

République Algérienne Démocratique et Populaire  
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Institut National Agronomique (I.N.A) El Harrach Alger.  
المعهد الوطني للعلوم الفلاحية - الحراش - الجزائر

## Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de  
Magister en sciences agronomiques

Option : Protection de la Nature

## Thème

**Essai de vitropropagation de l'arganier :  
*Argania spinosa* (L.) Skeels à partir de  
vitrosemis.**

Présentée par : MORSLI Abdelkader

Devant le Jury :

Président : M<sup>r</sup> ABDELKRIM H. : Maître de conférence INA.  
Directeur de thèse : M<sup>r</sup> KHELIFI L. : Chargé de cours INA.  
Examineurs : M<sup>r</sup> BOUDJENIBA M. : Maître de conférence ENS Kouba.  
M<sup>r</sup> BOUTEKRABT A. : Maître de conférence INES Bliida.  
M<sup>r</sup> NEDJAH A. : Directeur de recherche.

Année universitaire 1998/1999

1388 50/B



## Dédicaces



- A la mémoire de mes grands-parents.*  
*A la mémoire de mon beau-père.*  
*A mes grands-parents.*  
*A mes très chers parents, pour leur soutien et sacrifices.*  
*A ma très chère et tendre Sabrina.*  
*A ma toute petite et adorable fille Naila Imène et mon neveu Aniss.*  
*A mes très chers Frères et Sœurs : Kamel, Rachid, Nabil, Amel et Samira.*  
*A ma très chère et sympathique belle-mère.*  
*A mes belles sœurs Dalila et Myriem.*  
*A mes oncles Mohamed et Mustapha.*  
*A toutes les familles : Benyahia, Chellouche, Kasmi, Kouidri, Mokhtari,*  
*Ould-Metidji, et Zenoud.*  
  
*A tous mes amis (es).*

*Je dédie ce modeste travail.*



## Remerciements

Cette étude a été menée au **Laboratoire des biotechnologies** à l'Institut National de la Recherche Forestière (I.N.R.F) sous la direction de **Monsieur KHELIFI L.**, qui a suivi ce travail avec beaucoup d'intérêts, ses orientations toujours très fondées et ses conseils judicieux m'ont permis d'améliorer constamment le présent document. C'est à lui que je dois le fruit de ce travail. Qu'il trouve à travers ces quelques lignes, le témoignage de ma reconnaissance tant pour sa disponibilité que pour son soutien moral durant les moments les plus difficiles.

Je remercie vivement **Monsieur ABDELKRIM H.**, Maître de conférence à l'Institut National Agronomique (I.N.A) d'El Harrach, d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Mes sincères remerciements vont également à **Monsieur BOUTEKRABT A.**, Maître de conférence à l'Université de Blida et **Monsieur BOUDJENIBA M.**, Maître de conférence à l'E.N.S de Kouba d'avoir voulu juger ce travail.

Que **Monsieur NEDJAH A.**, Directeur Général de l'Institut National de la Recherche Forestière, trouve ici l'expression de mes remerciements de m'avoir accueilli dans son Institut et avoir accepté d'examiner ce travail.

J'exprime également ma profonde amitié et reconnaissance envers tous mes collègues du département de Foresterie pour leur soutien et leur encouragement, particulièrement **M<sup>r</sup> LELLOUCHI M.** qui a réalisé mes diapositives et **Mr MEDDOUR H.** pour son aide précieuse.

Je ne saurais oublié de remercier le personnel de l'I.N.R.F pour leur gentillesse et leur collaboration en particulier mes collègues du Laboratoire, **M<sup>r</sup> HAMANI**, **M<sup>r</sup> ZENDOUCHE**, **M<sup>r</sup> SADJI** et **Mr HIMRANE**.

Je tiens, également, à remercier **M<sup>lle</sup> SANGUI R.**, de l'Agence Nationale pour la Conserve de la Nature (A.N.N) de m'avoir permis d'utiliser ses premières photos de l'arganier de Tindouf.

J'exprime également mes remerciements à mon oncle Mohamed, pour son aide précieuse.

Je ne saurais terminé ces remerciements sans témoigner ma vive reconnaissance à mes très chers parents pour leur soutien moral et financier. Je dois aussi m'excuser auprès de ma femme pour les moments volés, qu'elle soit assurée de ma profonde reconnaissance pour sa disponibilité.

 **Sommaire** 

## Liste des abréviations

- **AIA** : Acide indolacétique (auxine) (PM : 175.2).
- **AIB** : Acide indolbutyrique (auxine) (PM : 203.4).
- **ANA** : Acide naphthalacétique (auxine) (PM : 186.2).
- **BAP** : 6-Benzyl Amino Purine.
- **Brg.axill** : bourgeonnement axillaire.
- **Brg.néofor** : Bourgeons néoformés.
- **ddl** : degré de liberté.
- **EG** : Milieu de culture à base d'Eau gélosée.
- **EGC** : Milieu de culture à base d'Eau gélosée + charbon actif.
- **Embry.somat** : Embryogenèse somatique.
- **K** : Milieu de culture KNOP
- **KC** : Milieu de culture KNOP + charbon actif
- **KN** : Kénétine.
- **MS** : Murashige et Skoog.
- **Org.rep** : Organes reproductifs
- **PPDS** : Plus petite différence significative.
- **UF** : Unité fourrière.
- **WPM** : Woody Plant Medium
- **Zéatine** : 6-4-hydroxy-3-méthyl-2-énylaminolpurine (cytokinine) (PM : 219.3).

## Liste des figures

	<b>Page</b>
Figure.1 : Aire de répartition de l'arganier au Maroc.....	2
Figure.2 : Localisation de l'arganeraie en Algérie.....	4
Figure.3 : Aire naturelle et d'introduction de l'arganier dans le monde.....	6
Figure.4 : Protocole représentant les étapes et les facteurs testés pour la désinfection du matériel végétal.....	22
Figure.5 : Protocole utilisé pour la germination <i>in vitro</i> des graines et des embryons. ....	23
Figure.6 : Protocole général utilisé pour l'étude de la multiplication <i>in vitro</i> de l'arganier.....	23
Figure.7: Protocole expérimental adopté pour l'étude de la callogenèse.....	24
Figure.8: Protocole expérimental utilisé pour étudier l'enracinement.....	25

## Liste des tableaux

Titre du tableau	Page
Tableau.1 : Exemples de feuillus multipliés <i>in vitro</i> .....	13
Tableau.2 : Exemples de balances hormonales utilisées <i>in vitro</i> chez les Angiospermes.....	15
Tableau.3 : Exemples de techniques de micropropagation des angiospermes par élongation – fragmentation. ....	15
Tableau.4 : Exemples de feuillus multipliés <i>in vitro</i> .....	16
Tableau.5 : Exemples de feuillus multipliés par embryogenèse somatique. ....	17
Tableau.6 : Exemples de feuillus enracinés <i>in vitro</i> .....	18
Tableau.7: Efficacité de la méthode de désinfection des graines.....	27
Tableau.8: Efficacité de la méthode de désinfection des embryons.....	27
Tableau.9: Influence du milieu de culture sur la germination des embryons.....	29
Tableau.10: Synthèse des principaux résultats obtenus pour la callogénèse .....	35
Tableau.11: Récapitulatif des principaux résultats obtenus.....	52
Tableau.12: Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus.....	56
Tableau.13: Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus.....	60
Tableau.14: Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus avec le traitement à l'obscurité.....	63
Tableau.15: Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus.....	67

❧ Introduction générale ❧



## Introduction générale

La conservation de la biodiversité est une préoccupation mondiale. Cette dernière se justifie dans le souci d'assurer un développement durable (écologique et économique) et de la préserver pour les générations futures. C'est dans ce contexte que doit s'intégrer l'Algérie de part sa volonté de conserver et de sauvegarder ses ressources génétiques que par sa volonté de les valoriser.

Les réflexions actuelles sur l'élaboration d'une stratégie nationale pour la conservation de la biodiversité démontrent d'une part l'urgence de mettre en place un plan d'action (inventaire de la diversité biologique) et d'autre part de développer de nouvelles techniques pour préserver cette biodiversité.

Aujourd'hui, plusieurs espèces végétales se trouvent menacées ou en voie de disparition de par leur dégradation sous les effets des pressions anthropiques (surexploitation) que par leur statut d'endémique (localisation géographique).

Parmi ces espèces, l'arganier, *Argania spinosa* (L.) Skeels, considéré comme relictique de l'ère tertiaire, se trouve dans sa limite la plus extrême (Tindouf) en formant une population naturelle restreinte dotée d'un intérêt écologique et social, qui font de lui un arbre particulièrement intéressant pour le développement de ces zones arides.

C'est dans ce contexte que notre étude se veut à la fois la connaissance d'une espèce saharienne à usages multiples peu connue chez nous, et la mise en place d'une nouvelle technique pour sa propagation par le biais de la culture *in vitro*.

Par ailleurs, la maîtrise de la micropropagation de l'arganier revêt une importance dans les possibilités de régénérer l'espèce en premier lieu et d'exploiter sa variabilité génétique en second lieu (clonage). Ainsi, à partir d'un matériel juvénile, nous essaierons de lancer un programme de vitropropagation et ce par la technique de multiplication par élongation - fragmentation, tout en étudiant les différents facteurs pouvant optimiser les conditions de culture. Les questions auxquelles nous devons répondre s'annoncent comme suit :

- Quelles seraient les conditions de culture pouvant offrir le maximum de germinations de bonne qualité ?
- Quelles seraient les conditions de micropropagation de l'espèce ?
- Est-t-il possible d'induire la rhizogenèse des pousses produites sachant qu'elle est très aléatoire pour la provenance marocaine (NC AIM et al., 2011) ?
- Quelles seraient les recommandations pour cette espèce et plus particulièrement pour la provenance algérienne ?

 **Synthèse bibliographique** 

## I - Monographie de l'espèce.

*Argania spinosa* (L.) Skeels, appartient à l'ordre des Ebénales, famille des Sapotacées. C'est le représentant le plus septentrional d'une famille essentiellement tropicale dont plusieurs représentent un intérêt économique, certain (MORTON et VOSS, 1987; NOUAIM *et al.*, 1991) (Planche.1 Photo.1)

La présence de l'arganier au Maroc et en Algérie remonterait à l'ère tertiaire, ce dernier aurait vu son aire régresser lors des périodes plus froides et humides correspondant aux glaciations du quaternaire, ce qui montre la grande adaptation de cette espèce dans cette région du monde (PEYERIMHOFF, 1944 ; DE PONTEVES *et al.*, 1990)

### 1 - Distribution et écologie de l'arganier.

#### 1.1 - Distribution.

Au Maroc, l'arganeraie s'étend actuellement sur 828.500 ha (AYAD, 1989). Seulement beaucoup d'auteurs s'accordent à penser que de nombreux secteurs, notamment toute la partie méridionale autour de la province d'Agadir, présente une faible densité en arbres, les estimations font état de 500.000 ha à 700.000 ha (DE PONTEVES *et al.*, 1990 ; LEWALLE, 1991).

Son aire principale se situe entre 29° et 32° de latitude Nord (NOUAIM & CHAUSSOD, 1993). Des colonies isolées d'Arganier se trouvent également au Nord-Est du Maroc, près de Oujda. Son extension fut autrefois, plus considérable, ainsi, des îlots subsistent encore aux environs de Rabat (Oued Grou) (MIEGE, 1945; NOUAIM *et al.*, 1991), au Nord-Est du pays, dans le massif de Beni-Snassen (MAIRE, 1939; PEYERIMHOFF, 1944; TREGUBOV, 1963).

Actuellement, la plus grande partie de l'arganeraie couvre une bande côtière plus ou moins clairsemée, depuis l'embouchure de l'Oued Tensift au Nord d'Essaouira jusqu'à celle de l'Oued Souss. Il s'étale aussi dans une grande partie de la plaine de Souss, sur le versant Sud du haut Atlas et le versant de l'Anti-atlas jusqu'au massif du Siroua à l'Est (NOUAIM *et al.*, 1991). La limite Sud-Est de l'arganier se situe aux environs de l'Oued Noun (EHRIG, 1974) (Fig.1).

Toutefois, l'arganier, sous forme d'arbrisseaux, couvre les marges les plus extrêmes de son aire de distribution, plus précisément dans la partie occidentale du Sahara algérien, entre le jbel ouarkiz et la hamada de Tidouf comprise (28°N, 8°W) (Fig.2).

En 1949, DUPIN écrivait que : « Les mérites de l'arganier sont tels qu'il y aurait intérêt à propager cette essence partout où elle pourrait s'acclimater en Afrique du Nord ».

En 1953, CHEVALER recommandait : « appelé à disparaître si on ne le protège pas... appelé à être répandu dans les régions semi-arides du globe si on le sélectionne comme arbre fruitier, destiné à occuper de vastes espaces dans les territoires qui lui conviennent ».

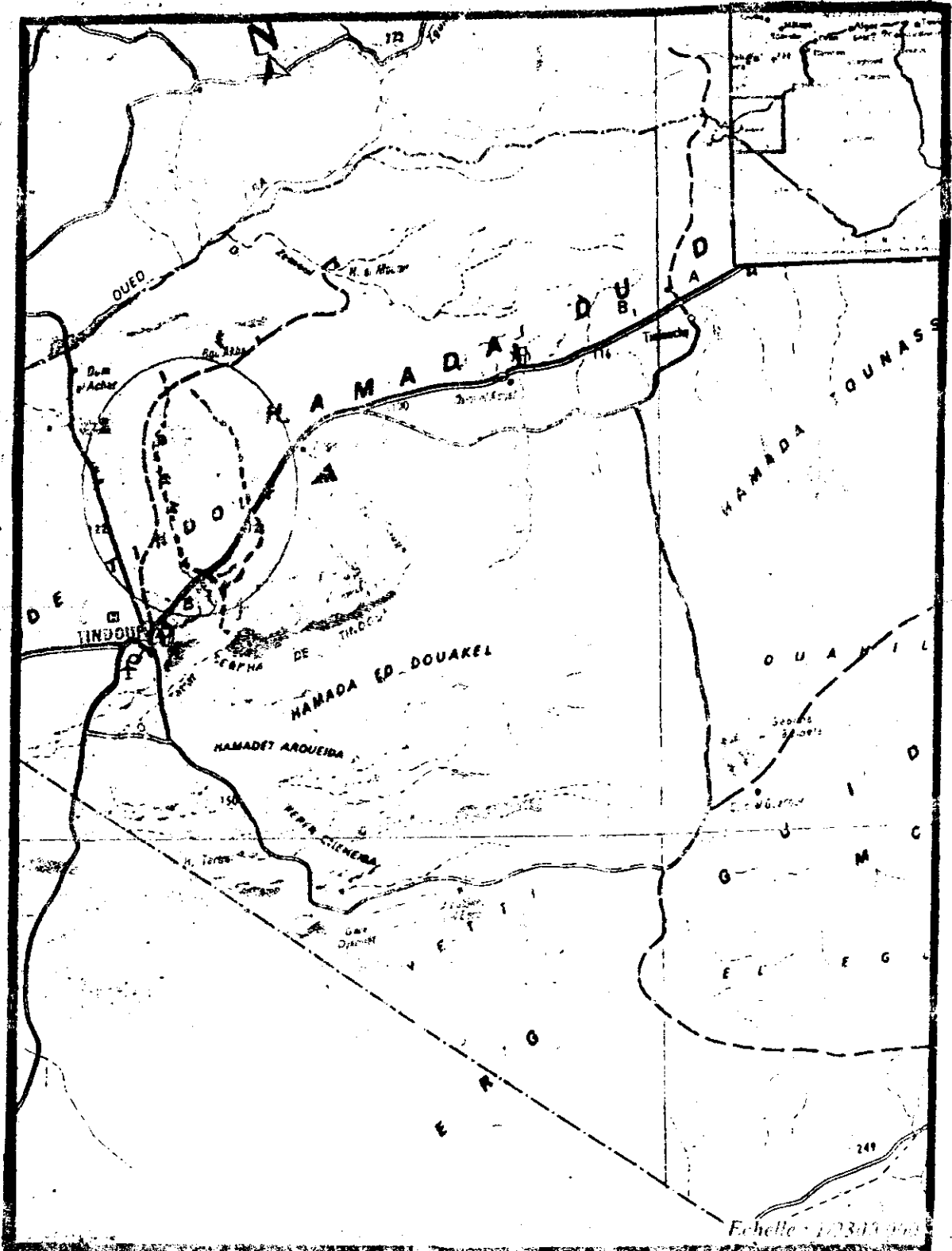


Fig. 2 Localisation de l'arganeraie en Algérie (Tindouf).

Les premiers essais d'acclimatation de l'arganier ont été tentés en Europe occidentale; introduit en Hollande dès 1697, et pour la première fois en Angleterre en 1711 (HOOKER, 1878 in MORTON et VOSS, 1987).

SMITH (1882), note que les gelées de janvier 1838, ont été fatales aux Arganiers d'Angleterre, en particulier pour ceux qui poussaient contre un mur du jardin botanique de Kew.

RIEUF (1962), signale qu'il a été introduit dans le midi de la France en 1852 et en Californie en 1927.

Dans le Sud de l'Espagne, des zones à climat aride et semi-aride, ont été très favorables puisque l'arganier s'y trouve à l'état sub-spontané (RIVERA NUNEZ et RUIZ LIMINANA, 1987).

De nombreux autres essais ont été réalisés de par le monde (Fig.3) et la présence de l'arganier a été aussi signalée en Floride, Haïti, Tasmanie, Australie (MORTON et VOSS, 1987), en Afrique du Sud (TROUP, 1932) Chypre (STREETS, 1962), au Soudan, aux Canaries, en Égypte et aux U.S.A. (WOODS, 1935).

Cependant, des Essais d'introduction de l'arganier ont eu lieu sur le littoral algérien, mais les résultats ne semblent pas être satisfaisants (VAN DER BEGHE, 1889 in NOUAIM *et al.*, 1991). Par contre, il est intéressant de noter que sur le littoral de Mostaganem, à l'intérieur de l'enceinte de l'Institut National Agronomique (I.N.A.), ainsi, qu'au jardin d'essai d'El-Hamma, l'arganier fleurit et fructifie, ce qui ouvre de sérieuses perspectives pour l'insérer dans les programmes de reboisements.

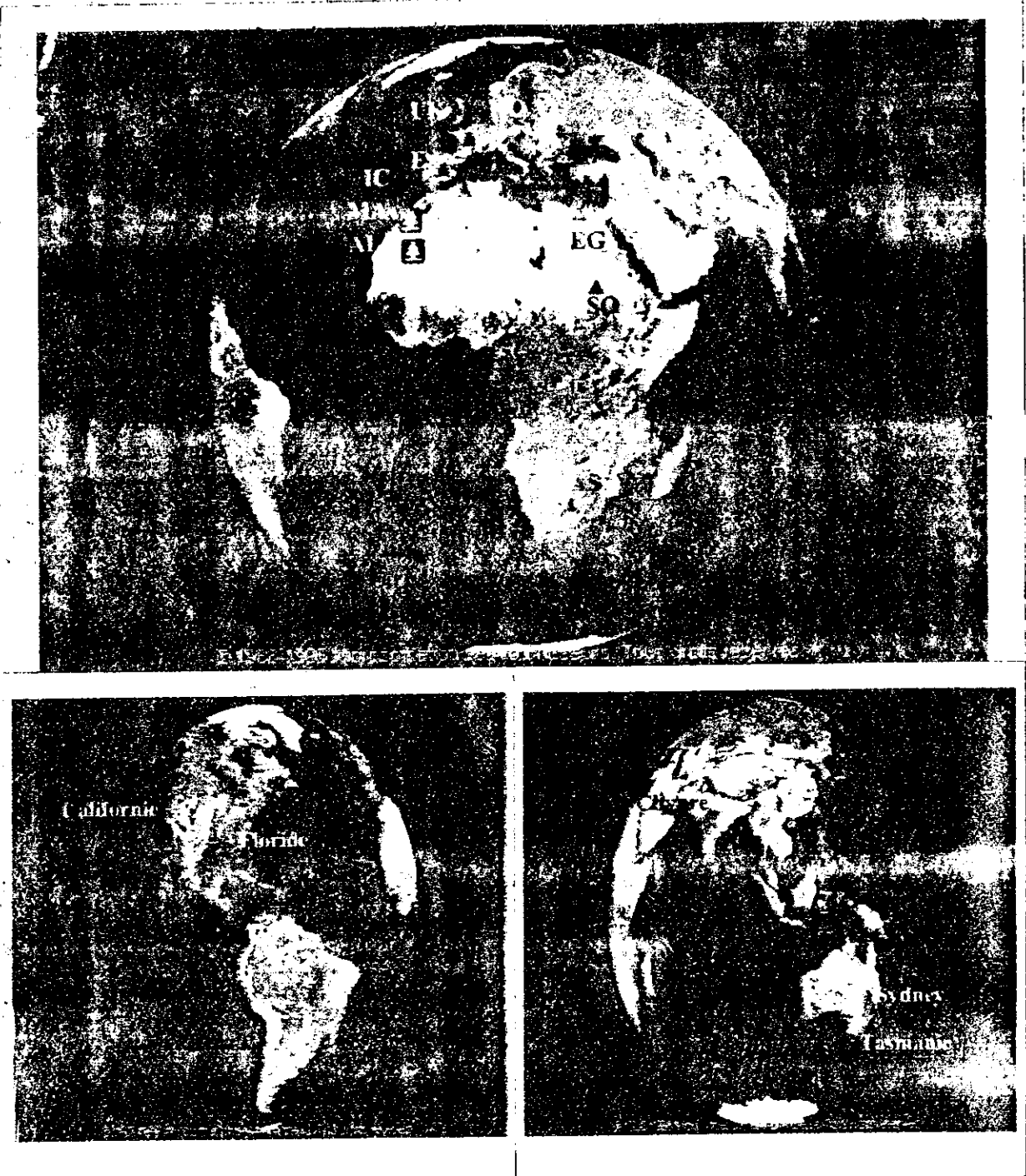
## 1.2 - Ecologie de l'arganier

L'arganier est une espèce thermoxérophile, dont l'aire de répartition chevauche à la fois avec les bioclimats semi-aride, (dont les précipitations moyennes annuelles sont comprises entre 290 et 400 mm et la température moyenne annuelle la plus basse est le plus souvent supérieure à 7°C) et aride (qui occupe les deux tiers de l'arganeraie avec une précipitation moyenne oscillant entre 150 mm et 300 mm et la température moyenne du mois le plus froid entre 3°C et 7°C). En outre, l'arganier supporte convenablement les températures élevées et s'adapte aux périodes de sécheresse prolongées, grâce à sa faculté de défoliation.

NOUAIM *et al.* (1991), estiment que les caractéristiques écophysologiques de l'arganier, ne lui permettent pas d'avoir cette capacité adaptative, toutefois, il supporte la sécheresse en puisant de l'eau à grande profondeur.

Selon NOUAIM *et al.* (1990), une symbiose racinaire de type endomycorhizienne, a été mise en évidence. Ces champignons symbiotiques (à vésicules et arbuscules) jouent très probablement un double rôle, dans la résistance de l'arbre à la sécheresse et dans sa nutrition minérale.

