Trabelsi EB, Bouzid S, Bouzid M, Eloumi N, Belfeleh Z, Benabdallah A, Ghezal R. 2003. *In vitro* Regeneration of olive tree by somatic embryogenesis. *J. Plant Biol.*, 46(3): 173-180.
- Von Arnold S. 2008. Somatic embryogenesis. – In: George EF, Hall MA. & De Klerk GJ. (eds), *Plant propagation by tissue culture*. Vol. 1: The background. 3rd ed., Springer, Netherlands, p. 335-354.

Impact of cultural conditions on germination of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos and plantlets development from the Algerian cultivar Chemlal

K. Titouh ^{1,2(*)}, K. Hadj Moussa ², N. Boufis ¹, L. Khelifi ^{2(*)}

¹ National Institute of Agronomic Research of Algeria (INRAA), Research Center of Baraki, Algiers, Algeria.

² National Higher School of Agronomy (ENSA, ES1603), Laboratory of Genetic Resources and Biotechnologies (LRG-B), Algiers, Algeria.



Key words: Germination, micropropagation, olive, plant regeneration, somatic embryo.

***) Corresponding authors:**
titouhkheireddine@gmail.com
khelifi.lakhdar@gmail.com

Citation:
TITOUH K., HADJ MOUSSA K., BOUFIS N., KHELIFI L., 2022 - Impact of cultural conditions on germination of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos and plantlets development from the Algerian cultivar Chemlal. - Adv. Hort. Sci., 36(3): 185-191.

Copyright:
© 2022 Titouh K., Hadj Moussa K., Boufis N., Khelifi L. This is an open access, peer reviewed article published by Firenze University Press (<http://www.fupress.net/index.php/ahs/>) and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement:
All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Competing Interests:
The authors declare no competing interests.

Received for publication 28 December 2021
Accepted for publication 13 June 2022

Abstract: The *in vitro* propagation techniques are currently a commercial alternative for the production of plants with good quality in several plant species, including the olive tree (*Olea europaea* L.). Somatic embryogenesis is the process practically used for the application of several biotechnological tools of improvement and *in vitro* plant regeneration via the germination of somatic embryos. Our work aims to evaluate the effect of the chemical and hormonal composition of the culture medium on the germination of olive somatic embryos (cv. Chemlal) as well as the micropropagation of the obtained plantlets before their acclimatization to natural conditions. The results indicated that the production of olive plants by somatic embryogenesis depends strongly on the genotype of the somatic embryos (cell line) and more on the culture conditions, particularly the presence of growth regulators. Indeed, a solid OM medium supplemented with hormones (BA and IBA) permitted an advanced root emergence and germination allowing the production of well-developed plants with several leaves. In addition, an OM medium supplemented with Zeatin and IBA allowed better reactivity of micro-cuttings producing well-developed shoots with several emitted roots which facilitates their further acclimatization to natural conditions.

1. Introduction

The olive tree (*Olea europaea* L.) a diploid dicotyledonous species of the *Oleaceae* family, includes several cultivars selected and multiplied initially by farmers mainly for the size of their fruits and the oil content (Besnard *et al.*, 2018). Conventional methods of breeding and multiplication represent an important solution to the crop problems, especially the increasing demand for plants needed for new orchards. However, these

techniques have become unable to achieve significant results because of the long juvenile period of the species (Rugini *et al.*, 2020) as well as the recalcitrance of certain main cultivars, such as 'Chemlal' in Algeria, to semi-hardwood cuttings (Fabbri *et al.*, 2004). In this context, *in vitro* propagation techniques are currently a commercial reality for the multiplication of several olive cultivars (Rugini *et al.*, 2020) due to the sanitary quality and the confirmed genetic stability of the regenerated plants (Lopes *et al.*, 2009) despite some phenotypic changes and somaclonal variations observed after several subcultures (Leva, 2009; Bradai *et al.*, 2016, 2019).