Le paramètre clé de l'écologie de l'arganier semble être lié à l'humidité atmosphérique. L'aire de l'arganier subit, en effet, une influence océanique marquée.



légende :

- Aire naturelle de l'arganier : Algérie : Tindouf (AL) et le Maroc : plaine de Souss (MA).
- ▲ Aire d'introduction
  - Afrique du Sud (ZA)
  - Algérie (AL) : Alger, Mostaganem
  - Angleterre (UK)
  - Espagne (ES)
  - France (FR)
  - Israël (IL)
  - Italie (IT)
  - Jordanie (JO)
  - Les Canaries (IC)
  - Soudan (SO)

Fig.3 : Aire naturelle et d'introduction de l'arganier dans le monde

L'importante humidité de l'air due aux fréquentes rosées matinales (spécialement, en été), où les brumes et brouillards pouvant se maintenir une grande partie de la journée, limitent ainsi son insolation et l'élévation de la température. Cette océanité semble réguler la répartition de l'Arganier au sud du Maroc (NOUAIM *et al.*, 1990).

En altitude, c'est le froid qui détermine la limite supérieure de l'Arganier. Cette dernière se confond avec les basses neiges (EMBERGER, 1924;1925), soit 900 mètres dans le Haut-Atlas (NOUAIM et CHAUSSOD, 1993) et 600 mètres dans les montagnes (Sud du Maroc) (PELTIER, 1982).

En fin, une caractéristique intéressante de l'Arganier, est qu'il pousse sur tous les types de sol, y compris les sols salés (NOUAIM *et al.*, 1991). On le retrouve sur les schistes, les roches calcaires et les alluvions. Cependant, il semble exclure les sols à sable mobile (NOUAIM et CHAUSSOD, 1992).

Par ailleurs, l'Arganier semble supporter une large gamme de pH allant de 4,6 à 7,5 (NOUAIM *et al.*, 1991).

## 2 - Association de l'Arganier

BOUDY (1952) signale que l'association de l'Arganier est complexe en raison d'un mélange d'influence saharo-tropicale.

Dans la partie Nord de son aire naturelle (Maroc), l'Arganier se trouve en association avec:

- *Juniperus oxycedrus*
- *Olea europaea*
- *Tetraclinis articulata*
- *Pistacia atlantica*
- *Rhus tripartitum*
- *Ziziphus lotus*
- *Ceratonia siliqua*

Et dans la partie Sud, elle comprend des espèces très particulières comme:

- Les Euphorbes cactoides,
- L'Acacia gommifère
- Les lianes

En Algérie, une liste floristique établie par une équipe de recherche de l'agence nationale de la conservation de la nature (A.N.N) dans le site étudié, comprend les espèces suivantes :

- *Acacia raddiana*
- *Antirrhinum ramosissimum*
- *Anvillea radiata*
- *Aristida plumosa*
- *Asphodelus tenuifolius*
- *Astragalus gombosi*
- *Brassica muricata*
- *Buhonium graveolens*
- *Cleome arabica*
- *Colocynthis vulgaris*
- *Cotula cineria*
- *Crotalaria saharae*
- *Echium sp*
- *Erodium glaucophyllum*
- *Ferula guyoniana*
- *Fagonia glutinosa*
- *Farsetia aegyptica*
- *Gymnocarpos decander*
- *Haloxylon scoparium*
- *Hebanthemum hippii*

- *Ifloga spicata*
- *Marrubium deserti*
- *Moricandia arvensis*
- *Marrubium deserti*
- *Moricandia arvensis*
- *Neurada procumbens*
- *Panicum turgidum*
- *Pergularia aegyptiaca*
- *Pergularia tomentosa*
- *Retama retum*
- *Rhus tripartitum*
- *Rumex vesicarium*
- *Sabia aegyptiaca*
- *Ziziphus lotus*

### 3 - Intérêts de l'espèce.

#### 3.1 - Intérêt écologique.

Au Maroc du Sud-Ouest, l'arganier occupe, généralement, les sols peu profonds dans lesquels, et grâce à son système racinaire puissant, il contribue favorablement à la lutte contre l'érosion et désertification qui menacent constamment ces régions.

En Algérie, les peuplements clairs de l'arganier (Planche.1 Photo.3) et leurs cortèges floristiques, atténuent l'action des vents violants dans la région de Tindouf.

Ainsi, BENCHAKROUN (1989), note que, les puissantes racines des arbres qui s'alimentent d'eau profonde, permettent la restitution de l'eau en surface à la suite d'une évaporation intense suivie de condensations nocturnes.

Cette eau humidifiant la couche superficielle de la terre, est utilisée par la végétation herbacée, ce qui permet une production fourragère très importante et une richesse floristique considérable. Aussi, les travaux de PELTIER (1973, 1976, 1977, 1982, 1983) sur la flore marocaine, montrent que plus du tiers de celle-ci se trouve associé à l'arganier dont plusieurs espèces sont endémiques et présentent un intérêt économique.

DEL PERUGIA (1970), insiste sur la flore mellifère de l'arganeraie, très riche et variée, où les abeilles peuvent butiner, pendant, huit mois de l'année, sans oublier la faune qui profite de la protection offerte par l'arganier.

#### 3.2 - Intérêt économique

L'arganier est une espèce à usage multiple, toutes les parties de l'arbre sont utilisables, lui conférant un intérêt socio-économique particulier.

Son intérêt se résume comme suit :

- **Fourrage:** L'arganier peut être utilisé comme espèce pastorale. Les feuilles constituent un excellent fourrage pour les ruminants et plus particulièrement en période de disette (été) (BENCHAKROUN, 1989; DE PONTEVES *et al.*, 1990).

En comptabilisant son feuillage, les sous-produits des fruits et de la strate herbacée poussant sous l'arganeraie, la production fourragère est estimée à 300 UF/ha, ce qui est considérable dans ces conditions extrêmes (ZITAN, 1989; NOUAIM et CHOSSOD, 1992). Parallèlement, on estime que la production moyenne de feuillage seul est de 100 UF/ha. En outre, les fruits sont aussi valorisés pour l'alimentation animale. Ainsi, leur pulpe séchée, présente une valeur énergétique fourragère variant de 0.8 à 0.85 UF/Kg de pulpe (équivalent d'environ 0.85 Kg d'orge) (SANDRET, 1957; BENCHAKROUN, 1989).



En fin, les résidus d'extraction d'huile sont également consommés sous forme de tourteau, riche en acides gras (Extraction incomplète) et en protides, bien que ces derniers soient carencés en Acides aminés soufrés (BLAIRE *et al.*, 1967 in NOUAIM *et al.*, 1991). Les tourteaux, très énergétiques, sont utilisés surtout pour l'engraissement des bovins.

- **Huile:** L'arganier intervient également et de façon importante dans l'alimentation humaine. En effet, l'huile comestible extraite de l'amande d'argan (Planche.1; Photo.4) fournit 25% de l'apport en corps gras consommés dans la région de Souss (NOUAIM *et al.*, 1991).

Cependant, les volumes produits sont dérisoires : 3000 à 4000 t/an, soit 1,6% de la consommation marocaine en huiles alimentaires (RAHMANI, 1989). Bien que cette production soit faible, elle représente une valeur ajoutée non négligeable, étant donnée le faible investissement (LEWALLE, 1991).

L'huile d'argan est très recherchée et vendue nettement plus chère que l'huile d'olive, en raison de sa qualité (huile douce), de sa rareté et du volume horaire de travail nécessaire à sa production.

En effet, 100 kg de fruits frais donnent 50 kg de noyaux, produisant environ 4,5 kg d'amandes qui donneront finalement 1 à 1,8 kg d'huile nécessitant environ 8 à 10 heures de travail (BENCHAKROUN, 1989; NOUAIM *et al.*, 1991).

En utilisant des machines simples et une technologie appropriée, le taux de d'extraction d'huile (Environ 45% actuellement) pourrait être amélioré tout en diminuant le coût de l'opération (GORET, 1988).

Du point de vue, composition chimique, plusieurs auteurs se sont intéressés à l'huile d'argan. Il s'agit d'une huile du groupe oléolinoléique constituée à 80% d'acides gras insaturés. Par comparaison à l'huile d'olive sa faible teneur en acide linoléique et sa forte richesse en acide linoléique lui confèrent une grande stabilité (contre l'oxydation), tout en lui offrant la qualité d'une huile de grande valeur alimentaire.

De plus, son intérêt vient également de sa richesse en fraction insaponifiable, notamment, les carotènes, les tocophérols ( $\alpha$ -tocophérol = vitamine E) et les stérols (FARINES *et al.*, 1984). La vitamine E ayant des propriétés pharmacologiques contre le vieillissement de la peau, est présente dans l'huile d'argan à raison de 440 mg / Kg (CHARROUF, 1984; FARINES *et al.*, 1984). Quant aux stérols, (quatre stérols ont été identifiés), on trouve les sclérotérol auxquels on attribuait des propriétés anticancéreuses (BOUKHABZA et PICHON-PRUM, 1988).

En fin, les caractéristiques diététique et cosmétique font de l'huile d'argan, une huile très recherchée par les laboratoires spécialisés, pour les vertus réelles ou supposées dans la lutte contre le dessèchement, et le vieillissement physiologique de la peau (BOUKHOBZA et PICHON-PRUM, 1988).

- **Bois :** Etant extrêmement dur, le bois d'arganier est difficile à travailler, il est largement utilisé comme bois d'œuvre, de charpente, ou encore pour la fabrication d'outils agricoles, ou de piquets de clôtures à base de branches.

L'utilisation la plus importante du bois reste cependant, la fabrication de charbon, réputé pour être l'un des meilleurs combustibles, car il brûle lentement et possède un pouvoir calorifique élevé (BENCHAKROUN, 1989; NOUAIM *et al.*, 1991).

Ainsi, pendant la première guerre mondiale, une crise de combustible en Europe, a entraîné la destruction, de milliers d'hectares d'arganier (DE PONTEVES *et al.*, 1990) à titre d'exemple la production annuelle atteignait 70.000 quintaux entre 1919 et 1924 (NOUAIM *et al.*, 1991).

En Algérie, l'arganier est toujours considéré comme une espèce inconnue, il est généralement exploité comme combustible par les nomades pour leurs besoins quotidiens (Planche.1 ; Photo.2).

- **Agrosystème sous l'arganier** : En Algérie, l'arganier est beaucoup plus considéré comme essence forestière que fruitière, il est exploité uniquement comme combustible (chauffage).

Cependant, au Maroc, l'arganier représente le pivot d'un système agricole s'articulant autour de trois spéculations, l'espèce elle-même, l'élevage de petits ruminants, surtout les caprins, ainsi que la culture d'orge (BENCHAKROUN, 1989; DE PONTEVES *et al.*, 1990) seulement, la pression démographique est telle, que des dysfonctionnements graves sont apparus ces dernières années.

### 1.5 - Problèmes posés pour la propagation de l'arganier:

L'arganier est polymorphe, il présente des races presque inermes et d'autres fortement épineuses. Le polymorphisme porte également sur les caractères floraux et sur les fruits et graines (MIEGE, 1954).

De plus, l'aire de répartition de l'arganier jusqu'au franges les plus extrêmes de son aire (TINDOUF), constitue une grande variabilité génétique de l'espèce qui laisse entrevoir d'importantes possibilités d'amélioration qui doivent passer par une parfaite maîtrise de sa biologie de reproduction (espèce supposée allogame) (ELMOUSSADIK *et* PETIT, 1996).

Au Maroc, plusieurs auteurs, EL-MAZZOUDI *et* ERRAFIA (1977) *et* PRENDERGAST (1991), se sont intéressés à la germination des noix d'argan, et les résultats obtenus semblent controversés. Ainsi, EL-MAZZOUDI *et* ERRAFIA (1977), ont appliqué, des pré-traitements chimiques pour lever la dormance, d'autres considérant qu'un simple pré-trempeage des graines pendant quelques jours dans de l'eau, assure un pourcentage de germination élevé (NOUAIM *et al.*, 1991), si la phase de germination ne pose pas d'obstacle majeur.

La non disponibilité des noix d'argan (ramassées par les riverains pour l'alimentation du bétail et l'extraction de l'huile), pose un véritable problème quant à la régénération naturelle de l'arganier, au Maroc.

En Algérie, la faible régénération serait principalement due à la réceptivité du sol et aux gerboises qui détruisent une grande partie des graines (SAYOUD, *com. pers.*, 1995) en plus des problèmes de son surexploitation par les riverains.

Concernant sa multiplication (qui présente un véritable problème de régénération dans son aire naturelle), quelques références traitant sur sa germination en pépinière sont disponibles (BOUDJENANE, 1995).

PLATTERBORZE (1976), s'est intéressé à multiplier l'espèce par bouturage herbacé sous brumisation, le pourcentage d'enracinement obtenu reste faible (6%).

Quant à la micropropagation les seuls travaux existants sont effectués par l'I.N.R.A de DIJON (France). La propagation ne semble pas poser de problème particulier, mais l'enracinement des vitroplants est faible (NOUAIM *et al.*, 1991).

Actuellement, on ne dispose d'aucune publication traitant de la micropropagation de l'arganier, les travaux de WOODS (1985) et KHELIFI *et al.* (1996), traitent des germinations *in-vitro*.

En Algérie, les recherches sont, actuellement, à la phase de prospection et de connaissance des peuplements et de mise au point de méthodes de micropropagation dont le présent travail.

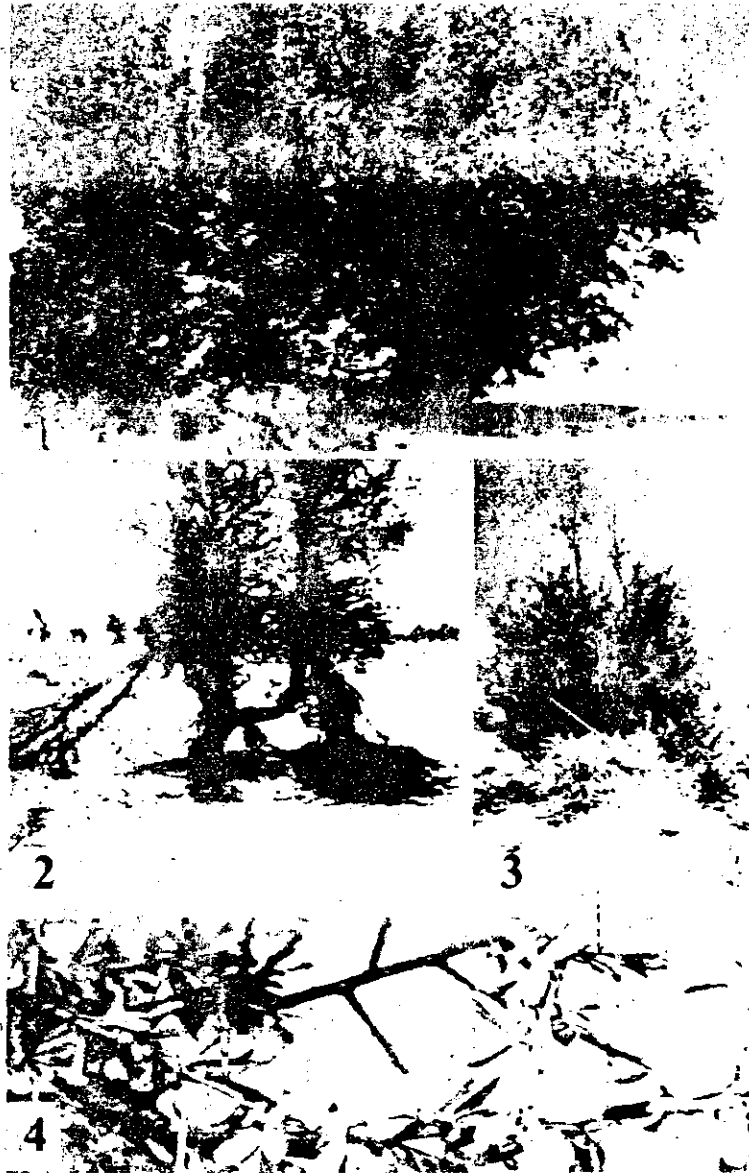


Planche 1 : L'arganier dans son aire naturelle

1- Aspect d'un arganier en pleine croissance  
(Photo : Sangai).  
2- Exploitation de l'arganier pour le bois  
(Photo : Sangai).

3- Régénération de l'arganier sur son aire naturelle  
possibilité de fixation.  
4- Fruits de l'arganier au stade de  
maturation (Photo : M'Hirit).

Planche 1 : L'arganier dans son aire naturelle.

## II - Micropropagation des Angiospermes:

Les premières tentatives de multiplication *in vitro* des espèces forestières remontent aux années 1940: *Lilium compestre*, (GAUTHERET, 1940). Actuellement, la majorité de ces espèces (Angiospermes) sont multipliées *in vitro* avec succès (tableau.1).

Tableau 1: Exemples de femelles multipliés *in vitro* (liste indicative non exhaustive)

- org.rep : organes reproductifs.  
- brg.axill : Bourgeonnement Axillaire

Espèces	Matériel végétal	Nature de l'explant	Références
<i>Betula pendula</i>	Semis	tige	Huhtinen et Yahyaoglu (1974)
<i>Betula pubescens</i>	Org.rep	Anthère (hap)	Durzan et Logostowski (1975)
<i>Paulownia taiwaniana</i>	Org.rep	Ovule	Huhtinen (1978)
<i>Hevea brasiliensis</i>	Org.rep	Anthère (hap)	Fu (1978)
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Org.rep	Anthère (hap)	Chen <i>et al</i> (1978)
<i>Quercus robur</i>	Semis	Brg axill	Radovic (1978)
<i>Populus alba</i>	Semis	Brg axill	Chalupa (1979)
<i>Ulmus effusus</i>	Semis	Brg axill	Chalupa (1979)
<i>Ulmus scabra</i>	Semis	Brg axill	Chalupa (1979)
<i>Acer rubrum</i>	Semis	Tige	Chalupa (1979)
<i>Alnus glutinosa</i>	Semis	Tige	Brown (1980)
<i>Alnus rubra</i>	Semis	Tige	Brown (1980)
<i>Fagus sylvatica</i>	Embryon	Embryon	Brown (1980)
<i>Liriodendron tulipifera</i>	Semis	Brg terminal	Brown (1980)
<i>Betula platyphylla</i>	Semis	Tige	Brown (1980)
<i>Castanea sativa</i>	Embryon	Embryon	Mc Cown et Amos (1980)
<i>Salix babylonica</i>	Vitroplant	Microbouture	Veitner et Veitner (1980)
<i>Quercus suber</i>	Embryon	Embryon	Favre (1981)
<i>Centrosema brasiliense</i>	Semis	Microbouture	Woods (1985)
<i>Stylosanthes humata</i>	Vitroplant	Microbouture	Woods (1985)
<i>Tylosera exaltatum</i>	Vitroplant	Microbouture	Woods (1985)
<i>Hevea brasiliensis</i>	Org.rep	Anthère	Lardet et Haffner (1991)
<i>Quercus suber</i>	Semis	Feuilles	Slaoui (1991)
<i>Suaeda madagascariensis</i>	Vitroplant	Microbouture	Berger et Schaffner (1995)

Seulement, de nombreux paramètres interviennent pour la réussite de ce mode de propagation : Matériel végétal, milieu de culture (sucres, régulateurs etc.....) et les conditions de culture (photopériode : lumière/obscurité, température).

### 1- Facteurs liés à la micropropagation.

Seuls les paramètres en relation directe avec la micropropagation des Angiospermes sont présentés.

### 1.1 Milieu de culture :

Généralement, les milieux utilisés *in vitro* sont de composition connue et dont l'efficacité est déjà éprouvée: MURASHIGE et SKOOG (1962), HELLER (1953), LINSMAIER et SKOOG (1956), NITSH et NITSH (1956), Woody Plant Medium = WPM (RUSSELL et McCOWN, 1936).

Cependant, chaque espèce a des exigences propres vis-à-vis de la composition du milieu (macro-éléments, micro-éléments, vitamines et source de carbone organique).

Toute fois, il est impossible d'étudier pour un nouveau matériel végétal, l'équilibre le plus convenable, d'où la nécessité d'essayer, quelques solutions minérales déjà connues, complétées ou modifiées (dilution et/ou concentration).

En effet, dans certains cas, pour améliorer la croissance des apex du meristem, il faut multiplier par 100 la concentration de Magnésium (BIJOT, 1980) et la dilution de  $(\text{NH}_4\text{NO}_3)$  4 à 8 fois permet aussi d'améliorer le potentiel organogénèse du *Pistacia atlantica* DESF. (MEDEROS et TRENILLO, 1994). Dans d'autres cas, si la modification, ne permet aucune amélioration, on additionnera divers composés organiques aux milieux (glutamine, Hydrolysat de Caséine..... etc), cas du *Quercus robur* (CHALUPA, 1984).

Concernant, la source de carbone, elle est apportée le plus souvent sous forme de saccharose à des concentrations variant de 10 à 70 g/l (BADJI *et al.*, 1991, CORNU et CHAIN, 1981; DUCHAUX *et al.*, 1991; MEDEROS et TRENILLO, 1994, NOUGARIDE *et al.*, 1996).

### 1.2 Régulateurs de croissance

L'essor que connaissent actuellement les cultures *in vitro* est dû en grande partie à la découverte des hormones de croissance, en effet, l'organogénèse est dirigée *in vitro* par deux grandes familles de régulateurs, les cytokinines (BAP, Zéatine et Kinétines) et les auxines (AIB, ANA .. etc.).

L'action de ces régulateurs sur le végétal est régie par la variation de leur nature et de leur concentration dans le milieu de culture de la sorte qu' :

- Un rapport Cytokinine / Auxine en faveur de l'auxine déclenche une Rhizogénèse.
- Un rapport Cytokinine / auxine en faveur des Cytokinine déclenche une caulogénèse.

Le tableau n °2, illustre l'utilisation des hormones de croissance *in vitro* chez les Angiospermes et leur efficacité sur l'orientation et l'intensité d'organogénèse.

Tableau.2 Exemples de balances hormonales utilisées in vitro chez les Angiospermes.

Brg.axill. : Bourgeonnement axillaire.  
 Embry.somat : Embryogenèse somatique.  
 Brg.néofor. : bourgeons néoformés.  
 KN : Kénaline.

Espèces	Explants	Régulateurs de croissance	Résultats	Références
<i>Sapium sebiferum</i> (Euphorbiaceae)	entre-nœuds	BAP : 2,5 µM ANA : 0,5 µM	Brg. axill. -6 Brg./expl	SIRIL et DHAR (1997)
<i>Morus indica</i> (Moraceae)	Fragment de semis	BAP : 2,5 mg/l 2.4.D : 2mg/l	Brg. néofor. 6brg.	SAHOO <i>et al.</i> (1997)
<i>Commiphora waghii</i> (Burseraceae)	Embryon immature	KN : 1,15 µM AIB : 0,46 µM	Embry.somat 62% de cals embyogènes	SINGH <i>et al.</i> (1997)
<i>Acacia senegal</i> (Fabaceae)	entre-nœuds	ZEATINE : 5.10 <sup>-7</sup> M BAP : 5.10 <sup>-7</sup> M ANA : 5.10 <sup>-7</sup> M	Pousses axillaires : Fusiformes	BADJI <i>et al.</i> (1991)

## 2 - Techniques de micropropagation

### 2.1 Multiplication par bourgeonnement axillaire.

Le principal avantage de ce mode de micropropagation réside dans le respect de la stricte conformité génétique du végétal à multiplier. C'est pourquoi, beaucoup d'auteurs utilisent aujourd'hui ce mode de multiplication (CORNU *et al.*, 1981; VIEITEZ *et al.*, 1981; WOODS 1985; BADJI *et al.*, 1991).

La micropropagation consiste à favoriser l'élongation des méristèmes initialement portés par les microboutures à partir desquels un nouveau cycle de multiplication sera entrepris, c'est la méthode dite de multiplication par élongation-fragmentation. Pour cette technique, on utilise généralement soit une Cytokinine seule soit associée à une Auxine mais à faible concentration.