Somatic embryogenesis is a morphogenetic process through which somatic cells produce a bipolar structure morphologically similar to the zygotic embryo called a 'somatic embryo' able to develop into a whole plant (Neumann *et al.*, 2009). Actually, this process has become a common technique for *in vitro* regeneration allowing the application of several biotechnological tools of improvement and conservation such as genetic transformation, *in vitro* selection and cryo-preservation of various species and interesting genotypes (Sánchez-Romero, 2021). Most of the established works on somatic embryogenesis in olive consider three main steps starting with the establishment of embryogenic cultures combining the induction and proliferation of calli, followed by a phase of expression and development of structured embryos ready to be converted into whole plants. However, few works have been done about the germination conditions of olive somatic embryos (Mazri *et al.*, 2020) although regeneration of plantlets has frequently been achieved by introducing the embryos under photoperiod on a standard culture medium based on the chemical compositions 'MS' (Murashige and Skoog, 1962) or 'OM' (Rugini, 1984). In addition, the low conversion rates remain the great obstacle of the process in many species, including in olive tree, are caused mainly by deficiencies in the development and maturation of the used embryos (Merkle *et al.*, 1995; Sánchez-Romero, 2019) but also by unfavorable conditions to their germination (Bradai *et al.*, 2016).

The objective of our study is to evaluate the effect of the chemical and hormonal composition of the culture medium on the germination of somatic embryos of the main Algerian olive cultivar 'Chemlal'. In addition, the micropropagation of the obtained plantlets as well as their acclimatization to natural conditions

were tested.

2. Materials and Methods

Establishment of the embryogenic cultures

The embryogenic cultures used were induced from radicles of zygotic embryos of the cultivar 'Chemlal' according to a modified method of Cerezo *et al.* (2011). Radicles isolated after disinfection of the seeds extracted from the stones of mature olives were cultured on solid OMc medium (Cañas and Benbadis, 1988) supplemented with 0.5 mg l⁻¹ of Zeatin and 5 mg l⁻¹ of indole-3-butyric acid (IBA) for three weeks. Subsequently, the explants were transferred to the same OMc medium without Zeatin and containing 0.5 mg l⁻¹ of IBA for four weeks. Finally, the obtained calli were maintained by monthly subcultures on a solid ECO basal medium (Cerezo *et al.*, 2011) supplemented with 0.1 mg l⁻¹ of Zeatin, 0.1 mg l⁻¹ of Benzylaminopurine (BA) and 0.05 mg l⁻¹ IBA in addition to 0.55 g l⁻¹ of glutamine and 1 g l⁻¹ of casein hydrolyzate. All the media were supplemented with 20 g l⁻¹ of sucrose, 50 mg l⁻¹ of Myo-Inositol and solidified with 6 g l⁻¹ of agar after adjusting the pH to 5.74 with NaOH or HCl (1 N). The cultures were incubated in total darkness at a temperature of 25±2°C.

Pro-embryos exceeding 2 mm in size were isolated from calli of two embryogenic lines (C2 and C3) after one month of culture in suspension on a liquid ECO medium supplemented with hormones in darkness with stirring at 100 rpm. These immature embryos were transferred for maturation on solid ECO free-hormones medium and supplemented with 1 g l⁻¹ of activated charcoal for two months in total darkness at 25±2°C.

Germination of somatic embryos

Mature embryos with a perfectly bipolar or cotyledonary structure, were germinated individually in test tubes over two different media: OM (Rugini, 1984) and MS (Murashige and Skoog, 1962) solidified with 6 g l⁻¹ of agar. In addition, the effect of a hormonal combination consisting of 1 mg l⁻¹ BA and 0.1 mg l⁻¹ IBA was tested. The two media were supplemented with 20 g l⁻¹ of sucrose, 100 mg l⁻¹ of Myo-Inositol. At least 16 mature somatic embryos were incubated for more than eight weeks under a 16 h light photoperiod (35 μmol m⁻² s⁻¹) at a temperature of 25±2°C. Germination, root emergence, shoot

length as well as the number of leaves per obtained plantlet after eight weeks of culture were observed.

Micropropagation of shoots and acclimatization of regenerated plantlets

In order to maintain the maximum number of plants in culture; micropropagation of the shoots resulting from the germination of somatic embryos was applied. Therefore, the shoots were divided into uni-nodal micro-cuttings and cultured on two different culture media: OM and DKW (Driver and Kuniyuki, 1984) as modified by Revilla *et al.* (1996). The two culture media were supplemented with 20 g l⁻¹ of sucrose, 100 mg l⁻¹ of Myo-Inositol in addition to hormonal balances composed of 2 mg l⁻¹ of BA or Zeatin combined with 0.1 mg l⁻¹ of IBA. The different media were solidified with 6 g l⁻¹ of agar. At least 16 micro-cuttings having two leaves were cultured individually in test tubes containing 15 ml of the micropropagation medium for eight weeks under a 16 h light photoperiod at a temperature of 25±2°C. The reactivity of the micro-cuttings and the number of reactive buds, shoot length, number of leaves as well as the number of roots emitted were observed.

The obtained plants showing an acceptable length with several leaves and well-developed roots were acclimatized in the laboratory under a photoperiod for about two months on a humidified mixture of sand/potting soil/perlite at a rate of 2/2/1 (v/v/v). Subsequently, the reactive plantlets were transferred to natural conditions under greenhouse on a substrate rich in organic matter and frequently irrigated before being permanently planted in the field.

Data analysis

Statistical analyses of the data (Analysis of variance and tests) were carried out using the "XLSTAT" program version 2016.02.27444. In case of a significant difference, the separation of means was performed by Fisher's LSD (Least Significant Difference) test. The percentages were analyzed by the chi-square test. The results were presented as a mean ± standard deviation or as a percentage relative to the total of introduced explants. A significance level of 5% was considered in all analyses. The letters in the tables indicate homogeneous groups.

3. Results

Germination of somatic embryos

From the first days under photoperiod, the white-

opaque somatic embryos of olive showed greening of their stem part and yellowing of the root part (Fig. 1 A) followed by its elongation preceding an increase in size of the two cotyledonary leaves and their separation each one from the other (Fig. 1 B) before the emergence of a small shoot (Fig. 1 C). Indeed, the germination capacity of embryos and the plants development varied from one cell line to another and were significantly influenced by the culture conditions, particularly the presence of growth regulators (Table 1). Thus, more embryos of the C2 line germinated on OM medium while the germination of the two lines was similar on the MS medium. However, the presence of hormones allowed a significant improvement in the embryos germination of both lines. In fact, the best germination rates were obtained on OM medium supplemented with BA and IBA (OM₁) with 56.3 and 37.5% respectively for C2 and C3 while the low germination rate of 25% was recorded on MS without hormones (MS₀) (Table 1).

In addition, embryos of C2 germinated with root emergence from the first week of culture (Fig. 1 A) while no reactivity was observed before two weeks for C3 embryos. Likewise, the germination and the root emergence were faster on the OM medium than



Fig. 1 - Germination of mature somatic embryos from two lines of embryogenic olive callus, cv. Chemlal, and micropropagation of the obtained shoots after 8 weeks of culture on different culture media. (A) Somatic embryo germinated on solid medium. (B) Swelling of cotyledonary leaves of embryos. (C) Different stages of embryos germination. (D and E) Plantlets obtained after germination. (F and G) Plantlets obtained after the micropropagation of shoots obtained from germination of somatic embryos. (H) Acclimated plantlets. (→: the arrows indicate the emergence of the root, shoot and the two cotyledonary leaves. Bar corresponds to 1 cm. Cot: Cotyledons).