Le tableau n°3; résume quelques travaux se basant sur cette technique pour multiplier quelques Angiospermes.

Tableau.3: Exemples de Techniques de micropropagation des angiospermes par élongation-fragmentation

Espèces	Explants	Milieu de culture	Régulateurs de croissance	Résultats	Références
<i>Acacia albida</i> (Fabaceae)	Semis	Nitch & Nitch saccharose:20g/l Agar : 8g/l	ANA : 1 mg/l BAP : 0,7 mg/l	5 à 7 pousses par vitrosemis	DUHOUX (1988)
<i>Acacia senegal</i> (Fabaceae)	Microbouture à un nœud	Jo. can <i>et al.</i> saccharose 3g/l Agar : 8g/l	Zeatine:5.10 <sup>-7</sup> M BAP : 5.10 <sup>-7</sup> M ANA : 5.10 <sup>-7</sup> M	pousses de 11,7 à 15,5 mm	BADJI <i>et al.</i> (1991)
<i>Sapium sebiferum</i> (Euphorbiaceae)	Microbouture à un nœud	MS	BAP : 2,5 µM ANA : 0,5 µM	6Brgs / explants	SIRIL et DHAR (1997)

## 2.2 Multiplication par bourgeonnement adventif et / ou néoformés.

Ce mode de multiplication repose sur l'utilisation de tissu différencié et dépourvus de méristèmes qui peuvent alors avoir deux évolutions possibles, soit une formation directe de bourgeons adventifs, soit une évolution en cal sur lequel des bourgeons néoformés, prennent naissance.

Pour aboutir à la formation de l'un des deux types de bourgeons, le milieu de culture doit obligatoirement contenir soit une Cytokinine seule soit une association de Cytokinines et d'Auxines.

Les bourgeons adventifs et/ou néoformés sont souvent le siège de variations génétiques qui peuvent affecter la structure du génome : (niveau de ploïdie, recombinaison à la suite d'échange D'ADN entre chromosomes, erreur de réplication D'ADN... etc).

Ce type de variation abouti dans certains cas au phénomène appelé variation somaclonale. Dans ce cas la conformité génétique du matériel de départ n'est plus garantie.

Le tableau n°4, illustre quelques travaux utilisant les bourgeons adventifs et/ou néoformés pour la multiplication *in vitro*.

Tableau.4 : Exemples de feuillus multipliés *in vitro*.

KN : Kénitine

Espèces	Explants	Milieu de culture	Régulateurs de croissance	Résultats	Références
<i>Elacagnus angustifolia</i> (Elaeagnaceae)	Cotylédons hypocotyle radicules	LS	KN: 0.5 mg/l BAP: 10 mg/l 2-4.D: 1mg/l	Brgs néoformés	LUCCHESINI ET MENSUALI - SODI (1996)
<i>Morus indica</i> (Moraceae)	Entre- noeuds Prélève sur un arbre âgé de 5ans	MS	BA : 0,5 mg/l 2-4.D : 2mg/l	83% de cals forment en moyenne 6Brg néoformés	SAHCO <i>et al.</i> (1997)
<i>Salmalia malabarica</i>	Entre- noeuds	MS	BAP: 1mg/l ANA : 1mg/l AIB : 0,07mg/l	Brgs néoformés	TAPATI DAS (1996)
<i>Ulmus pamila</i> (Ulmaceae)	Feuilles	MS + Vit B <sub>5</sub>	BAP: 5.10 µm	55% de cals forment 2,4 brgs sur cal	KAPAUN et CHAN ZONGMING (1997)



### 2.3 Embryogenèse Somatique

Contrairement aux bourgeons adventifs ou néoformés, le tissu de départ peut comporter des méristèmes (limbes de feuilles, microbouture à un nœuds; embryon entier, etc.). Cependant le passage par un stade cal est obligatoire sur lequel des structures bipolaires (embryon somatique) peuvent prendre naissance.

Les cultures en milieu liquide (suspension cellulaire) sont les plus utilisées pour améliorer l'aptitude à l'embryogenèse somatique des tissus de départ. Des transferts réguliers sur milieu frais sont indispensables pour le déclenchement de l'embryogenèse somatique.

Pour ce mode de multiplication, il est indispensable d'associer une Cytokinine et une Auxine, comme la BAP ou la Kinétine avec le 2-4.D, en outre le milieu de culture doit être enrichi en voie organique (Glutamine, Thiamine HCl, Hydrolysat de caséine, Extrait de Malt...).

Le tableau n°5, illustre succinctement quelques travaux sur l'embryogenèse somatique chez les Angiospermes.

Tableau 5: Exemples de feuilles multipliés par embryogenèse somatique.  
 PPL: Polyxinylpyrrolidone.  
 KN: Kénitine

Espèces	Explants	Milieu de culture	Régulateurs de croissance	Résultats	Références
<i>Carica papaya</i>	Épicotyle tige pétioles	MS	KN: $1.10^{-6}$ M AIA: $5.10^{-7}$ M 2,4.D: $9.10^{-6}$ M	cal embryogène épicotyle: 47% les tiges: 55%	MONMARSON <i>et al.</i> (1991)
<i>Commiphora wightii</i>	Embryon immature	B <sub>5</sub>	KN: 1,15 µm AIB: 0,46 µm	62% de cal embryogène	SINGH <i>et al.</i> (1996)
<i>Dalbergia sissoo</i> (Fabaceae)	Embryon zygotique	MS	ANA: 1,16 µM 2,4.D: 9,04 µM	embryogenèse somatique	DAS <i>et al.</i> (1997)
<i>Quercus rubra</i> (Fagaceae)	Feuilles (plant juvénile)	MS modifié-caséine: 500mg/l PPL: 100mg/l	BAP: 5,4 µM ANA: 0,09µM	embryogenèse somatique	RANJILAL <i>et al.</i> (1996)
<i>Quercus varibilis</i> (Fagaceae)	Embryon immature	MS modifié + 4 semaines obscurité	/	embryogène somatique	WOODS (1985)
<i>Prunus avium</i> (Rosaceae)	Embryon immature	MS modifié + hydrolysat de caséine + glutamine	BAP: 11 M KN: 11 M ANA: 25 M	Favorise la production de structures embryonnaires	PEDROTTI <i>et</i> CORNU. (1991)

**- Enracinement in vitro**

L'enracinement *in vitro* n'est pas toujours une étape facile. Chaque espèce a des exigences propre pour le déclenchement de la rhizogenèse qui est directement influencée par :

- Un apport d'une auxine seule dans le milieu de culture.
- Des substances comme l'acide gibberellic ou des polyphénols en concentrations comme de bons stimulateurs (GASPAR *et al.*, 1988).
- La dilution des sels minéraux (KI) jusqu'au demi de leur concentration usuelle dans le milieu comme celui de MS (DUHOUX., 1988).
- Des absorbants de molécules toxiques tel le charbon actif (MISSON *et al.*, 1983).

Le tableau ci-dessous dresse quelques exemples de feuilles enracinés *in vitro*.

Tableau 6: Exemples de feuilles enracinés *in vitro*

Espèces	Explants	Milieu de culture	Régulateurs de croissance	% enracinement	Références
<i>Acacia saligna</i>	Vitroplants	MS	AIB : 2 mg/l	90%	BARAKAT et EL-LAKANY (1992)
<i>Albizia chinensis</i>	Vitroplants	M5/2	AIB : 2,5 mg/l	Meilleur enracinement	BARAKAT et EL-LAKANY (1992)
<i>Centrosema brasilianum</i>	Vitroplants	MS	Sans régulateur	Meilleur enracinement	WOODS (1985)
<i>Ceratonia Oreothauma subsp. oreothauma</i>	Vitroplants	MS/2	AIA : 1 mg/l	50%	WOODS (1985)
<i>Swartzia Madagascarensis</i>	Vitroplants	MS/2 gérite : 2,7g/l sucre : 30g/l	ANA : 26,8µm	100%	BERGER et SCHAEFFNER (1983)

**4- Acclimatation et Sevrage des Vitroplants**

Les vitroplants enracinés sont généralement repiqués dans des fertiles pots remplis de substrat (ex : 1/3 de vermiculite + 2/3 de tourbe) préalablement stérilisés à l'autoclave (1h à 120 °C) et fertilisés. Ces derniers sont placés dans des serres pourvues d'un système de brumisation (système Mist) afin de maintenir une humidité de 100%. Le transfert en conditions naturelles ne doit se faire qu'après la formation de quelques nouvelles feuilles au niveau de la serre qui sont plus apte à supporter les conditions naturelles (système stomatique plus développées, meilleur photosynthèse ..... etc.).

### 5. Conclusion.

Pour l'arganier, aucune référence traitant de sa multiplication *in vitro* n'est actuellement disponible. En effet, les revues spécialisées dans le domaine des biotechnologies végétales ne cite ni pas ce genre de travaux.

Pour ce qui nous concerne, nous avons opté pour l'utilisation de matériel végétal juvénile plus apte à réagir *in vitro* (plus organogène) pour tenter de mettre au point une technique de micropropagation de l'arganier depuis la multiplication jusqu'au sevrage des plantules.

Pour le milieu de culture, nous nous sommes basé sur les différents travaux cités plus haut concernant d'autres angiospermes, ceci nous a poussé à retenir comme milieu de base le milieu MS de MURASHIGE et SKOOG (1962).

La méthode de multiplication retenue au départ étant la multiplication par elongation et fragmentation.

## ❧ Matériels et méthodes ❧

## Matériels et méthodes

Le présent travail a été effectué au laboratoire des Biotechnologies de l'Institut National de la Recherche forestière (I.N.R.F) de Bainem.

### **1- Matériel végétal**

Les graines d'arganier utilisées pour la réalisation de cette étude, ont été récoltées en juin 1994, dans un peuplement naturel de la région de Tinnouit.

Elle nous ont été fournies par l'Agence National pour la Conservation de la Nature (ANN) d'El-Hamma (Alger). Après les avoir débarrassées de leur mésocarpe, elles ont été placées à - 18 °C selon la méthode préconisée par PREDERGAST (1991), afin de conserver leur pouvoir germinatif.

D'autre part, la germination a été étudiée sur des graines scarifiées (cassures au niveau des léguments) ou sur des embryons directement mis en culture.

Signalons au passage que les graines ont un comportement orthodoxe (teneur en eau d'environ 4 à 6 %).

### **2- Désinfection**

Avant de lancer la germination, il est nécessaire de désinfecter le matériel utilisé, pour cela, différentes méthodes ont été testées :

#### **a) Désinfection des graines**

Pour l'arganier la méthode que nous avons adoptée se déroule en deux étapes :

- Prédésinfection dans un bain de merceryl laurylé pendant 10 mn
- Désinfection proprement dite : deux facteurs ont été étudiés :

(\*) Nature de l'agent désinfectant :

- Eau de Javel ( $\text{NaOCl}$  ; 12°)
- Eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$  ; 30V)

(\*) Durée de la désinfection :

- 10mn ; 15mn ; 20mn et 30mn

à l'issus de la deuxième étape (Désinfection proprement dite), 3 rinçages à l'eau distillée stérile s'ensuivent.

#### **b) Désinfection des embryons**

Comme précédemment, la désinfection a été faite en deux étapes :

- Prédésinfection dans un bain de merceryl laurylé pendant 10 mn
- Désinfection proprement dite : J'en jouant sur la concentration d'eau de Javel (12° et 32°) et le temps (10, 15, 20 et 30 mn).

Le protocole général de désinfection est représenté dans la figure n°4.

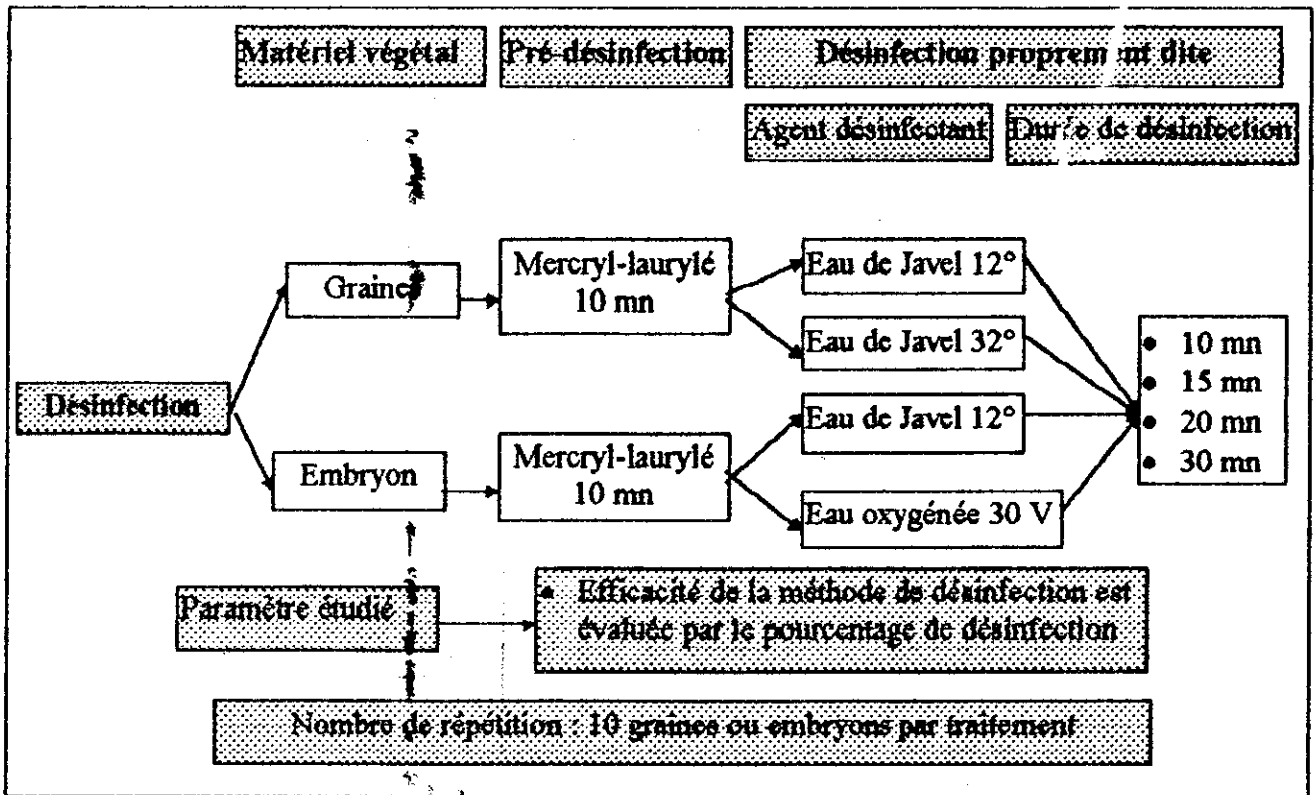


Fig.4 :Protocole représentant les étapes et les facteurs testés pour la désinfection du matériel végétal

### 3- Milieux de culture

Tous les milieux utilisés dans cette étude sont stérilisés par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, après ajustement de leur pH à 5.6 à 5.7

#### 3.1 Milieux de germination

Deux types de milieux sont utilisés pour la germination des graines :

- Eau gélosée par référence aux travaux de PRENDERGAST (1991)
- Solution KNOP (1865) gélosée (7 g/l) (Annexe I.)

Pour les embryons, une nouvelle variante a été étudiée : le charbon actif (1g/l) (milieu avec ou sans charbon actif). Les différents milieux sont donc :

- Eau gélosée (7 g/l).
- Eau gélosée (7 g/l) + charbon actif (1g/l).
- KNOP(1865) gélosée (7 g/l).
- KNOP(1865) + Charbon actif (1g/l) (gélosé : 7g/l).

La germination a lieu dans des bocaux contenant 50 ml de milieu de culture et hermétiquement fermés

Le protocole expérimental adopté pour la germination est présenté dans la figure n° 5.

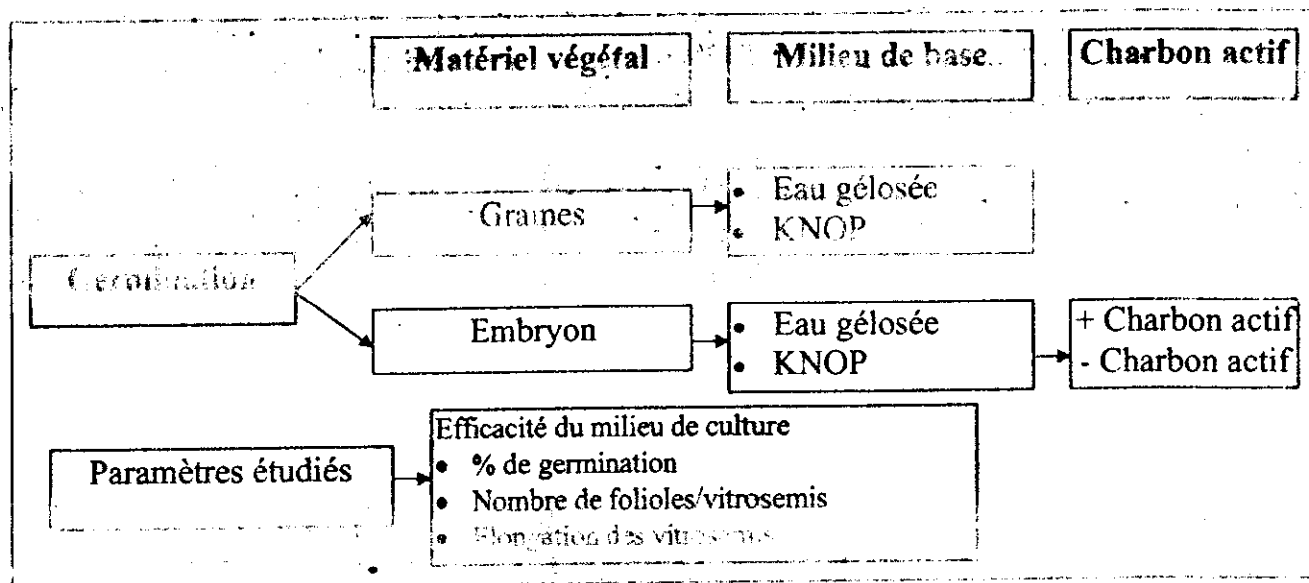


Fig. 5 : Protocole expérimental utilisé pour les germinations in vitro des graines et des embryons

### 3.2 Milieux de multiplication

La micropropagation dépend étroitement de la composition du milieu. En absence de références concernant l'Arganier, nous avons utilisé comme milieu de base, le milieu (MS) de MURACHIGE ET SKOOG (1962) (annexe 1.) qui contient en outre du saccharose (20 g/l) et est solidifié par de l'agar (7g/l).

En plus du milieu de base dépourvu de régulateurs de croissance, plusieurs autres milieux contenant des concentrations croissantes de BAP ont été testés (Fig.6)

La multiplication a lieu dans des tubes à essais en verre (200 mm x 25mm) contenant 20 ml de milieu de culture hermétiquement obturés par du coton

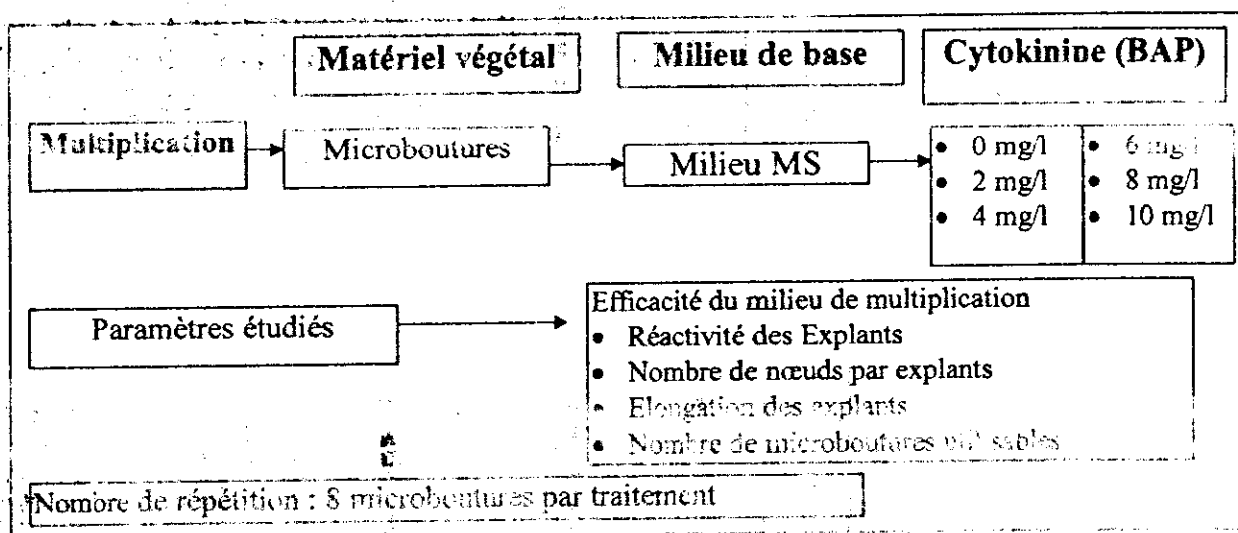


Fig. 6 : Protocole général utilisé pour l'étude de la multiplication in vitro de l'arganier

### 3.3 Milieux de callogenèse

Les différents essais de callogenèse ont été réalisés sur le milieu de base (MS) déjà utilisé pour la multiplication. Ce milieu est particulièrement favorable pour le déclenchement d'une activité mitotique due en partie à sa richesse en ions  $NH_4^+$  (SLAOUI, 1991).

Ce milieu contient en outre du saccharose (20g/l), solidifié par de l'agar (Fig.1). La culture est réalisée dans des boîtes de pétri (Diamètre : 9 cm), maintenues dans l'obscurité. Le transfert des cals sur milieu frais est effectué tous les 15 jours (Fig.7).