Table 1 - Effect of the chemical composition (OM and MS) of the culture medium and the presence of hormones (without hormones '0' or with hormones '1') on germination and root emergence of somatic embryos of two lines of embryogenic olive calli, cv. Chemlal, after eight weeks of culture

Germination medium	Germination rate (%)		Average time of germination (Days)		Average time of root emergence (Days)		Average length of plantlet (cm)		Average number of leaves/plantlet	
	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3
OM ₀	50.0 b	31.3 d	16.8±3.8 b'	21.0±0.0 de'	12.3±3.5 a''	17.5±4.9 cd''	1.6±0.1 b	0.6±0.1 d	6.0±1.6 a'	2.0±0.0 c'
OM ₁	56.3 a	37.5 c	14.0±4.4 a'	18.7±4.0 bc'	10.5±4.0 a''	15.4±3.1 b''	2.3±0.8 a	0.9±0.2 c	6.3±1.6 a'	2.3±0.6 c'
MS ₀	25.0 e	25.0 e	24.5±4.9 f'	21.7±1.2 e'	21.0±0.0 e''	18.7±4.0 d''	0.8±0.1 cd	0.8±0.1 cd	2.5±0.7 c'	2.0±0.0 c'
MS ₁	31.3 d	31.3 d	21.0±0.0 de'	19.3±4.7 cd'	17.5±0.7 cd''	16.3±4.0 bc''	0.9±0.1 c	1.9±0.1 b	2.5±0.7 c'	4.5±0.7 b'

The different small letters of the same format in columns indicate the homogeneous groups of a significant difference at level of 5%.

on MS, especially in the presence of growth regulators which accelerated significantly germination of embryos. Therefore, the embryos emitted their roots after 10.5 and 15.4 days and germinated after 14 and 18.7 days on the OM₁ medium respectively for C2 and C3 (Table 1). Consequently, early germination and rooting of C2 embryos resulted in well-developed plants with an average length of 1.6 and 2.3 cm with 6 and 6.3 leaves per plantlet respectively on OM₀ and OM₁ (Table 1, Fig. 1 D) while the MS₁ medium was more beneficial for the C3 plants reaching 1.9 cm in length with 4.5 leaves (Table 1, Fig. 1 E).

Micropropagation of shoots and acclimatization of regenerated plantlets

Reactivity of micro-cuttings and shoot development. The micropropagation of shoots resulting from the germination of somatic embryos was significantly influenced by the callus line as well as the chemical and hormonal composition of the culture medium

(Table 2). In fact, micro-cuttings of the C2 line were more reactive than those of C3 regardless of the culture conditions, although the presence of hormones was essential for the development of the shoots given the low reactivity recorded on the control media. In addition, the best result of reactivity (100%) of the explants of both lines was obtained with the balance Zeatin/IBA and also the C2 cuttings on the combination BA/IBA in presence of which only 62.5 and 87.5% of the C3 cuttings reacted respectively on OM and DKW (Table 2). Elsewhere, the DKW medium in particular supplemented with hormones (Zeatin/IBA) accelerated the bud reaction and improved the number of reactive buds per explant while the cuttings introduced particularly on the free-hormones OM medium reacted late with less sprouted buds (Data not shown).

The development of the obtained shoots depended directly on the culture conditions and was significantly influenced by the reactivity degree of the cut-

Table 2 - Effect of the micropropagation medium (OM and DKW) and the presence of hormones (BA/IBA or Zeatin/IBA) on the reactivity, development and rooting of shoots from uni-nodal micro-cuttings obtained after germination of somatic embryos of two lines of embryogenic olive calli, cv. Chemlal, after eight weeks of culture

Composition of the micro-propagation medium	Hormonal combinations	Reactivity and shoot development						Rooting			
		Reactivity rate (%)		Average length of shoot (cm)		Average number of leaves/shoot		Rooting rate (%)		Average number of roots	
		C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3	C2	C3
OM	Control	25.0 d	12.5 d	0.7±0.3 g	0.9±0.0 fg	1.5±0.7 d'	2.0±0.0 cd'	0.0 e'	0.0 e'	0.0±0.0 f''	0.0±0.0 f''
	BA/IBA	100.0 a	62.5 c	2.0±0.7 de	1.9±0.2 de	2.9±1.0 cd'	3.1±0.9 cd'	31.3 d'	31.3 d'	1.0±0.0 e''	1.5±0.7 bc''
	Zeatin/IBA	100.0 a	100.0 a	3.7±1.0 b	5.2±2.1 a	6.9±3.2 b'	9.9±3.1 a'	62.5 a'	43.8 c'	1.5±0.0 bc''	1.7±0.6 b''
DKW	Control	18.8 d	12.5 d	0.5±0.0 g	0.7±0.0 g	2.0±0.0 cd'	2.0±0.0 cd'	0.0 e'	0.0 e'	0.0±0.0 f''	0.0±0.0 f''
	BA/IBA	100.0 a	87.5 b	1.7±0.3 ef	3.1±1.0 bc	3.4±1.1 c'	2.7±0.4 cd'	43.8 c'	31.3 d'	1.3±0.6 cd''	1.5±0.7 bc''
	Zeatin/IBA	100.0 a	100.0 a	2.7±0.2 cd	3.3±1.4 bc	6.6±1.1 b'	6.8±2.4 b'	56.3 a'	50.0 b'	1.3±0.5 d''	2.0±0.8 a''

The different small letters of the same format in columns indicate the homogeneous groups of a significant difference at level of 5%.

ting particularly the number of reactive buds. In cuttings with two active buds; one shoot regularly grown more than the other (Fig. 1 F and G). Moreover, the cuttings cultured on OM medium supplemented with hormones especially Zeatin/IBA and which sprouted early, produced well-developed shoots of 3.7 and 5.2 cm in length with 6.9 and 9.9 leaves respectively for C2 and C3 while the shoots obtained on the control media were the least developed, with less than 1 cm of length and a maximum of 2 leaves per plantlet (Table 2, Fig. 1 F and G).

Rooting of developed shoots. The presence of hormones in the culture medium was essential for the formation of a basal callus on the micro-cuttings before the emission of roots, while the chemical composition contributed more in the development of the induced calli due that the majority of calli generated on OM were generally larger compared to those obtained on DKW (Data not shown, Fig. 1 F and G).

Root emission was significantly influenced by the genotype (cell line) as well as chemical and hormonal composition of the propagation medium (Table 2). Indeed, more rooting was observed with micro-cuttings of the line C2 particularly on the OM medium supplemented with Zeatin/IBA allowing 62.5 and 43.8% rooting with 1.5 and 1.7 roots emitted by cutting respectively for the two lines while the chemical composition of DKW was more beneficial to C3 explants with 50% of rooting and an average of 2 roots per plantlet (Table 2). However, the appearance of roots occurring from the 3rd to the 7th week of culture was often faster on DKW compared to OM medium especially in the presence of BA with IBA. Furthermore, the substitution of BA by Zeatin in the added hormonal combination reduced the rooting time by more than a week in the cuttings of both lines, which improved the length of the emitted roots (Data not shown). Therefore, the plantlets showing well-developed shoots and roots were easily acclimatized in the laboratory and exhibit normal growth and phenotype even after transfer to natural field conditions (Fig. 1 H).

4. Discussion and Conclusions

Germination of somatic embryos

Germination of olive somatic embryos was frequently achieved on media based on the chemical formulations OM and MS with a reduced concentration of mineral salts, similar to those used for the cul-

ture of zygotic embryos (Sánchez-Romero, 2019). Rugini (1988) indicated that germination and development of olive plantlets from somatic embryos is faster on OM medium than on MS. Indeed, Rugini and Caricato (1995) observed the germination of embryos of cultivars 'Canino' and 'Moraiolo' after 1 to 2 weeks on OM free-hormones medium, whereas Shibli *et al.* (2001) didn't note reactivity in embryos of the cultivar 'Nabali' before two weeks of incubation on MS medium, which agree with our results indicating a faster germination on OM medium compared to MS one.