Le suivi dans le temps de l'évolution de la croissance des cals est évaluée par un indice de croissance (IC).

$$IC = \frac{S_t - S_0}{S_0} \quad \text{Avec } S_t \text{ Surface à temps } t, \\ S_0 \text{ Surface au temps } t_0$$

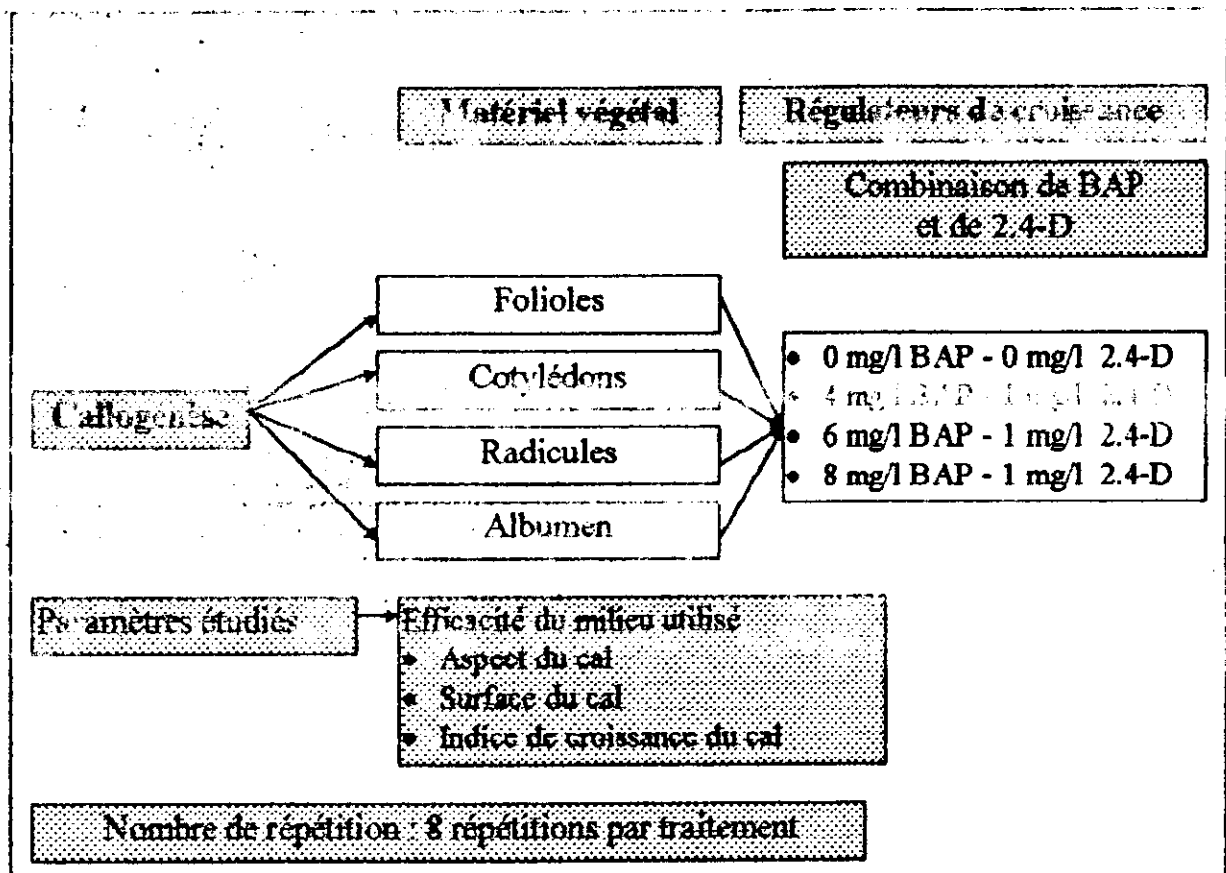


Fig.7 : protocole expérimental adopté pour l'étude de la callogenèse

### 3.4 Milieux d'enracinement

Plusieurs facteurs sont susceptibles d'influencer la rhizogenèse des vitroplants. Notre travail se propose d'étudier l'effet de l'AIB, du charbon actif, de la lumière et de l'obscurité (protocole de la figure n°8).



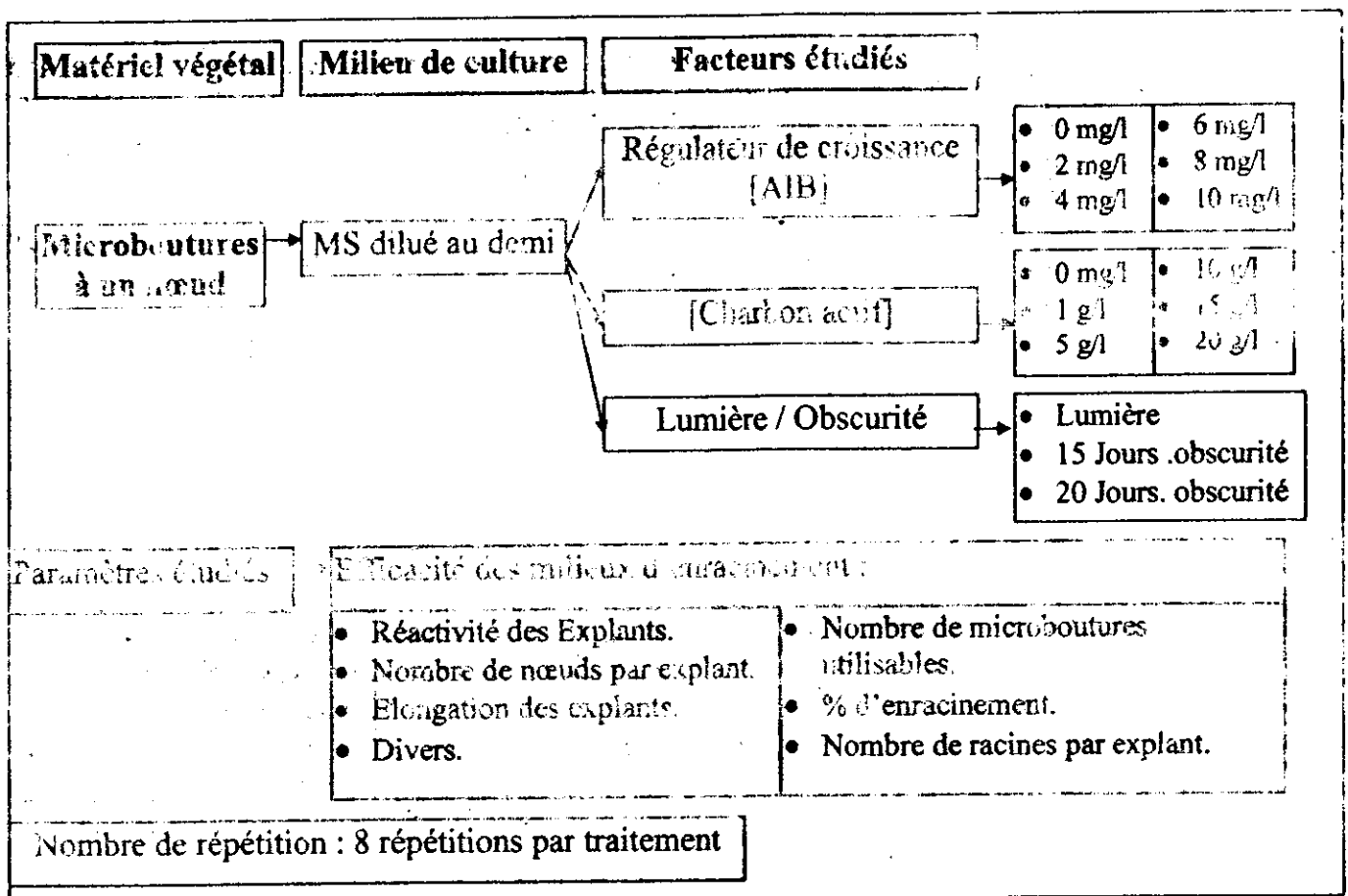


Fig.8 : Protocole expérimental utilisé pour étudier l'enracinement des vitroplants

#### 4- Conditions physiques de culture

Les paramètres climatiques sont communs à l'ensemble des étapes de ce travail :

- Température : 25°C ± 2°C le jour ; 20°C ± 2°C la nuit.
- Photopériode : 16 heures / jour.
- Lumière : produite par des néons Philips de type gros luxe.  
(sauf callogenèse = culture dans l'obscurité totale).

#### 5- Traitement des données

L'analyse statistique des données est basé sur le test de l'analyse de la variance à un seul critère de classification (**Statistica**) suivie d'une comparaison de moyennes deux à deux selon la méthode de la **PPDS** (**DAGNELIE, 1975**).

Les résultats obtenus sont également représentés sous forme de graphique à l'aide du logiciel **Excel 2000**.

## ❧ Résultats et interprétations ❧



## 1- Germination *in vitro*.

### 1.1 Désinfection du matériel végétal

La désinfection du matériel végétal est toujours considérée comme difficile et aléatoire. Pour cela, nous avons testé des méthodes variées pour chaque type d'expiant (graines et embryons).

#### a - Graines:

L'utilisation de NaOCl (hypochlorite de sodium) à 12° donne un taux de décontamination de l'ordre de 10 à 30 % respectivement pour les durées de traitement de 10 mn et 30 mn. La substitution de l'eau de Javel par un autre détergent (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 30V) augmente l'efficacité de la désinfection de 10 % passant ainsi de 20 % à 30 % de graines décontaminées respectivement pour les temps de 10 et 30 mn. Toutefois, ce taux reste faible (tableau 7). Cela est probablement dû aux infections endogènes.

Tableau 7 : Efficacité de la méthode de désinfection des graines (% de décontamination)

Agent désinfectant	Durée du traitement			
	10mn	15mn	20mn	30mn
Eau de Javel (12°)	10%	10%	20%	20%
Eau oxygénée (30V)	20%	30%	30%	30%

#### b- Embryons:

La désinfection des embryons à l'eau de Javel (12°) s'avère peu efficace. Le taux de décontamination obtenu avec cette méthode n'excède pas les 30 % pour une durée de traitement de 30mn.

Nous avons donc trouvé utile d'augmenter la concentration de NaOCl tout en réduisant la durée du traitement. Ainsi, l'utilisation de l'eau de Javel concentrée à 32° pour des durées variables, s'est révélée très efficace (0 % d'infections quelle que soit la durée du traitement) (tableau.8).

Pour les expériences ultérieures, nous avons donc retenu pour la désinfection des embryons, le NaOCl (32°), pendant 10 minutes.

Tableau.8 : Efficacité de la méthode de désinfection des embryons (% d'infections)

Agent désinfectant	Durée du traitement			
	10mn	15mn	20mn	30mn
Eau de Javel (12°)	80%	70%	70%	70%
Eau de Javel (32°)	0%	0%	0%	0%

## 1.2 Milieux de germination

Cette étape consiste à mettre au point un milieu de culture adéquat pour l'obtention de germinations groupées et homogènes qui serviront par la suite de matériel de base pour la micropropagation.

### a- Germination des graines :

Quel que soit le milieu de germination utilisé, les graines ne manifestent aucune germination pendant toute la durée de leur culture (3 mois). Ce résultat négatif peut être dû à la dormance tégumentaire qui caractérise ce type de graine. Pour cela, nous avons opté pour l'utilisation directe des embryons.

### b- Germination des Embryons:

D'une manière générale, l'utilisation des embryons s'avère très intéressante pour plusieurs raisons, notamment, l'entrée rapide en germination (5 jours pour les premiers embryons) et l'obtention de vitrosemis groupés et homogènes (Planche.2, Photo.1 & 2). Ces résultats sont cependant influencés par la composition du milieu de culture.

En effet, le pourcentage de germination varie d'un milieu à un autre. L'optimum (100 %) est obtenu sur le milieu KNOP sans charbon actif (K). Pour les autres milieux ce taux varie de 80 à 90 % (Fig.9).

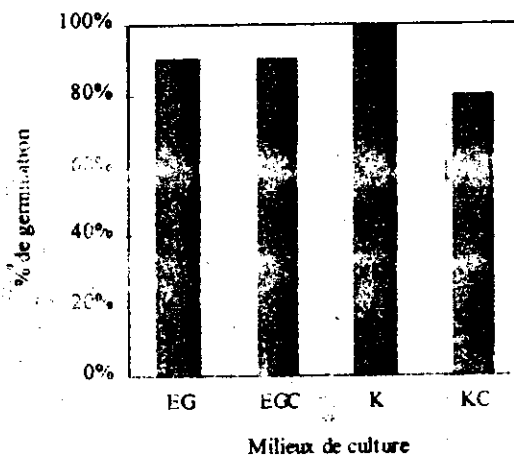


Fig.9 : Influence du milieu de culture sur le taux de germination des embryons d'arganier. (EG = Eau gélosée, EGC = Eau gélosée + charbon actif ; K = KNOP; KC = KNOP + charbon actif).

Concernant la qualité des germinations (Étalement et développement des cotylédons, élancement de l'épicotyle, etc. ...), le milieu (K) donne aussi les meilleurs résultats. Ainsi, après 45 jours de culture, par exemple, le nombre moyen de folioles produites par vitrosemis est 3 fois plus élevé que sur le milieu (KC) de même pour l'élancement moyen qui est 12 fois plus importante (Tableau.9)

Tableau.9: Influence du milieu de culture sur la germination des embryons:

- Nombre de folioles: (Fobs = 6,63; ddl: 3et76; effet significatif du milieu)  
- Elongation des pousses: (Eobs = 55,55; ddl: 3et76; effet significatif)

	K	KC	EG	EGC
Nombre moyen de folioles	4,8	1,6	0,5	0,0
Longueur moyenne des pousses (cm)	7,8	0,4	2,3	0,0

En outre, l'addition du charbon actif aux milieux de germination entraîne généralement des déformations cotylédonnaires très marquées ainsi que des vitrifications des folioles notamment sur le milieu KC (tableau.9)

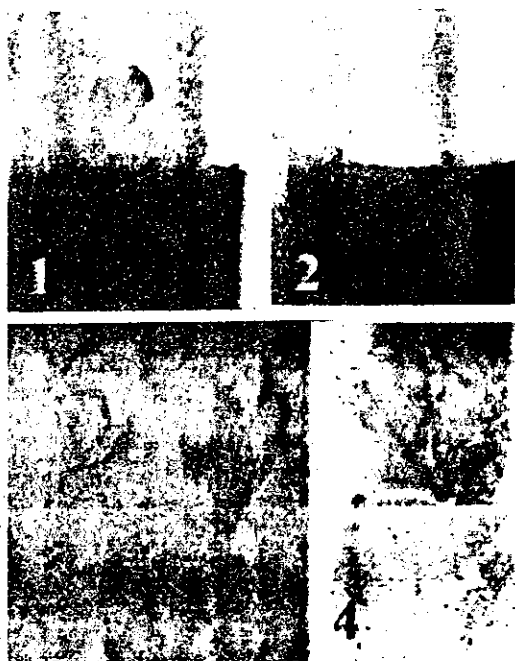
### 1.3 Bilan

L'obtention de vitrosemis de qualité dans les meilleurs délais est l'objectif principal de cette partie de notre travail.

Pour l'arganier, l'utilisation directe d'embryons, se traduit par une entrée rapide en germination (5 jours après la mise en culture) par rapport aux graines qui n'ont jamais germé dans notre cas.

En outre, les embryons présentent un double intérêt :

- Sélection des embryons ne présentant ni déformation ni signe d'infections visibles à l'œil nu, ce qui présente l'avantage de minimiser les risques d'infections.
- Évitement de la dominance végétative. Ce qui favorise l'obtention de germinations groupées et homogènes.



1- Début de la germination (verdissement des cotylédons et émergence de la radicule).

2- Embryon (1 jour).

3- Germination proprement dite : séparation de l'enveloppe séminale.

4- Développement du vitrose mis : élongation de l'épicotyle et de la radicule.

Planche. 2 : Etape de germination des embryons d'arganier *in vitro*.

## 2- Callogenèse

Dans le but d'une multiplication par bourgeons néoformés, nous avons essayé d'induire une callogenèse sur divers types d'explants prélevés soit sur de jeunes plantules obtenues *in vitro* (fragments de cotylédons, de folioles et de racines) ou sur des embryons (fragments de l'enveloppe séminale).

Pour cela, nous avons utilisé des balances hormonales composées d'une cytokinine (BAP) et d'une auxine (2,4-D) dont les rapports sont en faveur de la cytokinine :

Témoin : (0 mg/l de BAP; 0 mg/l de 2,4-D)

T<sub>1</sub> (4 mg/l de BAP; 1 mg/l de 2,4-D)

T<sub>2</sub> (6 mg/l de BAP; 1 mg/l de 2,4-D).

T<sub>3</sub> (9 mg/l de BAP; 1 mg/l de 2,4-D);

A défaut de travaux sur la callogenèse chez l'arganier, les rapports hormonaux ci dessus, ont été fixés aléatoirement mais ils restent cependant dans les normes utilisées pour d'autres feuillus ligneux (BONGA et DURZAN; 1982, DATTA et DATTA; 1983).

### 2.1 Culture de fragments de l'enveloppe séminale.

#### a) Croissance du cal.

Les mesures ont été faites sur une période de 10 semaines depuis l'introduction primaire. En terme de surface, la croissance des cals est continue pendant toute la durée des mesures. Elle atteint son maximum à 10 semaines de culture.

La meilleure croissance en surface est obtenue sur le milieu de culture (T<sub>3</sub>) contenant (9 mg/l de BAP et 1 mg/l de 2,4 -D), soit  $141,67 \pm 5,54 \text{ mm}^2$  (Fig.10).

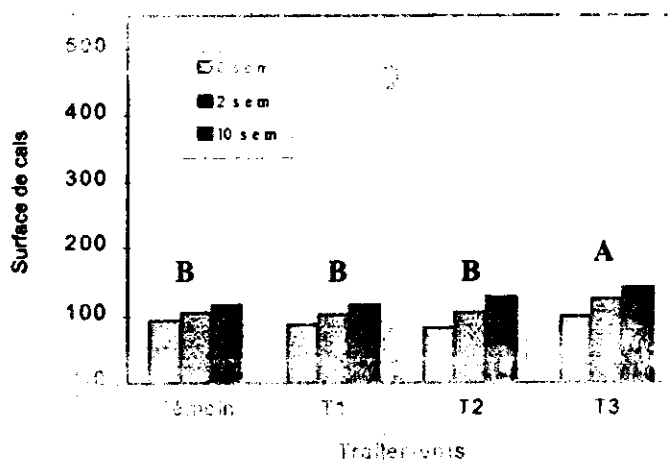


Fig 10 : Evolution de la croissance des cals de l'enveloppe séminale en fonction de la balance hormonale et du temps. (F<sub>0,05</sub> = 7.82; ddl : 3;22, \*) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents).

L'analyse de la variance ne révèle un effet significatif de la balance hormonale sur la croissance des cals qu'après deux semaines de culture.

Ainsi, deux groupes homogènes se dégagent, le premier comporte le traitement T<sub>1</sub> (9 mg/l de BAP et 1 mg/l de 2,4-D) avec une surface moyenne de 124,17 ± 5,05 mm<sup>2</sup>. Le deuxième comporte les 3 autres traitements T<sub>2</sub>, le témoin et le T<sub>3</sub>, présentant respectivement des surfaces de l'ordre de 103 ± 10,20 mm<sup>2</sup>, 104,5 ± 7,25 mm<sup>2</sup> et 106 ± 6,54 mm<sup>2</sup>.

Le suivi dans le temps de l'évolution de la croissance des cals est évalué par l'indice de croissance (IC).

$$IC = \frac{S_t - S_{t_0}}{S_{t_0}}$$

Avec : S<sub>t</sub> : Surface au temps t  
S<sub>t<sub>0</sub></sub> : Surface au temps t<sub>0</sub>

Cet indice varie de 0,11 pour le témoin à 0,31 pour le traitement (T<sub>2</sub>). Cette faible variation explique la faible réactivité de l'enveloppe séminale, dont la croissance des cals se stabilise à partir de la deuxième semaine. (Fig.11).

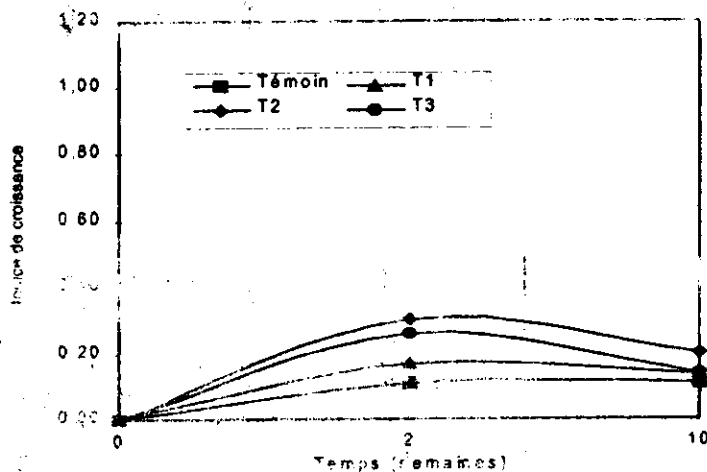


Fig.11 : Evolution des indices de croissance des cals l'enveloppe séminale en fonction du temps et de la balance hormonale.

### b) Origine et aspect du Cal.

La callogenèse commence au niveau des sections de l'enveloppe séminale en formant un amas cellulaire donnant un Cal translucide. Celle-ci s'étale ensuite pour couvrir l'ensemble de l'explant de départ.



## 2.2 Culture de fragments de cotylédons.

### a) Croissance du cal

L'analyse de la figure n°12, permet de constater que la croissance des Cals obtenus sur les cotylédons, atteint des surfaces allant de  $211,17 \pm 23,93 \text{ mm}^2$  à  $549,33 \pm 91,59 \text{ mm}^2$  respectivement pour le témoin et le traitement (T<sub>3</sub>) et ceci à 10 semaines de culture.

L'analyse de la variance effectuée déjà à la deuxième semaine de culture, montre un effet significatif des traitements appliqués. La comparaison des moyennes deux à deux, nous permet de distinguer deux groupes homogènes. Le premier regroupe les traitements (T<sub>1</sub>); (T<sub>3</sub>) et (T<sub>2</sub>), donnant les surfaces respectives de  $268,66 \pm 22,22 \text{ mm}^2$ ,  $270,67 \pm 37,43 \text{ mm}^2$  et  $276,50 \pm 41,49 \text{ mm}^2$ . Le deuxième groupe est représenté par le témoin avec une surface n'excédant pas  $182,33 \pm 23,59 \text{ mm}^2$ .

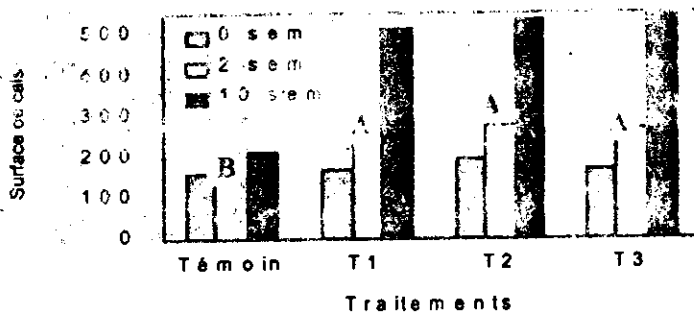


Fig.12 : Evolution de la croissance des cals de cotylédons en fonction de la balance hormonale et du temps. (Fobs = 7.42; ddi : 3; 20; \*) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents)

L'évolution des indices de croissance (IC) montre des comportements différents en fonction des traitements hormonaux appliqués au départ. Les indices obtenus varient de 0.16 pour le témoin à 1.05 pour le traitement (T<sub>3</sub>). Ces indices montrent, que la croissance des cals est continue jusqu'à la 10<sup>ème</sup> semaine (Fig.13).

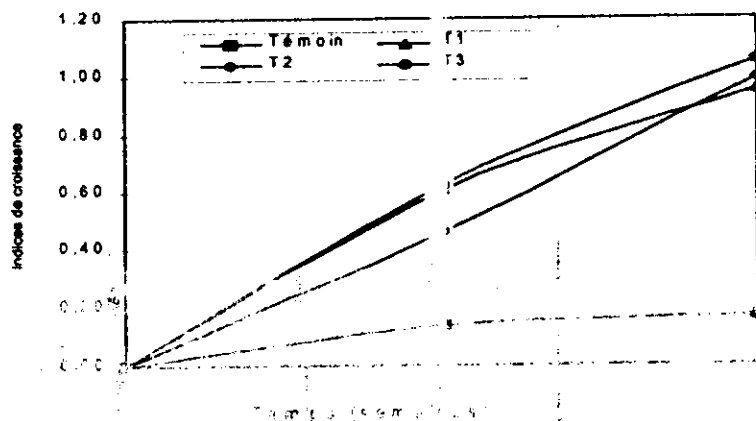


Fig.13 : Evolution des indices de croissance des cals de cotylédons en fonction du temps et de la balance hormonale

b) Origine et aspect du Cal

Les cals apparaissent au niveau de la périphérie des cotyledons et se développent ensuite pour s'étaler sur l'ensemble de l'explant. Ces cals sont d'un aspect compact et de couleur blanchâtre.

2.3 Culture de fragments de racines

a) Croissance du cal.