Several studies reported low rates of embryo germination varying with genotype but depending more on the quality of the used embryos. Therefore, Jafarzadeh-Bajestani *et al.* (2011) obtained less than 6% of germination on MS medium with embryos of the cultivar 'Zard' while a desiccation step for three days improved conversion to 50% and formation of rooted plantlets with 6 to 8 leaves. Furthermore, culturing embryos of the cultivar 'Picual' on a cellulose acetate semi-permeable membrane during the first month of maturation (Cerezo *et al.*, 2011) allowed an adequate dehydration, good structuring of the embryos and a significant improvement in germination and quality of the obtained plantlets. Therefore, the low germination capacity observed in this study was probably due to the use of embryos directly after their maturation without passing a desiccation phase allowing the synchronization of their germination (Merkle *et al.*, 1995).

Germination of olive somatic embryos was often achieved in the absence of hormones, although Rugini (1995) recommended the addition of Zeatin to solid MS medium to boost emergence. Thus, embryos of the cultivars 'Chetoui', 'Chemlali' and 'Arbequina' (Trabelsi *et al.*, 2003) and 'Picholine Marocaine' (Brhadda *et al.*, 2008) germinated easily on OM and MS media supplemented with 0.5 mg l⁻¹ of Zeatin and resulted to well-developed plantlets, while a free-hormones medium rich in sucrose induced cell proliferation of the embryos. Conversely, Toufik *et al.* (2017) observed that the presence of growth regulators, in particular Zeatin alone in the OM-based medium, was not essential for the germination of embryos of the cultivar 'Dahbia' and can even inhibit the root emergence and cause a strong explant necrosis although the addition of NAA with GA3 allowed up to 45% conversion from mature embryos according to Mazri *et al.* (2020). Therefore, the inclusion of growth regulators especially cytokinins to the germination

medium is directly determined by the genotype and degree of maturity of the embryos (Merkle *et al.*, 1995). In this sense, Bradaï *et al.* (2016) indicated that well-matured and structured or cotyledonary embryos of 'Picual' germinated easily in the absence of hormones, unlike globular embryos whose germination varies between 30 and 70%.

The regenerated plants in this study showed a normal phenotype (phyllotaxis, leaf shape, etc.) during their *in vitro* maintenance as well as an easy acclimatization to natural conditions. Leva (2009) indicated that plantlets regenerated by somatic embryogenesis show a stable phenotype similar to that of the mother plants. Moreover, despite their fragility, these plants acclimatize easily to natural conditions and show normal growth under greenhouse and good development after transfer to the field.

Micropropagation of shoots and acclimatization of regenerated plantlets

The *in vitro* multiplication of plants regenerated by somatic embryogenesis was rarely practiced because their acclimatization was usually carried out directly after germination (Bradaï *et al.*, 2016). In fact, the DKW medium (Driver and Kuniyuki, 1984) as modified by Revilla *et al.* (1996) and supplemented with a hormonal balance rich in cytokinins was often used although the chemical formulation of OM medium containing Zeatin was commonly recommended for the rapid stimulation of axillary buds of several olive cultivars (Lambardi *et al.*, 2013) due to its nutritional content, particularly in microelements (Rugini *et al.*, 2020). Cerezo *et al.* (2011) indicated that the micro-cuttings taken after germination of embryos of the cultivar 'Picual' respond easily on DKW medium supplemented with BA and IBA by developing shoots of about 1.4 cm in height with formation of a basal callus often accompanied by the emission of one or more roots. Nevertheless, Bradaï *et al.* (2016) observed that shoots multiplication from somatic embryos was influenced more by the age of the cell culture than by its genotype (callus line). These authors obtained more developed rooted shoots from young cultures while less sprouted buds with older lines giving small shoots often without roots. According to Bhojwani and Razdan (1996) *in vitro* shoots need to reach a minimal size to root easily as small plants may not survive during the acclimatization period. Therefore, our results confirm the importance of the genotype, the significant effect of the DKW chemical formulation and the presence of

Zeatin in addition to an auxin for the multiplication and rooting of shoots resulting from the germination of somatic embryos.

In conclusion, our study is a contribution to the optimization of the *in vitro* regeneration of olive tree by somatic embryogenesis and describes for the first time an efficient regeneration of whole plants without morphological abnormalities in the main olive cultivar in Algeria 'Chemlal' via embryogenic cultures induced from juvenile material, radicles of zygotic embryos. The obtained results show that the development of plantlets by germination of somatic embryos depends strongly on the genotype and the chemical and hormonal composition of the used culture medium. A solid OM medium supplemented with hormones allowed a faster germination resulting in well developed shoots. Subsequently, multiplication of the shoots on OM or DKW media containing Zeatin with IBA generated whole and rooted plantlets easily acclimatized to natural conditions.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge funding support from the National Higher School of Agronomy (ENSA) and the Algerian Ministry of Higher Education and Scientific Research (MESRS).

References

- BESNARD G., TERRAL J.F., CORNILLE A., 2018 - *On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives*. - Ann. Bot., 121: 385-403.
- BHOJWANI S.S., RAZDAN M.K., 1996 - *Plant tissue culture: theory and practice, a revised edition*. - Elsevier, The Netherlands, pp. 767.
- BRADAÏ F., PLIEGO-ALFARO F., SÁNCHEZ-ROMERO C., 2016 - *Long-term somatic embryogenesis in olive (Olea europaea L.): Influence on regeneration capability and quality of regenerated plants*. - Sci. Hortic., 199: 23-31.
- BRADAÏ F., SÁNCHEZ-ROMERO C., MARTÍN C., 2019 - *Somaclonal variation in olive (Olea europaea L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on genetic stability*. - Sci. Hortic., 251: 260-266.
- BRHADDA N., WALALI L.D.M., ABOUSALIM A., 2008 - *Effet du sucre sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (Olea europaea L.) cv. 'Picholine Marocaine'*. - Biotechnol. Agron. Soc. Environ., 12(3): 245-250.
- CAÑAS L.A., BENBADIS A., 1988 - *In vitro regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (Olea*