Les fragments de racines réagissent rapidement en donnant des cals volumineux, atteignant des surfaces de l'ordre de  $21,50 \pm 3,86 \text{ mm}^2$  et  $22,17 \pm 2,74 \text{ mm}^2$  respectivement pour les traitements (T<sub>1</sub>) et le traitement (T<sub>3</sub>) et ce, après seulement deux semaines de culture.

L'analyse de la variance, permet de distinguer trois groupes homogènes dont le premier est constituée des traitements (T<sub>3</sub>) et (T<sub>2</sub>) avec des surfaces respectives de  $22,17 \pm 2,74 \text{ mm}^2$  et  $21,50 \pm 3,86 \text{ mm}^2$ . Le deuxième groupe est représenté par le traitement (T<sub>1</sub>) dont la surface moyenne n'excède pas  $18,83 \pm 3,93 \text{ mm}^2$ , quant au troisième groupe, il est représenté par le témoin, avec une surface de  $14,67 \pm 2,94 \text{ mm}^2$  (Fig.14).

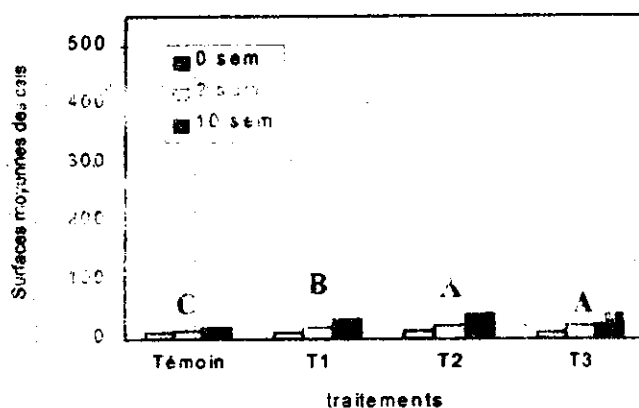


Fig.14 : Evolution de la croissance des cals de racines en fonction de la balance hormonale et du temps ( $F_{obs} = 3.81$ ,  $ddl : 3;20$ ;\*)  
(Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents).

L'évaluation des indices de croissance à 10 semaines de culture montre que ces derniers varient entre 0,97 et 1,01 respectivement pour les traitements (T<sub>2</sub>) et (T<sub>3</sub>) comparativement à l'indice de croissance du témoin qui ne dépasse pas 0,31 (Fig 15)

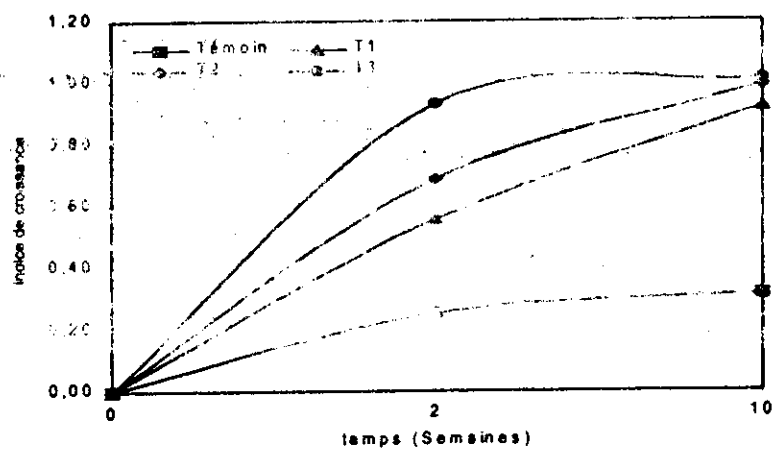


Fig.15 : Evolution des indices de croissance des cals de racines en fonction du temps et de la balance hormonale.

b) Origine et aspect du cal

La formation des cals commence au niveau des sections puis se développe au fur à mesure pour couvrir l'ensemble de l'explant. Ces cals sont translucides et friables.

2.4 Bilan.

Les résultats précédents montrent que le déclenchement et le maintien de la callogenèse nécessitent la présence d'hormone de croissance dans le milieu dont les meilleures balances sont consignées dans le tableau n°10 en fonction du type d'explant.

Tableau 10 : Synthèse des principaux résultats obtenus pour la calli genèse

Explants	Balance hormonale		Surface du cal	Indice de croissance	
	BAP	2,4-D			
Enveloppe séminale	T <sub>3</sub>	9mg/l	1 mg/l	124.166 mm <sup>2</sup>	0.26
	T <sub>1</sub>	4mg/l	1 mg/l	268.66 mm <sup>2</sup>	0.60
	T <sub>2</sub>	6mg/l	1 mg/l	276.50 mm <sup>2</sup>	0.46
Racine	T <sub>3</sub>	9mg/l	1 mg/l	22.166 mm <sup>2</sup>	0.93
	T <sub>2</sub>	6mg/l	1 mg/l	21.50 mm <sup>2</sup>	0.69

Signifions par ailleurs, qu'aucune néoformation de bourgeons n'a été observée, quels qu'ils soient l'origine du cal, le type d'explant et le rapport hormonal utilisé.

### 3- Micropropagation par élongation - fragmentation.

La technique de multiplication par élongation-fragmentation consiste à multiplier le matériel végétal à partir de microboutures (10 à 15 mm de longueur) portant au moins un bourgeon axillaire. Pour cela, le milieu de base utilisé est celui de MURASHIGE et SKOOG (1962) additionné de concentrations croissantes de BAP (Témoin : 0 mg/l; T<sub>1</sub> : 0,25mg/l; T<sub>2</sub> : 0,25mg/l; T<sub>3</sub> : 1mg/l; T<sub>4</sub> : 2mg/l; T<sub>5</sub> : 4mg/l; T<sub>6</sub> : 8mg/l; T<sub>7</sub> : 10mg/l).

Pour évaluer l'effet de ces différentes concentrations, plusieurs paramètres (Nombre de nœuds, élongation, etc.) ont été pris en considération.

#### 3.1 Effet de la Concentration de BAP

##### a) Réactivité des explants

Le nombre d'explants ayant réagi par le débourrement des bourgeons est un paramètre déterminant pour l'évaluation de la réactivité des explants initiaux soumis à la multiplication. Dans nos conditions expérimentales la réactivité des explants utilisés est de 100% quelle que soit la concentration de BAP.

##### b) Nombre moyen de Nœuds

Le nombre de nœuds est cependant très influencé par la concentration de BAP dans le milieu de culture. L'analyse de la variance révèle un effet significatif de ce facteur (nombre de nœuds par explant) à partir de la 3<sup>ème</sup> semaine de culture (Fig.16).

Ainsi, cinq groupes homogènes sont obtenus dont la concentration de 8 mg/l constitue le premier groupe produisant en moyenne  $9.25 \pm 2.28$  nœuds. La concentration la moins favorable est de 0.25 mg/l produisant  $2.5 \pm 1.05$  nœuds par explant.

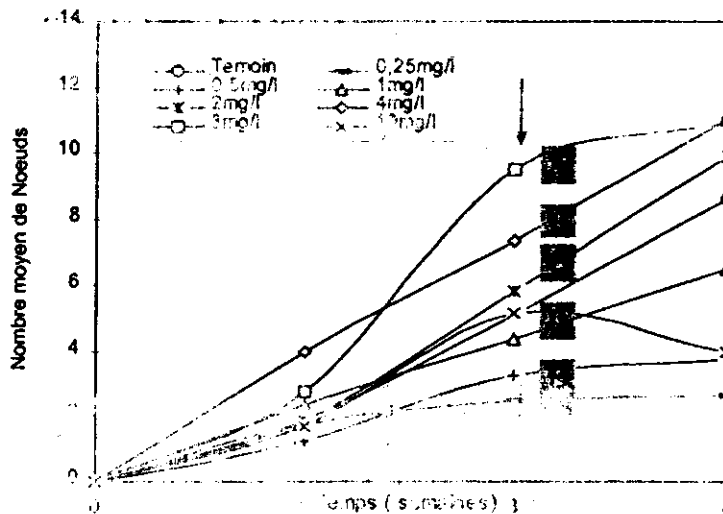


Fig.16 Variation du nombre de nœuds en fonction de la concentration de BAP et du temps. (Obs = 412, 607; 7;54;\*\*\*) (Les traitements portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents).

c) Elongation moyenne des pousses

L'élongation des pousses est un critère exprimant la qualité des explants. C'est donc un paramètre clé pour les cycles de multiplication ultérieurs. L'analyse de la variance n'a révélé des effets significatifs qu'à partir de la 7<sup>ème</sup> semaine de culture. (Fig.17). Le test de la PPDS fait apparaître quatre groupes homogènes. Le meilleur traitement pour ce paramètre est de 4 mg/l de BAP.

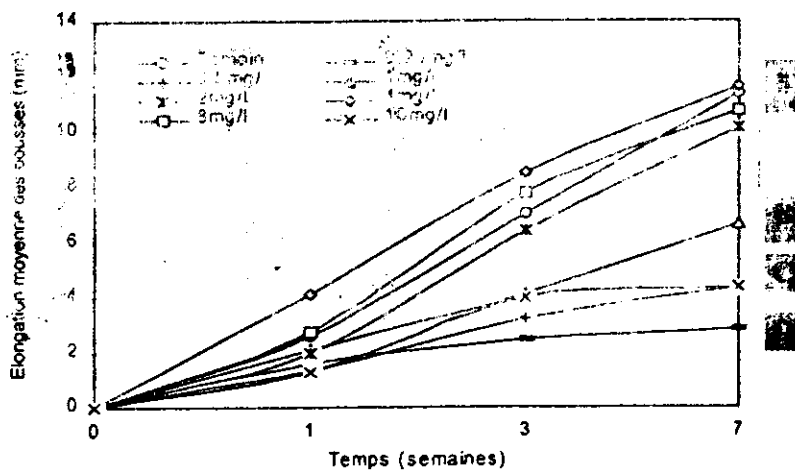


Fig.17: Variation de l'élongation des pousses en fonction de la concentration de BAP et du temps (Fobs =9.72; ddl 7;54.\*). (Les traitements portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents).

d) Nombre de Bourgeons utilisables

Parmi les pousses produites, quelques-unes présentent des entre-nœuds courts qui ne permettent pas leur fragmentation ultérieure en vue d'entreprendre un nouveau cycle de multiplication.

Pour mieux évaluer l'effet de la concentration de BAP, nous nous sommes intéressé au nombre de bourgeons utilisables pour le cycle suivant. La figure N° 18, montre que ce nombre varie de  $8 \pm 2,13$  bourgeons ( $T_6$ ) à  $1,88 \pm 0,86$  pour le traitement ( $T_1$ ). L'analyse de la variance effectuée sur les résultats de la septième semaine montre l'effet très hautement significatif de la concentration de BAP sur la production en bourgeons utilisables. Le test de la PPDS nous permet de dégager quatre groupes homogènes dont le premier est constitué par les traitements  $T_5$  (4 mg/l) et  $T_6$  (8 mg/l)

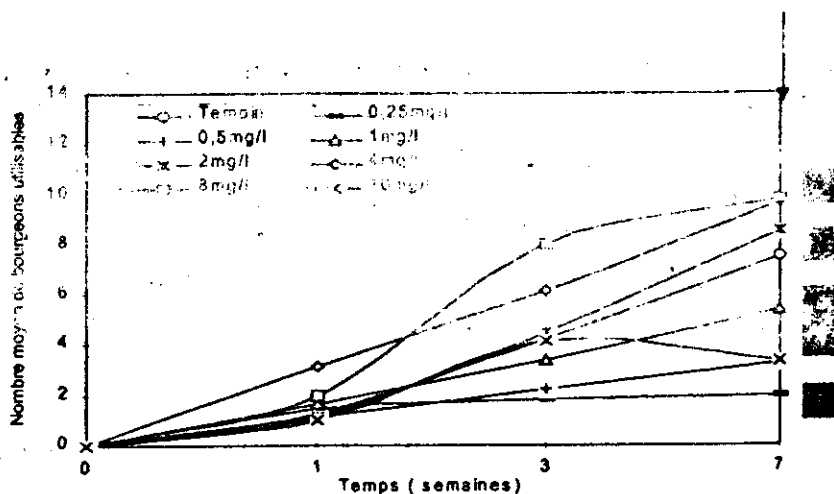


Fig.18: Effet de la concentration de BAP sur le nombre de bourgeons utilisables pour le cycle suivant en fonction du temps (N<sub>0</sub> = 4,39, ddt 7,5111\*) (Les traitements portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents).

e) Pourcentage de callogénèse à la base des explants

Quelle que soit la concentration de BAP appliquée, les explants manifestent une callogénèse à leur base (Fig.19). Près de 100% des explants cultivés dans le milieu contenant 10 mg/l de BAP sont callogènes dont 37,5% présentent un jaunissement foliaire qui affecte considérablement les paramètres étudiés ci-dessus.(Planche.3, Photo.3). D'autre part, il y a lieu de signaler que pour le traitement T<sub>4</sub> (2mg/l), quoi qu'il donne de bons résultats, 12,5% des explants présentent des vitrifications foliaires (Fig.20) (Planche.3, Photo.1).

La taille des cals varie d'un traitement à un autre à 15 mm<sup>2</sup> pour le T<sub>3</sub> (0,5 mg/l) et 50 mm<sup>2</sup> pour le traitement T<sub>7</sub> (10mg/l) ce qui entrave le développement des pousses.

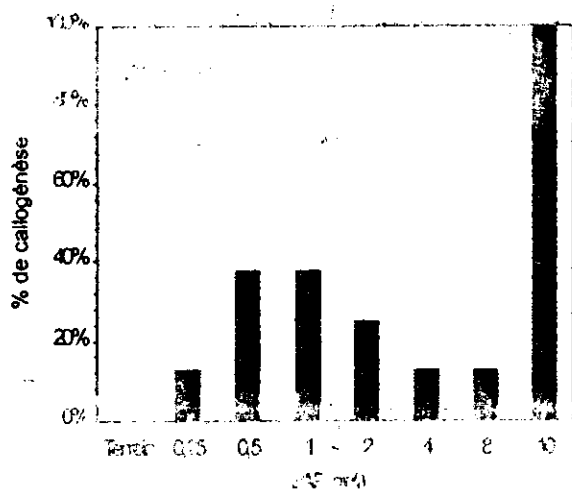


Fig.19 : Effet de la concentration de BAP sur le pourcentage de callogénèse.

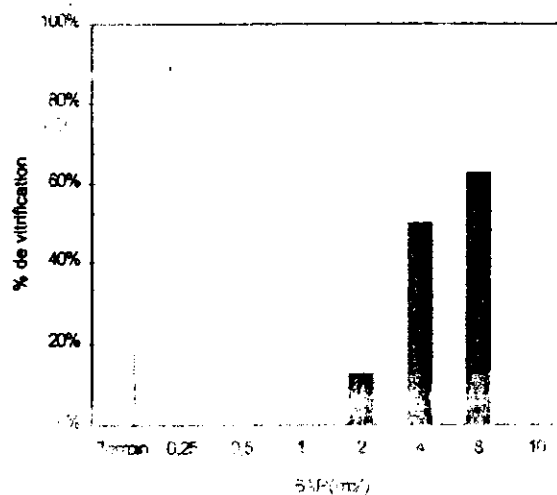


Fig.20 : Effet de la concentration de BAP sur le pourcentage de vitrification.

### 3.2 Effet de la modification macrominérale de MS sur la réactivité des explants.

Les résultats présentés précédemment montrent que les explants cultivés sur le milieu MS et quelle que soit la concentration de cytokinine utilisée, manifestent un faible taux de multiplication. Ce résultat est essentiellement dû au faible développement des entre-nœuds et des anomalies morphologiques survenues lors de la culture.

Pour cela, en se basant sur les travaux effectués sur les chênes (JUNCKER et FAVRE, 1989 in SLAOUI, 1990), nous avons jugé utile de réduire la concentration des macroéléments au demi ( $1/2$ ) et de réduire  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  au quart ( $1/4$ ) sans pour autant changer ni la composition en microéléments, ni la composition vitaminique qui restent celles de MS (Annexe.I). Cependant, seulement quatre concentrations de BAP ont été utilisées :

- Témoin : 0 mg/l
- $T_1$  : 0.25 mg/l
- $T_2$  : 0.5 mg/l
- $T_3$  : 1 mg/l

#### a) - Réactivité des explants

Quelle que soit, la concentration de BAP utilisée, les explants sont réactifs à 100% et ce dès la première semaine de culture. Cette réactivité se manifeste par un débourrement des bourgeons axillaires.

#### b) - Nombre moyen de Nœuds.

Au cours de la septième semaine de culture, le nombre moyen de nœuds varie de  $5,75 \pm 0,72$  nœuds/explant à  $8,50 \pm 3,12$  nœuds/explants respectivement pour le témoin et le traitement  $T_3$  (1mg/l). Cependant, cette variation reste insignifiante (Fig.21).

En effet, l'analyse de la variation effectuée à 3, 7 et 10 semaines de culture révèle un effet non significatif entre les traitements.

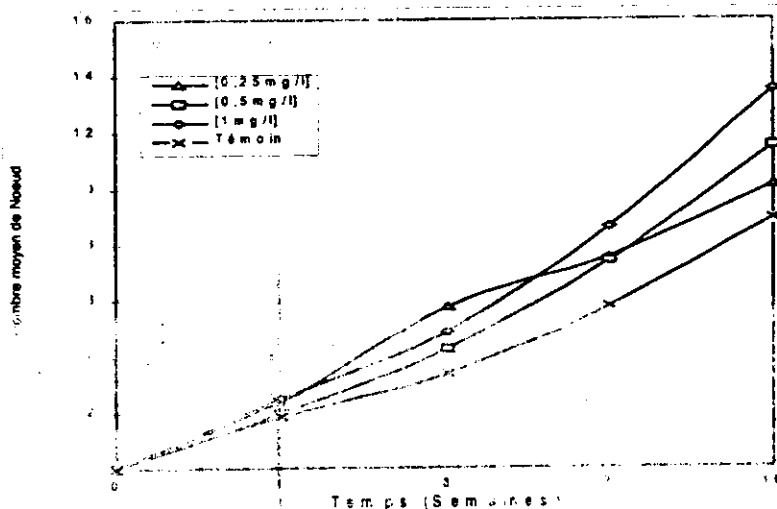


Fig.21: Evolution du nombre de nœuds en fonction du temps en fonction de la concentration de BAP et du temps (Effet non significatif de la concentration de BAP)

c) - Elongation moyenne des pousses

L'élongation moyenne des explants varie de 7,00 à 9,13 mm respectivement pour le témoin et le T<sub>3</sub> (1mg / l). Seulement, l'analyse de la variance ne montre pas cette différence de croissance des explants et ce, quel que soit le traitement appliqué. (Fig.22).

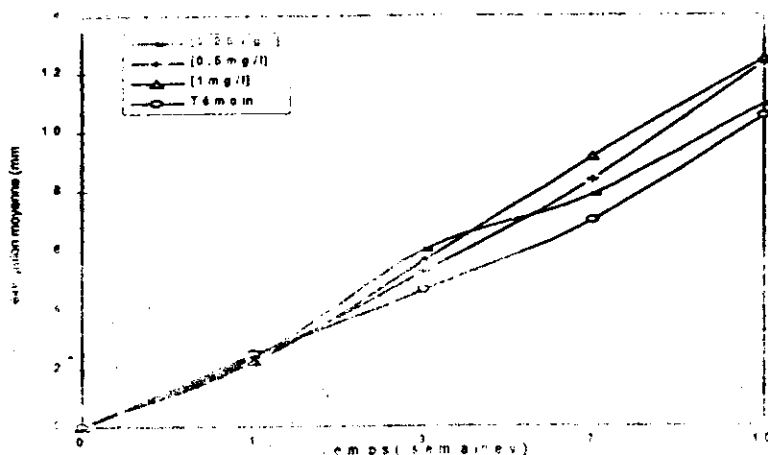


Fig.22: Evolution de l'élongation moyenne des explants en fonction de la concentration de BAP et du temps. (Effet non significatif de la concentration de BAP).

d) - Nombre de bourgeons utilisables (microboutures).

Le nombre de bourgeons est étroitement lié à l'élongation des explants et au nombre de nœuds, plus le nombre de nœuds et l'élongation augmentent et plus le coefficient de multiplication augmente.

Ainsi, après 10 semaines de culture, ce nombre varie de  $7,0 \pm 1,89$  à  $12,38 \pm 5,47$  microboutures par explant respectivement pour le témoin et le traitement T<sub>3</sub> (1mg/l) (Fig.23). Cependant, l'analyse de la variance s'est révélée non significative.

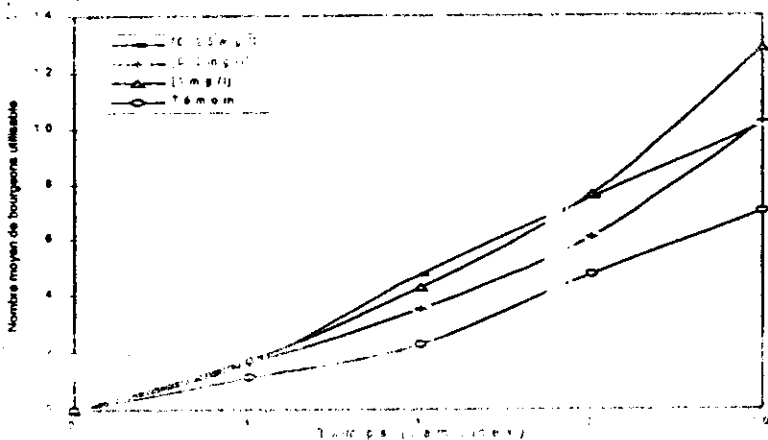


Fig.23: Evolution du nombre de microboutures utilisables pour le cycle suivant en fonction de la concentration de BAP et du temps. (Effet non significatif de la concentration de BAP)



### e)- Callogenèse à la base des explants.

L'induction d'un bourgeonnement axillaire sur le milieu MS modifié et additionné de différentes concentrations de BAP, s'est montré favorable à la formation de cals. En effet, près de 75 % des explants cultivés sur ce milieu contenant 1 mg/l de BAP, développent des cals dont les dimensions varient de 2 mm<sup>2</sup> à 30 mm<sup>2</sup>.

Cependant, pour le traitement T<sub>2</sub> (0,5mg/l) près de 88% des explants développent des cals de diverses dimensions ( 6 mm<sup>2</sup> à 20 mm<sup>2</sup> ). Ce taux est beaucoup moins important pour le traitement T<sub>1</sub> (0,25mg/l) et le témoin dont les pourcentages de callogenèse sont respectivement de 50% et 12,5% (Fig.24).

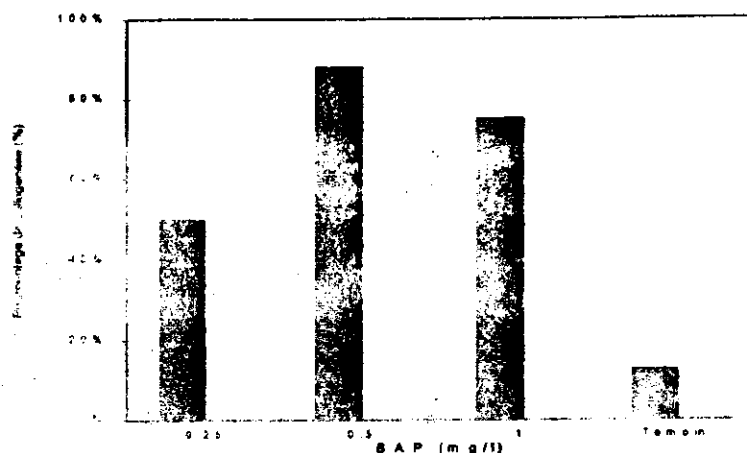


Fig.24: Effet de la concentration de BAP sur le pourcentage de callogenèse à la base des explants

### 3.3 Effet des concentrations optimales en BAP associées aux deux milieux de culture MS et MS modifié.

Le choix du milieu de culture se justifie par l'obtention de vitroplants de bonne qualité (élongation, morphologie des folioles). Les études menées précédemment et de manière indépendante d'une part sur les concentrations croissantes de BAP et d'autre part sur la composition minérale ont montré des effets significatifs sur l'ensemble des paramètres considérés.