- europaea L.). - *Plant Sci.*, 54: 65-74.
- CEREZO S., MERCADO J.A., PLIEGO-ALFARO F., 2011 - *An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive*. - *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 106: 337-344.
- DRIVER J.A., KUNIYUKI A.H., 1984 - *In vitro propagation of paradox walnut rootstock*. - *HortScience*, 19: 507-509.
- FABBRI A., BARTOLINI G., LAMBARDI M., KAILIS S., 2004 - *Olive propagation manual*. - Landlinks Press, Collingwood, VIC, Australia, pp. 141.
- JAFARZADEH-BAJESTANI M., KHODAI-KALAKI M., MOTAMED N., NOORAYIN O., 2011 - *Genetic transformation of olive somatic embryos through Agrobacterium tumefaciens and regeneration of transgenic plants*. - *Afr. J. Biotechnol.*, 10(28): 5468-5475.
- LAMBARDI M., OZUDOGRU E.A., RONCASAGLIA R., 2013 - *In vitro propagation of olive (Olea europaea L.) by nodal segmentation of elongated shoots*, pp. 33-44. - In: LAMBARDI M., E.A. OZUDOGRU, and S.M. JAIN (eds.) *Protocols for micropropagation of selected economically-important horticultural plants, Methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, NJ, USA, pp. 994.
- LEVA A.R., 2009 - *Morphological evaluation of olive plants propagated in vitro culture through axillary buds and somatic embryogenesis methods*. - *Afr. J. Plant Sci.*, 3(3): 37-43.
- LOPES T., CAPELO A., BRITO G., LOUREIRO J., SANTOS C., 2009 - *Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in Olea spp. using nuclear microsatellites*. - *Trees*, 23(1): 29-36.
- MAZRI M.A., NACIRI R., BELKOURA I., 2020 - *Maturation and conversion of somatic embryos derived from seeds of olive (Olea europaea L.) cv. Dahbia: Occurrence of secondary embryogenesis and adventitious bud formation*. - *Plants*, 9(1489): 14.
- MERKLE S.A., PARROT W.A., FLINN B.S., 1995 - *Morphogenic aspects of somatic embryogenesis*, pp. 155-204. - In: THORPE T.A. (eds.) *In vitro embryogenesis in plants. Current plant science and biotechnology in agriculture*, Vol. 20. Springer, Dordrecht, Germany, pp. 560.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962 - *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures*. - *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497.
- NEUMANN K.H., KUMAR A., IMANI J., 2009 - *Plant cell and tissue culture - a tool in biotechnology basics and application*. - Springer, Berlin, Germany, pp. 333.
- REVILLA M.A., PACHECO J., CASARES A., RODRIGUEZ R., 1996 - *In vitro reinvigoration of mature olive trees (Olea europaea L.) through micrografting*. - *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant*, 32: 257-261.
- RUGINI E., 1984 - *In vitro propagation of some olive cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos*. - *Sci. Hortic.*, 24: 123-134.
- RUGINI E., 1988 - *Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (Olea europaea L.)*. - *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 14: 207-214.
- RUGINI E., 1995 - *Somatic embryogenesis in olive (Olea europaea L.)*, pp. 171-189. - In: JAIN S.M., P.K. GUPTA, and R.J. NEWTON (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants-Angiosperms*. Vol. 2. Springer, Dordrecht, Germany, pp. 513.
- RUGINI E., BALDONI L., SILVESTRI C., MARIOTTI R., NARVAEZ I., CULTRERA N., CRISTOFORI V., BASHIR M.A., MOUSAVI S., PALOMO-RIOS E., MERCADO J.A., PLIEGO-ALFARO F., 2020 - *Olea europaea Olive*, pp. 343-376. - In: LITZ R.E., F. PLIEGO-ALFARO, and J.I. HORMAZA (eds.) *Biotechnology of fruit and nut crops*. Second edition. CABI International, pp. 687.
- RUGINI E., CARICATO G., 1995 - *Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (Olea europaea L.) "Canino" and "Moraiolo"*. - *Plant Cell Rep.*, 14: 257-260.
- SÁNCHEZ-ROMERO C., 2019 - *Somatic embryogenesis in Olea spp.* - *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 138: 403-426.
- SÁNCHEZ-ROMERO C., 2021 - *Somatic embryogenesis in olive*. - *Plants*, 10(433): 6.
- SHIBLI R.A., SHATNAWI M., ABU-EIN, AI-JUBOORY K.H., 2001 - *Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali' Olive (Olea europaea L.)*. - *Sci. Hort.*, 88: 243-256.
- TOUFIK I., BELKOURA I., GUENOUN F., 2017 - *Improving germination conditions of somatic embryos derived from radicle explants of Moroccan olive cultivar Dahbia*. - *Eur. J. Biotech. Biosci.*, 5(3): 51-56.
- TRABELSI E.B., BOUZID S., BOUZID M., ELLOUMI N., BELFELEH Z., BENABDALLAH A., GHEZEL R., 2003 - *In vitro regeneration of olive tree by somatic embryogenesis*. - *J. Plant Biol.*, 46(3): 173-180.