En se basant sur ces conclusions, il nous a semblé utile d'étudier les effets combinés des meilleures concentrations en BAP (0.25; 0.5 et 1 mg/l) associées aux deux milieux de culture (MS et M<sub>2</sub>).

#### a) Nombre moyen de bourgeons

Mis à part le témoin, la dilution des macro-éléments, entraîne une nette amélioration du nombre de bourgeons qui double pour certaines concentrations de BAP (T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>) (Fig.25). Cette dilution s'accompagne d'une réduction et d'une diminution du nombre de jaunissements des feuilles (Planche 3; Photo.2).

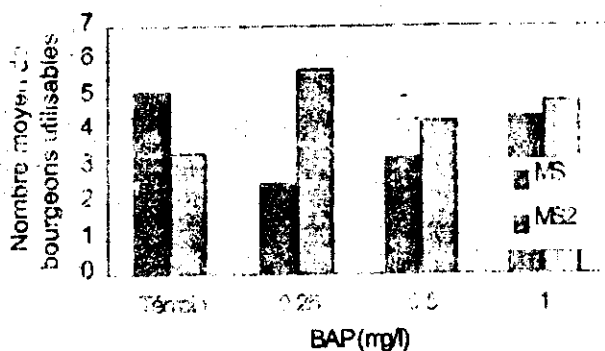


Fig.25: Effet de la concentration de BAP et de la composition minérale du milieu sur le nombre de nœuds après 7 semaines de culture.

b) Élongation moyenne des pousses

Comparativement au milieu MS, le milieu MS<sub>2</sub> améliore considérablement l'élongation des explants. Ainsi, pour 0.25 mg/l de BAP, les explants cultivés sur les milieux MS et MS<sub>2</sub> présentent des élongations respectives de  $2.50 \pm 0.82$  mm et  $7.88 \pm 2.16$  mm, et ce, à 7 semaines de culture. Cette différence dans l'élongation des pousses est également observée pour les autres traitements. Donc, mis à part le témoin, le milieu MS<sub>2</sub> améliore nettement ce paramètre (Fig.26).

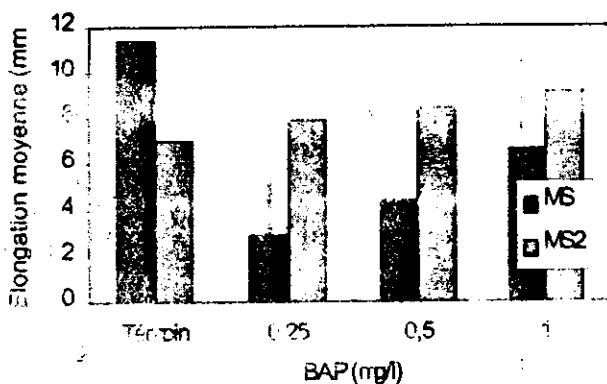


Fig.26: Effet de la concentration de BAP et de la composition minérale du milieu sur l'élongation des explants après 7 semaines de culture.

c) Nombre moyen de bourgeons utilisables (microboutures)

Avec la concentration de 0.25 mg/l de BAP, les explants cultivés sur le milieu MS<sub>2</sub> donnent deux fois plus de bourgeons utilisables que sur le milieu MS. Globalement, le milieu MS<sub>2</sub> agit donc positivement aussi bien sur le nombre que sur la qualité (Absence de vitrification) (Fig.27).

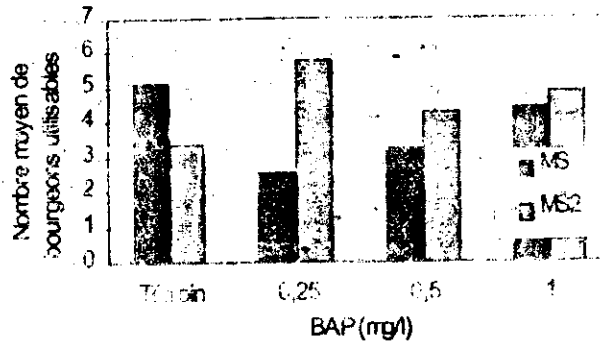


Fig.27: Effet de la concentration de BAP et de la composition minérale du milieu sur le rendement en bourgeons utilisables après 7 semaines de culture.

### 3.1.3. Résultats

Malgré l'effet positif du milieu MS<sub>2</sub> associé à la meilleure concentration en BAP (1mg/l) sur l'ensemble des paramètres étudiés, le coefficient de multiplication reste insuffisant. Ce milieu favorise en outre l'apparition d'un taux élevé de callogenèse à la base des explants, ce qui a entravé considérablement le développement normal des vitopiants.

Pour cela, nous nous sommes intéressé à tester une autre méthode de multiplication habituellement appliquée aux résineux : Multiplication par hyper-ramification associée dans notre cas à une élongation-fragmentation.

#### 4-Multiplication par hyper-ramification et élongation-fragmentation

La technique de multiplication par hyper-ramification est plutôt courante chez les résineux. Elle consiste à induire le développement des ramifications à la suite de la suppression de la dominance apicale (KHELIFI, 1986 ; KHELIFI, 1990).

Dans notre cas, pour induire cette hyper-ramification, nous avons également supprimé le bourgeon apical de l'épicotyle ainsi que la partie racinaire. Ceci a permis le démarrage des bourgeons axillaires qui se développent par la suite en autant de pousses directement utilisables pour la multiplication. L'appréciation de l'efficacité de la combinaison multiplication par hyper-ramification et élongation-fragmentation a été faite par l'étude de plusieurs paramètres sur le milieu MS<sub>2</sub> sans BAP.

##### a) Réactivité des vitrosemis

La réactivité des vitrosemis est de 100% et ce dès la première semaine de culture. Cette réactivité se manifeste par le démarrage des bourgeons axillaires favorisé par la suppression de la dominance apicale. Les microboutures prélevées directement sur les pousses qui démarrent à partir des bourgeons axillaires, préexistants à la base des cotylédons, réagissent à 100% dès leur mise en culture.

##### b) Nombre moyen de nœuds

Au cours de la première semaine de culture, les vitrosemis hyper-ramifiés produisent en moyenne  $2.77 \pm 0.24$  nœuds. Ce nombre augmente après cinq semaines de culture pour atteindre  $10.3 \pm 0.84$  nœuds par vitrosemis, et passe par la suite à  $23.15 \pm 6.18$  nœuds après 10 semaines de culture (Fig.28)

##### c) Élongation moyenne des pousses

Les vitrosemis hyper-ramifiés présentent généralement plus de deux ramifications, qui atteignent en moyenne  $3.77 \pm 1.68$  mm durant la première semaine de culture et continuent de croître jusqu'à  $21.91 \pm 5.00$  mm à la douzième semaine de culture (Fig.29 ; Planche.3, Photo.4 & 5).

##### d) Nombre moyen de bourgeons utilisables (microboutures)

À cinq semaines de culture, le nombre de bourgeons utilisables atteint  $8.77 \pm 1.09$  bourgeons par vitrosemis. Ce nombre augmente après douze semaines de culture jusqu'à  $21.3 \pm 0.63$  bourgeons par vitrosemis (Fig.30).

#### 5 – Bilan général (partie multiplication)

A travers les résultats obtenus précédemment, la technique d'hyper-ramification des vitrosemis associée à l'élongation-fragmentation (culture sur le milieu MS<sub>2</sub> = H) s'est avérée très intéressante pour lancer une micropropagation. Pour mieux évaluer les performances de cette nouvelle technique de multiplication, nous avons comparé ses résultats avec ceux de la technique d'élongation-fragmentation (culture sur le milieu MS<sub>2</sub> + 1mg/l BAP = T : meilleurs résultats de la partie précédente). L'étude a porté sur les mêmes paramètres que précédemment :

**a) Nombre moyen de nœuds**

L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus à la dixième semaine de culture, présente un effet significatif sur le nombre de nœuds. Le test de la PPDS confirme cet effet en révélant la présence de deux groupes différents : le premier est constitué de la technique (H) avec  $23.15 \pm 6.13$  nœuds par vitrosemis et le deuxième par la technique (T) avec  $13.5 \pm 5.59$  nœuds par vitrosemis (Fig.28).

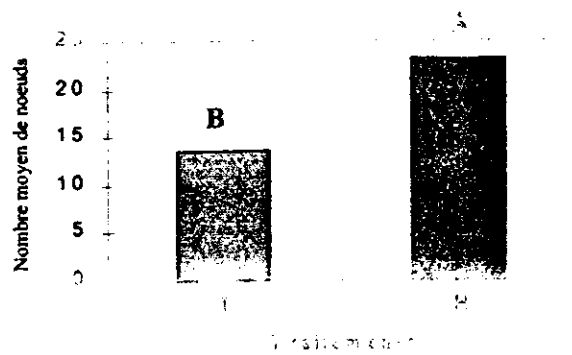


Fig.28 Effet de la méthode de multiplication sur le rendement en nœuds à 10 semaines de culture. (Fobs = 4.35, ddl: 1; 19, \*).  
(Les traitements portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents).

**b) Elongation moyenne des pousses**

L'élongation des pousses, constitue le principal avantage de la technique de multiplication par hyper-ramification associée à l'élongation-fragmentation. En effet, les vitrosemis hyper-ramifiés produisent de nouvelles pousses ayant des entre-nœuds suffisamment allongés pour produire un grand nombre de microboutures (Planche.3, Photo.4).

L'analyse de la variance effectuée sur les résultats de la 10 semaines de culture permet en évidence un effet très hautement significatif sur l'élongation des pousses. Le test de la PPDS révèle deux groupes dont le premier est représenté par la technique (H) offrant en moyenne de  $21.91 \pm 5.00$  mm, comparativement au deuxième groupe (T) avec une élongation moyenne  $12.44 \pm 2.81$  mm (Fig.29).

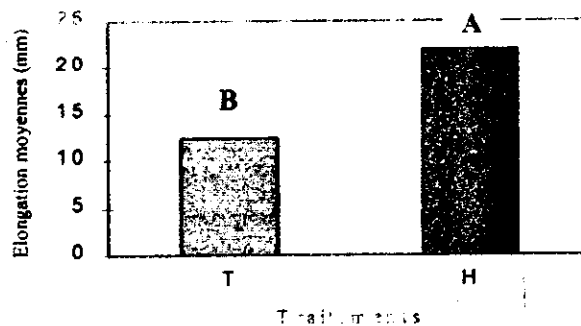


Fig.29 Effet de la technique de multiplication sur l'élongation des pousses à 10 semaines de culture. (Fobs = 7.45, ddl: 1; 12, \*\*\*) (Les traitements portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents).

c) Nombre de bourgeons utilisables (microboutures)

Le nombre de bourgeons utilisables pour le cycle suivant est étroitement lié à l'élongation des pousses et le nombre de nœuds. En effet, plus la pousse est allongée et le nombre de nœuds élevé, plus le rendement en microboutures augmente permettant d'avoir un coefficient de multiplication optimal (Planche.3, Photo.4).

L'analyse de la variance effectuée sur les résultats obtenus à dix semaines de culture, montre l'effet très significatif de la méthode de multiplication sur le rendement en bourgeons utilisables. Le test de la PPDS, révèle deux groupes dont le premier est représenté par la technique de multiplication (H), qui offre  $21.3 \pm 5.91$  microboutures et le deuxième par le traitement (T), offrant  $12.38 \pm 5.47$  (Fig.30).

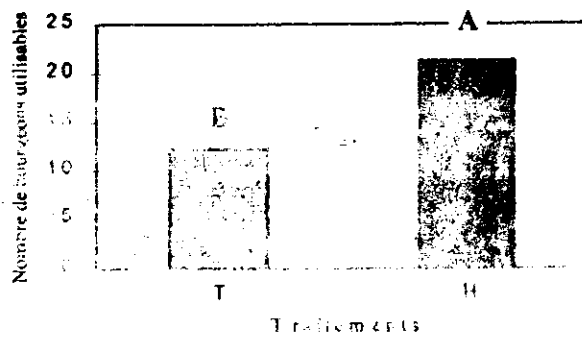


Fig 30 Effet de la technique de multiplication sur le rendement en bourgeons utilisables à 10 semaines de culture. (Fobs =4.04,ddl ; 1;19,\*) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents).

6 - Conclusion

La nouvelle technique de multiplication par hyper-ramification permet d'obtenir directement des pousses allongées utilisables pour le cycle de multiplication suivant. De plus, cette technique, nous permet d'éviter le problème de la callogenèse à la base des explants, tout en maintenant un stock permanent en microboutures car nous avons remarqué qu'à chaque prélèvement de pousses, il y a de nouvelles qui prennent naissance sur le vitrosemis de départ.

Sur la base de ces résultats, nous proposons donc le schéma suivant pour la micropropagation de l'arganier (Fig.31).

Résultats et Interprétations

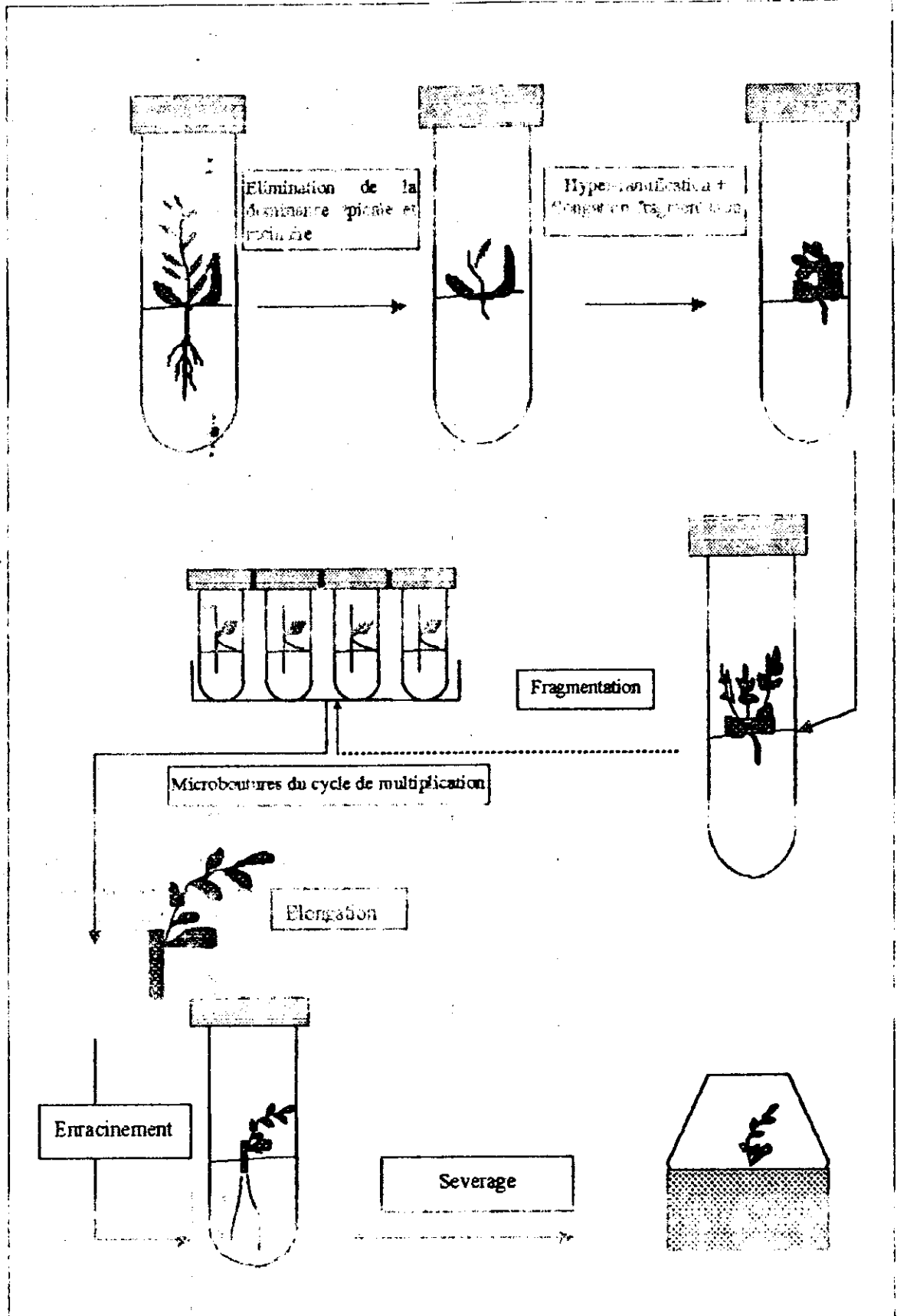


Fig. 42. Schéma proposé pour la micro-propagation de l'agave.



C: Cal  
 V: Vitrification  
 S: Développement de tiges  
 R: Développement de racines

1. Aspect des explants développés sur le milieu MS + 8 mg/l de BAP (+ trioléolone).
2. Aspect des explants développés sur le milieu MS modifié (1 mg/l de BAP).

3. Callogenèse et jaunissement des explants (Milieu MS + 10 mg/l).
- 4, 5, 6. Types de modifications des explants.

Planche.3 : Illustration de quelques phénomènes visibles en phase de multiplication



## 7 - Enracinement

### 7.1 Effet de l'AIB sur l'enracinement

Pour l'induction de la rhizogenèse sur les vitroplants produits précédemment, le milieu de culture utilisé est MS<sub>2</sub>, additionné de différentes concentrations d'AIB :

- Témoïn (0 mg/l);
- T<sub>1</sub> (1 mg/l);
- T<sub>2</sub> (2 mg/l);
- T<sub>3</sub> (4 mg/l);
- T<sub>4</sub> (6 mg/l).

Pour évaluer l'effet de ces concentrations d'AIB sur l'intensité et la qualité de l'enracinement, plusieurs paramètres ont été pris en considération :

#### a) Réactivité des explants.

La réactivité des explants durant la phase d'induction de la rhizogenèse, est évaluée par l'entrée en activité des bourgeons axillaires. Les résultats obtenus montrent que près de 87,5% des explants réagissent dès la première semaine de culture pour se stabiliser à 100% la semaine suivante, et ce, quel que soit le traitement utilisé, y compris le témoin (0 mg/l) (Fig.32).

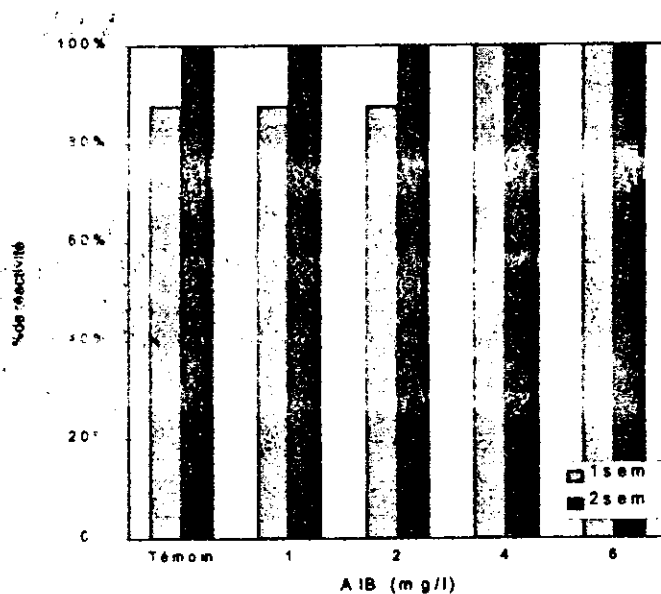


Fig 32 Variation de la réactivité des explants en fonction de la concentration d'AIB et du temps

#### b) Pourcentage d'enracinement

L'utilisation de l'AIB s'est avérée indispensable à l'enracinement des vitroplants. En effet, en présence de cette hormone, 12,5 % à 36 % des explants s'enracinent contre 0 % en son absence.

Le meilleur résultat est obtenu avec la concentration de 1 mg/l d'AIB (Fig.33).

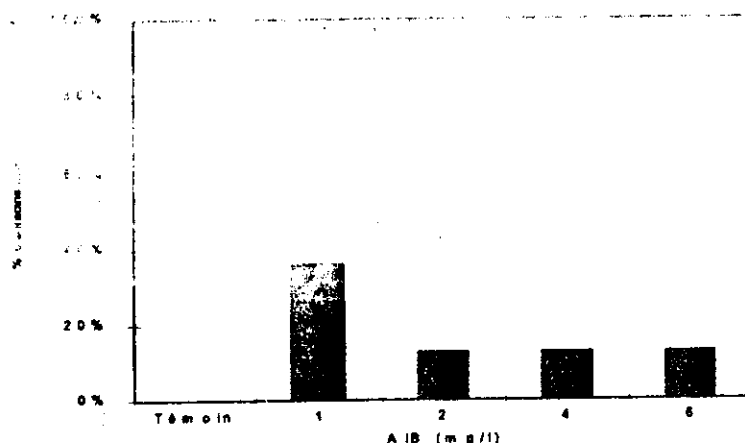


Fig.33 : Influence de la concentration d'AIB sur le pourcentage d'enracinement des explants après 15 semaines de culture

c) Nombre moyen de racines par explant.

Pour les explants enracinés, le nombre moyen de racines par explant est de 1, quelle que soit la concentration d'AIB utilisée. Ceci montre que l'AIB agit plus sur le déclenchement de la rhizogenèse que sur l'intensité de celle-ci.

d) Nombre moyen de nœuds par explant

Le nombre moyen de nœuds produit par explant varie d'une concentration à une autre. Pour une concentration de 1 mg/l les explants produisent en moyenne  $2.13 \pm 1.20$  nœuds, contre  $1.6 \pm 0.5$  pour les traitements  $T_3$  et  $T_4$  et ce à deux semaines de culture. (Fig.34).

L'analyse de la variance effectuée à six semaines de culture, montre un effet très hautement significatif de la concentration d'AIB sur le nombre moyen de nœuds par explant. En effet, le test de la PPDS révèle trois groupes homogènes, dont le premier est représenté par le traitement  $T_1$  et le témoin, le deuxième groupe est constitué par le traitement  $T_3$ , par contre le troisième englobe les deux autres traitements à savoir le  $T_4$  et  $T_2$ .

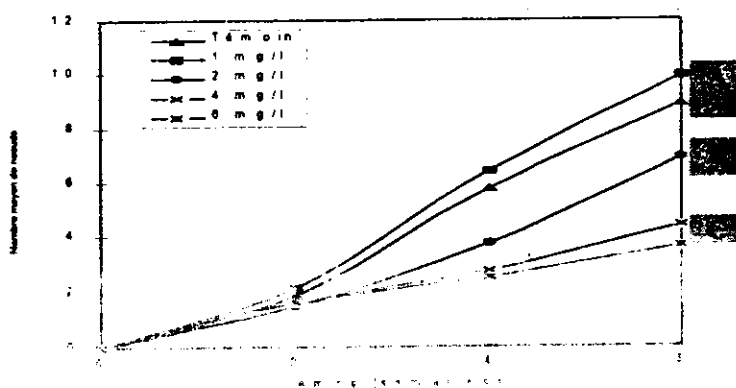


Fig.34 : Variation du nombre de nœuds par explant en fonction de la concentration d'AiB et du temps. (F<sub>0,05</sub>=8,72 ddl:4 35, \*\*\*) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents).



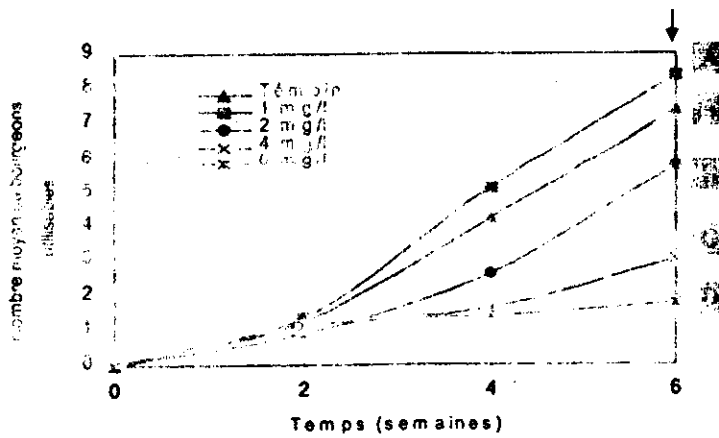


Fig.36 : Variation de nombre de bourgeons utilisables en fonction de la concentration d'AIB et du temps. (Fobs=11.69 ddl:4;35,\*\*\*) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents)

### g) Callogénèse à la base des explants

La formation de cals à la base des explants mis en culture pour induire l'enracinement, a considérablement entravé la croissance des plantules.

Cependant, l'apparition de ces cals n'est visible que sur les explants cultivés sur des milieux contenant 2 mg/l, 4 mg/l et 6 mg/l d'AIB. Avec ces concentrations, le pourcentage de callogénèse est respectivement de 25 %, 37.5 % et 50 % (Fig.37). En présence de 1 mg/l aucun cal n'est observé, ce qui influence positivement la qualité des racines produites.

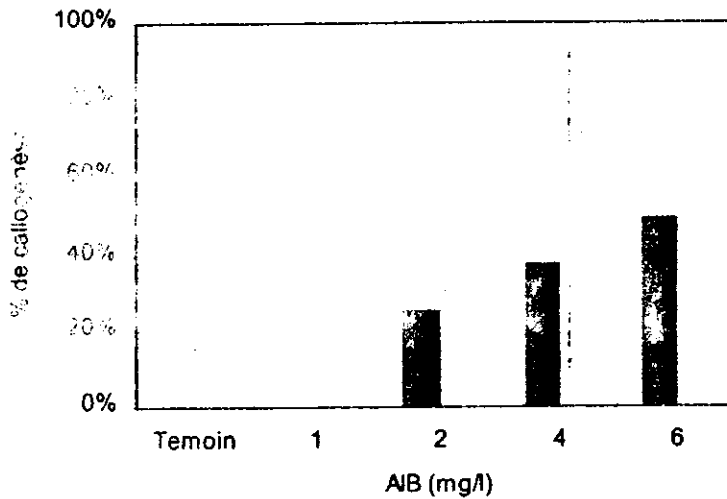


Fig.37: Evolution du taux de callogénèse en fonction des concentrations d'AIB.

### 7.1.1 Bilan

L'utilisation de l'AIB à des différentes concentrations, induit l'enracinement des explants et nous permet de tirer les conclusions suivantes (tableau 11) :

Résultats et Interprétations

- L'AIB influe considérablement sur le nombre moyen de nœuds produits par explant et dont les meilleurs résultats sont obtenus en présence de T<sub>1</sub> (1 mg/l) et du témoin.
- Aucun effets sur l'élongation, le témoin donne donc les meilleures elongations des pousses.
- Cependant, l'AIB influe sur le nombre moyen de bourgeons utilisables par explant. Les meilleurs résultats sont obtenus sur des explants en présence de T<sub>1</sub> (1 mg/l) et du témoin.
- La présence de cals à la base des explants en présence de 2 à 6 mg/l d'AIB.

En se basant sur ce bilan, nous avons retenu la concentration de 1 mg/l (T<sub>1</sub>) pour la suite de l'expérimentation.

Tableau.11 : récapitulatif des principaux résultats obtenus

Traitements	Paramètres étudiés				
	Enracinement	Nb. nœuds	Elongation	Nb. Brg. utilisables	Callogenèse
Témoin (0 mg/l)	-	++	++	++	-
T <sub>1</sub> (1 mg/l)	+	++	±	++	-
T <sub>2</sub> (2 mg/l)	±	+	+	±	±
T <sub>3</sub> (4 mg/l)	±	±	±	+	±
T <sub>4</sub> (6 mg/l)	+	±	+	±	+

(-) Absence      (+) Faible      (++) Moyen      (±) Elevé

## 7.2 Effet d'une combinaison d'auxines

Nous avons repris la meilleure concentration d'AIB (1mg/l) de l'expérience précédente que nous avons associée à une gamme de concentration d'ANA. Signalons, que ce type d'association auxinique est souvent recommandé pour la rhizogenèse *in vitro* chez les feuillus (BADJI *et al.*, 1991). Les traitements testés sont les suivants :

- Témoin : 1mg/l d'AIB et 0mg/l d'ANA,
- T<sub>1</sub> : 1mg/l d'AIB et 0.5mg/l d'ANA,
- T<sub>2</sub> : 1mg/l d'AIB et 1mg/l d'ANA,
- T<sub>3</sub> : 1mg/l d'AIB et 1.5mg/l d'ANA,

Le milieu de culture utilisé reste celui de MS<sub>2</sub> sans le charbon actif.

### a) Pourcentage d'enracinement.

L'induction de la rhizogenèse varie en fonction des combinaisons auxiniques appliquées. Les explants soumis au témoin présentent un enracinement de 36 %, contrairement à ceux du traitement T<sub>3</sub> (1mg/l d'AIB et 1.5mg/l d'ANA) et T<sub>2</sub> (1mg/l d'AIB et 1mg/l d'ANA) qui offrent respectivement 29 % et 19 % d'enracinement à 12 semaines de culture.(Fig.38).

Les explants enracinés développent à leurs bases des cals de couleur brune, sur lesquels des racines néoformées prennent naissance. Ces dernières sont fines et nombreuses (jusqu'à 21 racines néoformées par explant). Leur développement est tout à fait normal (quelques cm en quelques semaines : Planche.4;Photos.3,6 & 8).

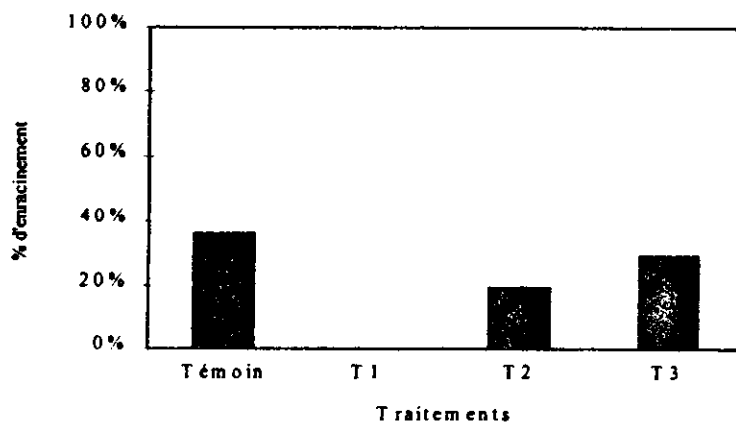


Fig.38 : Variation du taux d'enracinement en fonction des traitements auxiniques appliqués

### b) Réactivité des explants

A deux semaines de culture, les explants soumis au traitement T<sub>3</sub> réagissent à 100% (débourrement des bourgeons). Cependant, pour le témoin et les traitements (T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>) la réactivité des explants est respectivement de 83%, 47% et 69%. Ces taux de réactivité passent à 100% à la quatrième semaine. (Fig.39).

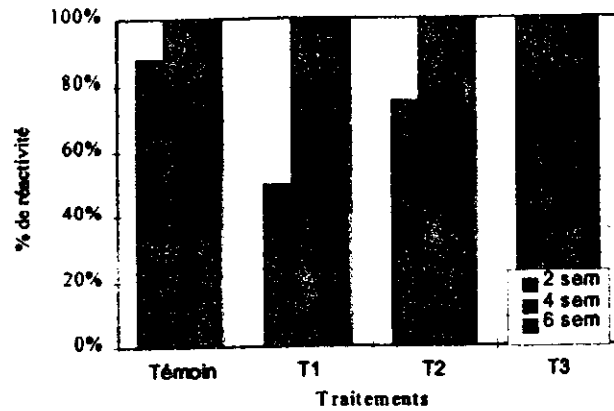


Fig.39 : Taux de réactivité des explants en fonction des traitements auxiniques appliqués

**c ) Nombre moyen de nœuds par explants**

Dès la deuxième semaine de culture, le nombre de nœuds varie en fonction des traitements appliqués. En effet, ce nombre varie de  $0.62 \pm 0.52$  à  $4.38 \pm 1.57$  nœuds par explant, respectivement pour les traitements T<sub>1</sub> et T<sub>3</sub>. A la quatrième semaine, où tous les explants sont réactifs, le nombre de nœuds atteint  $3.37 \pm 1.28$  et  $13 \pm 7.72$  respectivement pour T<sub>1</sub> et T<sub>3</sub> (Fig.40).

L'analyse de la variance effectuée à six semaines de culture met en évidence, l'effet très hautement significatif des traitements appliqués sur le nombre de nœuds. La comparaison des moyennes à travers le test de PPDS révèle deux groupes homogènes dont le premier est constitué par le traitement T<sub>3</sub> et le second regroupe le témoin et les traitements T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>.

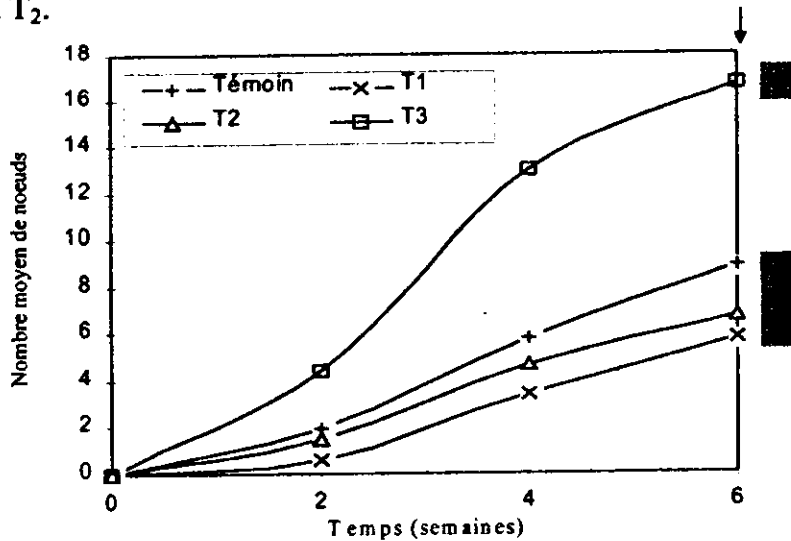


Fig.40 :Evolution du nombre de nœuds en fonction des traitements auxiniques et du temps ( $F_{obs} = 5.07; d.d.l: 3; 28, ***$ ) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents)

**d-) Elongation moyenne des pousses**

A quatre semaines de culture, les microboutures atteignent une élongation moyenne de  $2.62 \pm 0.63$  mm et  $15 \pm 4.96$  mm respectivement T<sub>1</sub> et T<sub>3</sub> (Fig.41). Cette

faible élongation des pousses observées peut être expliquée par la formation des cals, de dimension parfois importante, à la base des explants; ce qui entrave considérablement leur élongation.

L'analyse de variance (résultats de la quatrième et la sixième semaine) ne révèle pas d'effet significatif de la combinaison auxinique sur le développement des explants.

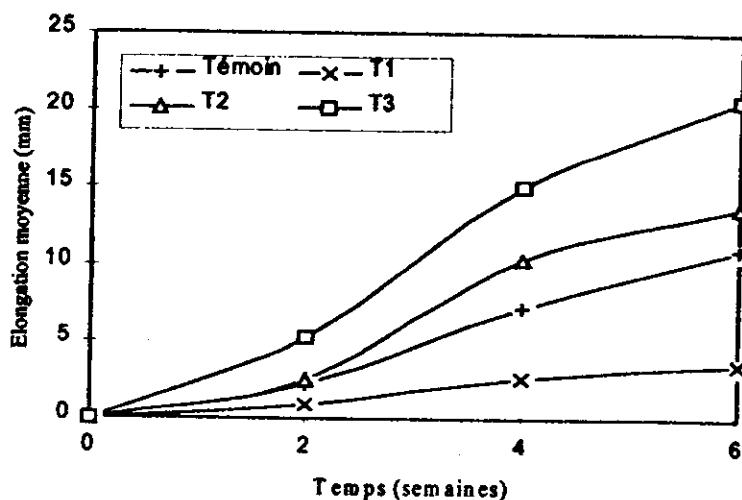


Fig.41 : Evolution de l'élongation des explants en fonction des traitements auxiniques appliquée et du temps. (Effet non significatif).

#### e) Nombre moyen de bourgeons utilisables (microboutures)

L'évolution du nombre de bourgeons utilisables est également influencé par la combinaison auxinique appliquée. Le traitement T<sub>3</sub> ( $11.25 \pm 7.59$  bourgeons par explant), donne 4 fois plus de bourgeons que le T<sub>1</sub> ( $2.25 \pm 1.03$  bourgeons par explant) au bout de quatre semaines de culture, (Fig.42).

L'analyse de la variance effectuée à 6 semaines de culture montre un effet significatif de la combinaison auxiniques sur le rendement en bourgeons utilisables destinés au cycle de multiplication suivant. En effet, la comparaison de moyennes par le test de la PPDS, met en évidence deux groupes homogènes dont le premier est représenté par le traitement T<sub>3</sub> et le deuxième groupe englobe les autres traitements (T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>) et le témoin.

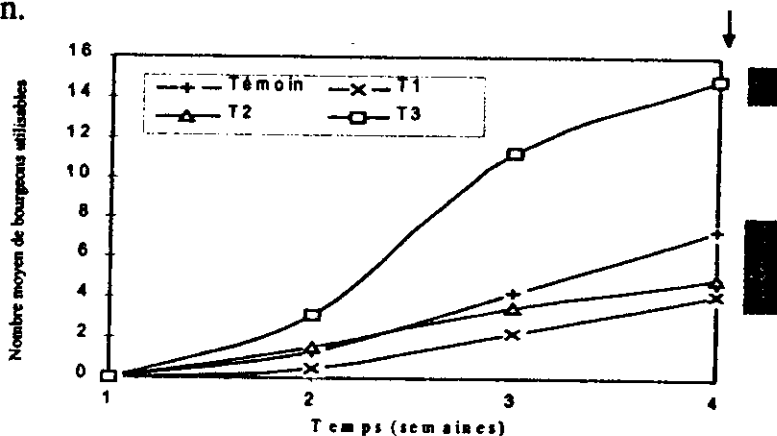


Fig.42 : Evolution du nombre de bourgeons en fonction des traitements auxiniques et du temps ( $F_{obs} = 5.17; d.d.l.: 3; 28, *$ ) (Les traitements portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents)



f) Callogénèse à la base des explants

Mis à part le témoin, quelle que soit, la combinaison auxinique appliquée, les explants manifestent une callogénèse à leurs bases. Les cals ainsi développés sont bruns et compacts. Le pourcentage de callogénèse varie cependant de 62.8 % à 100% respectivement pour les traitements T<sub>3</sub> et T<sub>1</sub>. Leurs dimensions respectives sont de 71.4 mm<sup>2</sup> et 88.4 mm<sup>2</sup> (Fig.43 et 44). Ces cals sont souvent le siège d'une rhizogénèse (néoformation racinaires) intense

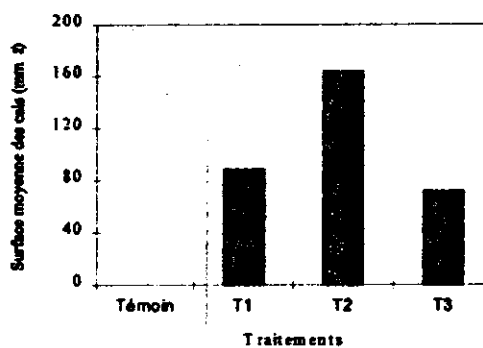
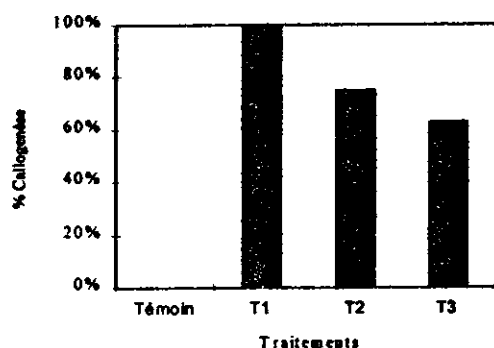


Fig.43 : Variation du pourcentage de callogénèse en fonction des traitements auxiniques appliqués.

Fig.44 : Evolution de la surface moyenne des cals en fonction des traitements auxiniques appliqués

7.2.1 Bilan

Les résultats obtenus, concernant l'effet des différentes combinaisons auxiniques montrent à travers les paramètres étudiés, que le T<sub>3</sub> (1mg/l d'AIB et 1.5mg/l d'ANA), offre les meilleurs résultats en terme d'intensité d'enracinement (21 racines néoformées par explant). Cependant, la fragilité de ces racines entrave l'acclimatation des vitroplants. Ainsi, le témoin (1 mg/l d'AIB) sera maintenu pour la suite de l'expérimentation

Tableau.12 : Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus

Traitements	Paramètres étudiés				
	Enracinement	Nb. noeuds	Elongation	Nb. Brg. utilisables	Callogénèse
Témoin	-	±	-	±	++
T <sub>1</sub>	-	±	-	±	++
T <sub>2</sub>	±	±	-	±	++
T <sub>3</sub>	±	++	-	++	++

(-) absence      (±) faible      (+) moyen      (++) bonne

### 7.3 Effet du charbon actif.

Afin d'évaluer l'influence du charbon actif sur le développement et l'enracinement des vitroplants, nous en avons testé plusieurs concentrations (Témoin : 0 g/l; T<sub>1</sub>: 1 g/l; T<sub>2</sub>: 5 g/l; T<sub>3</sub>: 10 g/l; T<sub>4</sub>: 15 g/l; T<sub>5</sub>: 20 g/l) dans le milieu de culture MS<sub>2</sub> sans hormones de croissance.

#### a) Pourcentage d'enracinement

Quelle que soit la concentration de charbon actif appliquée, les explants ne manifestent aucun enracinement. Cependant, pour certaines concentrations (T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>), le charbon actif améliore la qualité (aspect morphologique : folioles plus étalées, plus vertes et aucun signe de vitrification) des explants.

#### b) Réactivité des explants

La réactivité des explants constitue l'élément clé pour le choix du milieu de rhizogenèse. Pour ces traitements T<sub>1</sub> (1 g/l) et le T<sub>5</sub> (20 g/l), la réactivité des explants est de 100 %. Pour les autres traitements, ce taux varie de 83,33 % pour le traitement T<sub>2</sub> (5 g/l) et le témoin, à 50 % pour les traitements T<sub>3</sub> (10 g/l) et T<sub>4</sub> (15 g/l) et ce, pendant la première semaine de culture.

Cependant, pour certaines concentrations de charbon actif ce taux tend à diminuer : cas des traitements T<sub>4</sub> et T<sub>5</sub> (Fig.45) à cause des nécroses survenues en fin de culture.

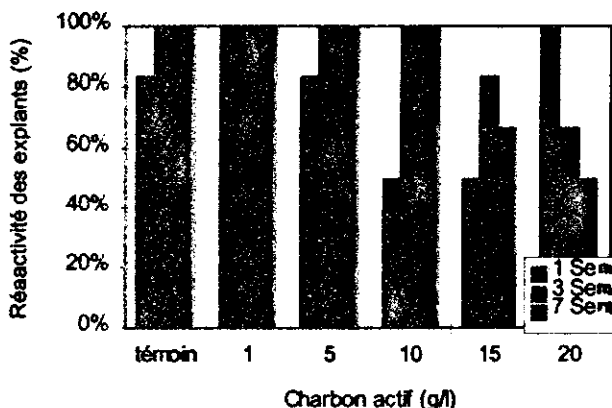


Fig.45 : Evolution du pourcentage de réactivité des explants en fonction de la concentration du charbon actif et du temps

#### c) Nombre moyen de Nœuds par explant

Le nombre de nœuds produits par explant varie en fonction de la concentration de charbon actif. En effet, à sept semaines de culture, ce nombre atteint  $1,50 \pm 1,58$  nœuds par explant et  $7,17 \pm 1,63$  nœuds respectivement pour les traitements T<sub>4</sub> (15 g/l) et le traitement T<sub>1</sub> (1 g/l). Cette différence traduit l'influence du charbon actif sur le développement des explants. (Fig.46).

L'analyse de la variance établie sur les résultats de la septième semaine de culture montre un effet très hautement significatif du charbon actif sur le nombre de nœuds. Le teste de la PPDS, montre trois groupes homogènes.

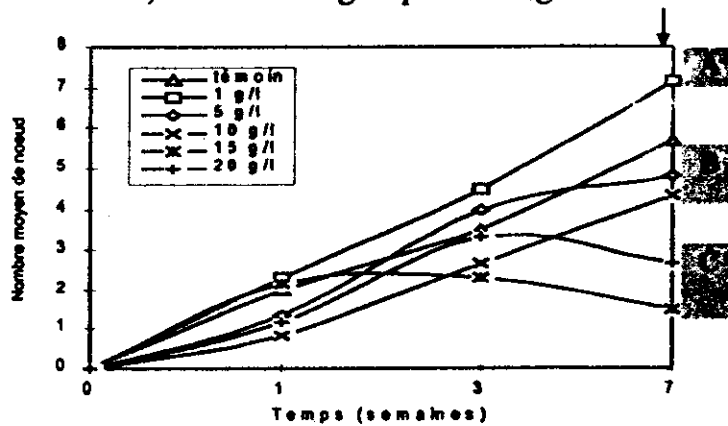


Fig.46 : Evolution du nombre moyen de nœuds en fonction de la concentration du charbon actif et du temps (Fobs :6.20;ddl:5,30;\*\*\*)  
(Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents)

d ) Elongation moyenne des explants

Seules le traitement (T<sub>1</sub>) et le témoin offrent une élévation appréciable respectivement de l'ordre de 11,3 ± 1,43 mm et 10,3 ± 0,97 mm. Quant aux autres traitements, l'élévation des microboutures n'excède pas 5,67 ± 1,68 mm et 4,33 ± 0,84 mm respectivement pour les traitements (T<sub>4</sub>) et (T<sub>5</sub>), les plus faibles élévations ont été enregistrées avec les traitements (T<sub>2</sub>) et (T<sub>3</sub>) avec respectivement 2,33± 0,72 mm et 2,50 ± 0,73 mm et ceci à sept semaines de culture.

L'analyse de la variance s'est révélée significative pour le paramètre étudié. En effet, le test de la PPDS, nous a permis de distinguer trois groupes homogènes. (Fig.47) dont le premier est formé du témoin et de T<sub>1</sub>.

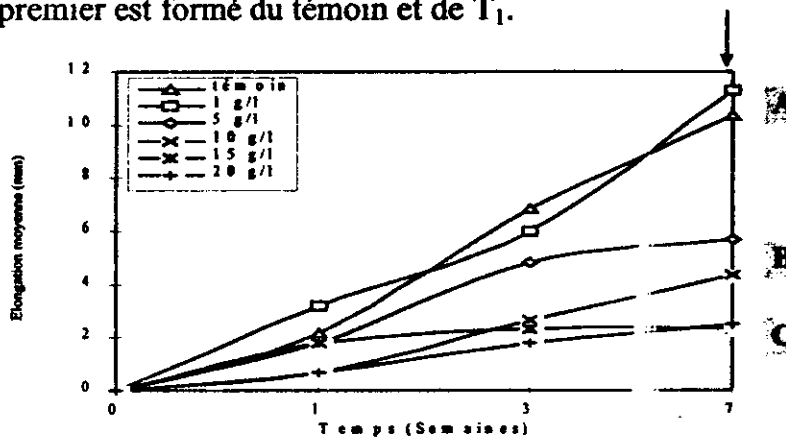


Fig.47 Evolution de l'élévation moyenne des explants en fonction de la concentration du charbon actif et du temps (Fobs :31.81;ddl:5,30;\*) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents)

e ) Nombre moyen de bourgeons utilisables (microboutures)

Après sept semaines de culture, le nombre de bourgeons utilisables atteint un maximum de 6,17 ± 1,41 par explant pour le traitement T<sub>1</sub> (1 g/l), pour les autres

traitements, ce nombre varie entre  $4.67 \pm 0.97$  à  $1.17 \pm 0.92$  microboutures par explant.

L'analyse de la variance confirme cet effet significatif de la concentration du charbon actif sur la production de microboutures utilisables pour le cycle suivant.

De plus, la comparaison de moyennes deux à deux par le test de la PPDS, nous permet de distinguer quatre groupes homogènes. (Fig.48). Le premier de ces groupes est constitué du T1 (1 g/l).

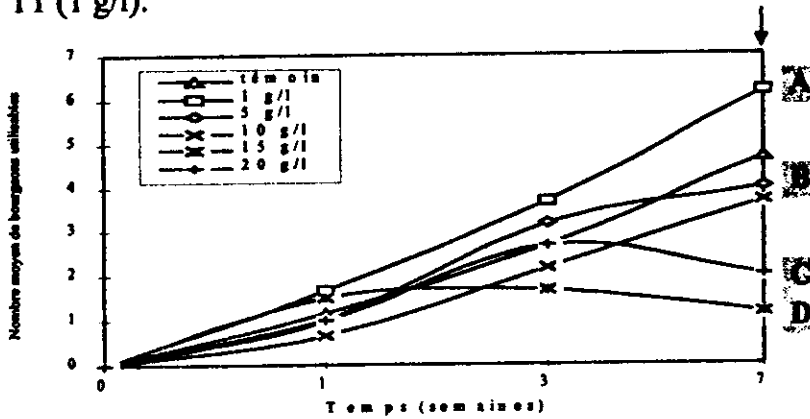


Fig.48 : Evolution du nombre moyen de bourgeons utilisables en fonction de la concentration du charbon actif et du temps. (Fobs :6.25;ddl:5,30;\*) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents).

### f) Morphologie atypique

Certains explants des traitements T<sub>2</sub> (5 g/l) à T<sub>5</sub> (20 g/l) manifestent un brunissement des pousses accompagné d'une vitrification pour les T<sub>3</sub> à T<sub>5</sub>. Le témoin et le T<sub>1</sub> présentent des plantules à morphologie tout à fait normale.

Il faut signaler, que, le taux de brunissement augmente avec la concentration du charbon actif. Ce taux varie de 17 % pour le traitement (T<sub>2</sub>) à 66 % pour le traitement (T<sub>5</sub>). Des taux intermédiaires sont observés pour les concentrations de 10 g/l à 15g/l.

Par ailleurs, la vitrification des folioles n'a concerné que les explants cultivés sur les milieux contenant plus de 10 g/l de charbon actif et affectant 17 % des explants pour le T<sub>3</sub> et 66,66 % pour T<sub>5</sub>.

La callogenèse n'a concerné que 16,7 % d'explants cultivés dans un milieu contenant 20 g/l de charbon actif. (Fig.49)

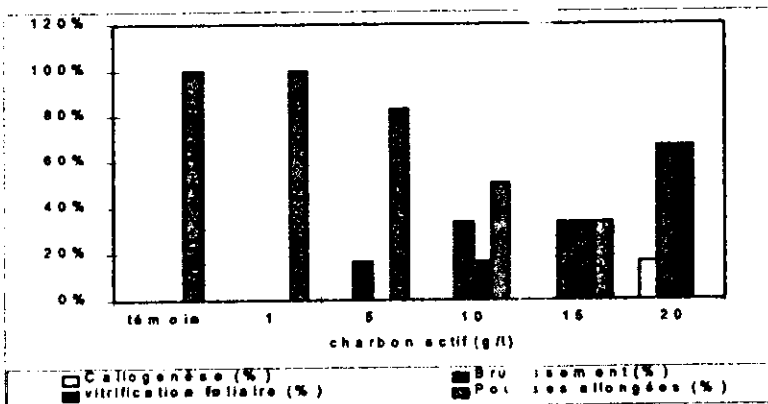


Fig.49 : Influence de la concentration du charbon actif sur la qualité des explants

## 7.4 Effet de l'obscurité

L'obscurité est un facteur susceptible d'améliorer l'élongation (par étiolement) et l'enracinement des explants (effet obscurcissant du milieu). C'est dans ce contexte, que différents traitements à l'obscurité ont été testés :

Témoin : photopériode habituelle (16 heures / jour).

T<sub>1</sub> : 15 jours d'obscurité absolue + photopériode habituelle (16 heures / jour).

T<sub>2</sub> : 20 jours d'obscurité absolue + photopériode habituelle (16 heures / jour).

Le milieu de culture utilisé est toujours MS<sub>2</sub>, sans AIB et sans Charbon actif.

### a) Réactivité des explants

Quelle que soit la durée du traitement à l'obscurité, tous les explants (100%) sont réactifs dès la première semaine de culture. Cette réactivité est évaluée par le débourrement des bourgeons portés par les explants de départ.

### b) Pourcentage d'enracinement

Après sept semaines de culture, les explants ne manifestent aucun enracinement et ce, quelle que soit la durée du traitement appliqué.

### c) Nombre moyen de nœuds par explant

La variation du nombre de nœuds est étroitement liée aux traitements appliqués. En effet, dès la quatrième semaine de culture, le témoin offre en moyenne  $6.33 \pm 1.20$  nœuds par explant. Quant, aux deux autres traitements T<sub>1</sub> (15 jours d'obscurité) et T<sub>2</sub> (20 jours d'obscurité), ils produisent respectivement  $4.50 \pm 0.86$  et  $3.75 \pm 1.52$  nœuds par explant (Fig.50).

L'analyse de la variance montre qu'il y a un effet significatif du traitement appliqué. La comparaison de moyennes par le test de la PPDS, fait apparaître trois groupes homogènes à savoir : Le témoin d'une part et les traitements T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> d'autre part.

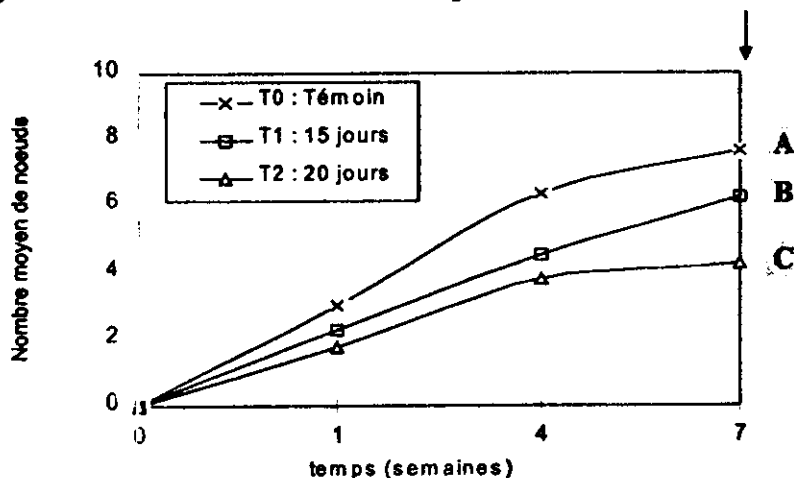


Fig.50 : Evolution du nombre moyen de nœuds en fonction du traitement à l'obscurité et en fonction du temps. ( $F_{obs} = 5.76$  ddl:2;19;\*) (Les traitements portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents).

**d) Elongation moyenne des pousses**

A sept semaines de culture, les microboutures atteignent une élancement de  $8.50 \pm 1.21$  mm et  $8.13 \pm 1.75$  mm respectivement pour les traitements ( $T_1$ ) et ( $T_2$ ), par rapport au témoin qui n'atteint que  $6.83 \pm 1.55$  mm (Fig.51).

L'analyse de la variance réalisée sur les résultats de la quatrième semaine, révèle l'effet significatif du traitement (obscurité) sur l'élancement des pousses. Ainsi, le test de la PPDS, fait apparaître deux groupes homogènes. Le premier est constitué des traitements ( $T_1$ ) et ( $T_2$ ) et le deuxième, du témoin.

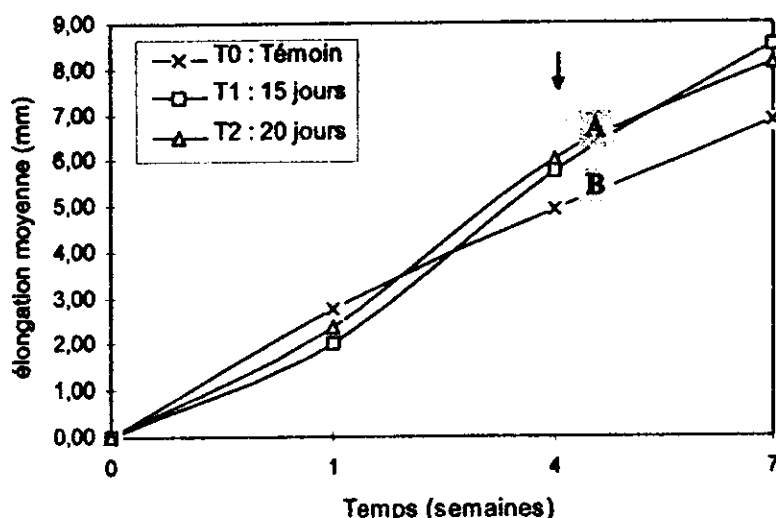


Fig.51 : Evolution de la taille des explants en fonction de la durée d'obscurité et en fonction du temps. ( $F_{obs} = 2.91$  ddl:2;19;\*) (Les traitements portant les mêmes lettres ne sont pas statistiquement différents).

**e) Nombre de bourgeons utilisables (microboutures)**

L'évolution du nombre de bourgeons utilisables est également influencée par le traitement appliqué. Ce nombre varie de 5 microboutures par explant, pour le témoin, à  $2 \pm 1.17$  pour le traitement  $T_2$  et ce à 4 semaines de culture.

Cependant, à sept semaines, on enregistre une légère amélioration du nombre de microboutures atteignant  $6.5 \pm 0.84$  pour le témoin et  $2.5 \pm 0.83$  microboutures pour le traitement ( $T_2$ ) (Fig.52). L'analyse de la variance (sept semaines de culture), révèle un effet significatif entre les traitements appliqués. La comparaison des moyennes deux à deux montre deux groupes homogènes : le témoin et le traitement ( $T_1$ ) d'une part et le ( $T_2$ ) d'autre part.

Résultats et Interprétations

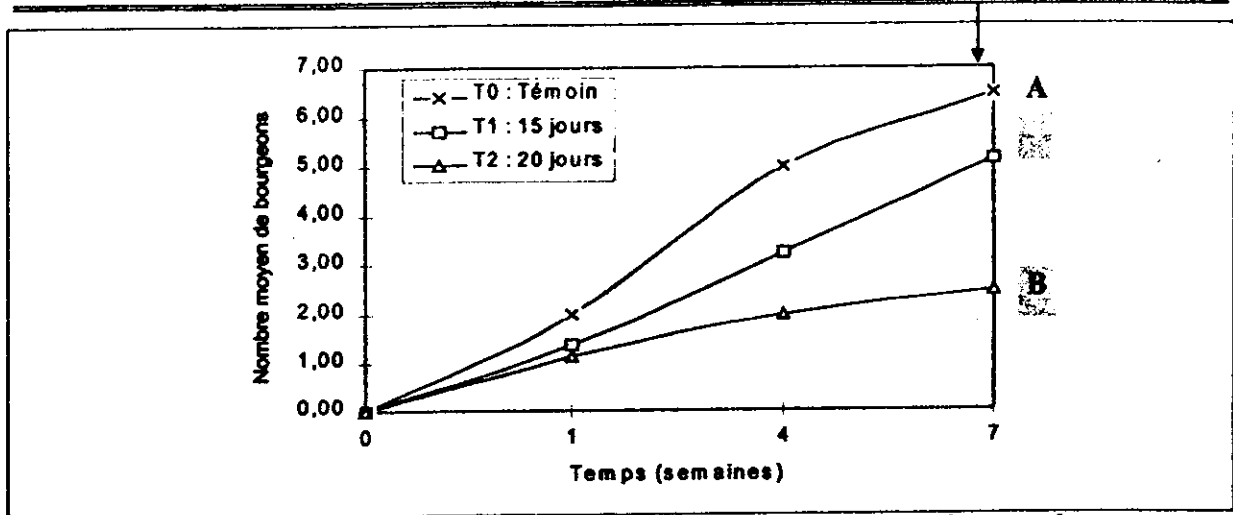


Fig.52 : Evolution du nombre de bourgeons utilisables en fonction du traitement à l'obscurité et en fonction du temps. (Fobs = 8.72; ddl:2;19;\*) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents).

Le tableau n° 14, montre que le témoin donne de meilleurs résultats par rapport aux deux traitements appliqués. L'obscurité a considérablement entravé la multiplication des explants et ce malgré l'allongement de ces derniers en présence des traitements T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub>. En outre, aucun enracinement n'est observé.

Tableau.14 : Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus Avec le traitement à l'obscurité.

Traitements	Enracinement	Nb.Noeuds	Brg.Utilisables	Elongation	Callogenèse
Témoin	-	++	++	-	-
T <sub>1</sub> (15 j)	-	+	+	++	-
T <sub>2</sub> (20j)	-	+	+	++	-

(-) Absence (±) Faible (+) Moyen (++) Bonne

## 7.5 Effet de l'association de l'AIB et du Charbon actif sur la rhizogenèse

Les résultats précédents ont montré que l'AIB (1mg/l) et le charbon actif (1g/l) améliorent l'état morphologique des plantules.

Afin d'améliorer le pourcentage d'enracinement ainsi que les autres paramètres, nous avons donc testé ces deux éléments en combinaison avec des photopériodes différentes :

- C<sub>1</sub> : AIB (1 mg/l) + Photopériode normale.
- C<sub>2</sub> : AIB (1 mg/l) + CA (1 g/l) + Photopériode normale.
- C<sub>3</sub> : AIB (1 mg/l) + CA (1 g/l) + Obscurité (une semaine).

### a) Taux d'enracinement

Le choix du milieu d'enracinement se fait en fonction du pourcentage de la rhizogenèse des explants. Les résultats obtenus avec les précédentes combinaisons montrent que le milieu contenant uniquement de l'AIB (1 mg/l) donne 36 % d'enracinement. L'addition du charbon actif (1 g/l) à ce milieu, fait passer le pourcentage d'enracinement à 88 % (en photopériode normale). L'obscurité fait cependant chuter ce pourcentage à 63 % (Fig.53).

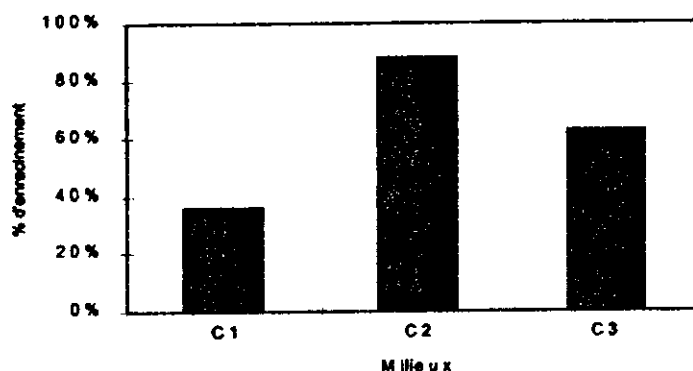


Fig.53 : Influence des conditions de culture sur le pourcentage d'enracinement des explants.

### b) Nombre moyen de racines par explant

Quelle que soient les conditions de culture (rhizogenèse) testées, chaque explant produit en moyenne 1 racine qui prend directement naissance à sa base sans qu'il y ait formation de cal (Planche.4, Photos.1 & 2).

### c) Réactivité des explants

Dés la deuxième semaine de culture, la réactivité des explants atteint 87,5 % pour la combinaison C<sub>1</sub> et 100% pour les deux autres combinaisons C<sub>2</sub> et C<sub>3</sub>. A la quatrième semaine, ce pourcentage passe aussi à 100% pour la C<sub>1</sub> (Fig.54).



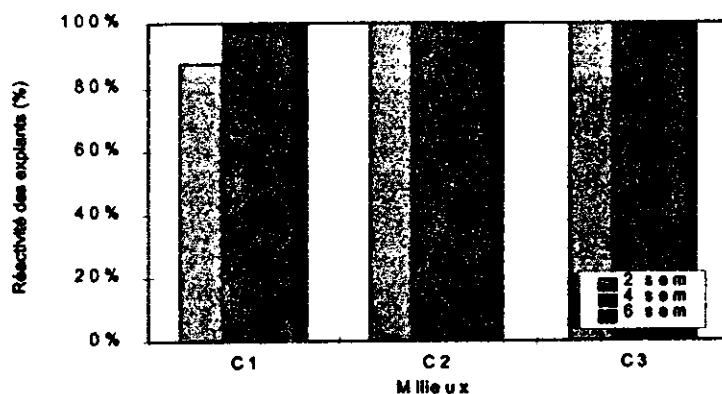


Fig.54 : Influence des conditions de culture sur la réactivité des explants.

**d) Nombre moyen de nœuds par explant**

Le nombre de nœuds produits au cours de la quatrième semaine, varie en fonction de la combinaison testée. En effet, ce nombre varie entre 12,75; 6,88 et 5,63 nœuds par explant respectivement C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> et C<sub>1</sub> (Fig.55). Il s'avère donc que l'association de l'AIB et du Charbon actif (C<sub>2</sub>), améliore ce paramètre par rapport au témoin (C<sub>1</sub>).

L'analyse de la variance effectuée à quatre semaines de culture révèle un effet significatif des combinaisons testées sur le nombre moyen de nœuds par explant. Le test de la PPDS, fait apparaître deux groupes dont le premier est constitué de C<sub>2</sub>.

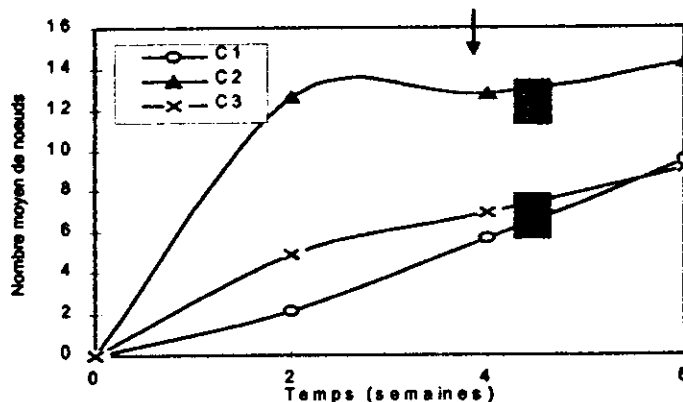


Fig.55 : Evolution du nombre de nœuds en fonction des conditions de culture (Fobs.7.82 ddl.2;19; \*). (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents).

**e) Elongation moyenne des explants**

Les résultats obtenus à 4 semaines montrent que les conditions de culture C<sub>3</sub> sont les plus favorables pour ce paramètre : 8.56 mm contre 5.11 mm et 3.66 mm respectivement pour C<sub>3</sub> et C<sub>1</sub>. En effet l'analyse de la variance révèle un effet significatif du milieu d'enracinement sur l'élongation des explants. La comparaison de moyenne deux à deux, permet de dégager deux groupes homogènes (Fig.56)

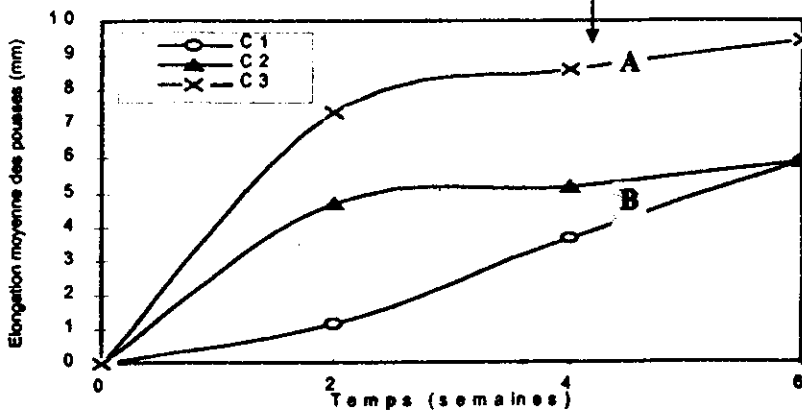


Fig.56 : Evolution de l'élongation moyenne des explants en fonction du temps et des conditions de culture. (Fobs.7.25. ddl.2;19; \*) (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents).

**f) Nombre moyen de bourgeons utilisables par explant (microboutures)**

Le nombre moyen de bourgeons utilisables est également lié à l'élongation des explants. Après quatre semaines de culture, ce nombre varie entre 11.11 et 4,5 respectivement pour le C<sub>2</sub> et le C<sub>1</sub>. L'analyse de la variance effectuée à quatre semaines de culture révèle l'effet significatif des conditions de culture sur le rendement moyen en bourgeons utilisables. La comparaison des moyennes dégage deux groupes homogènes (Fig.57) dont le premier est encore constitué par le C<sub>2</sub>.

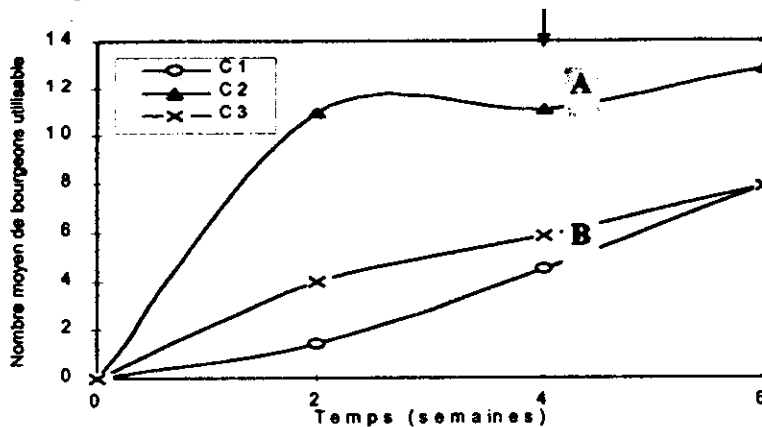


Fig.57 : Evolution de nombre moyen de bourgeons utilisables en fonction du temps et des conditions de culture (Fobs.8.19 ddl.2.19; \*). (Les traitements portant les mêmes lettre ne sont pas statistiquement différents).

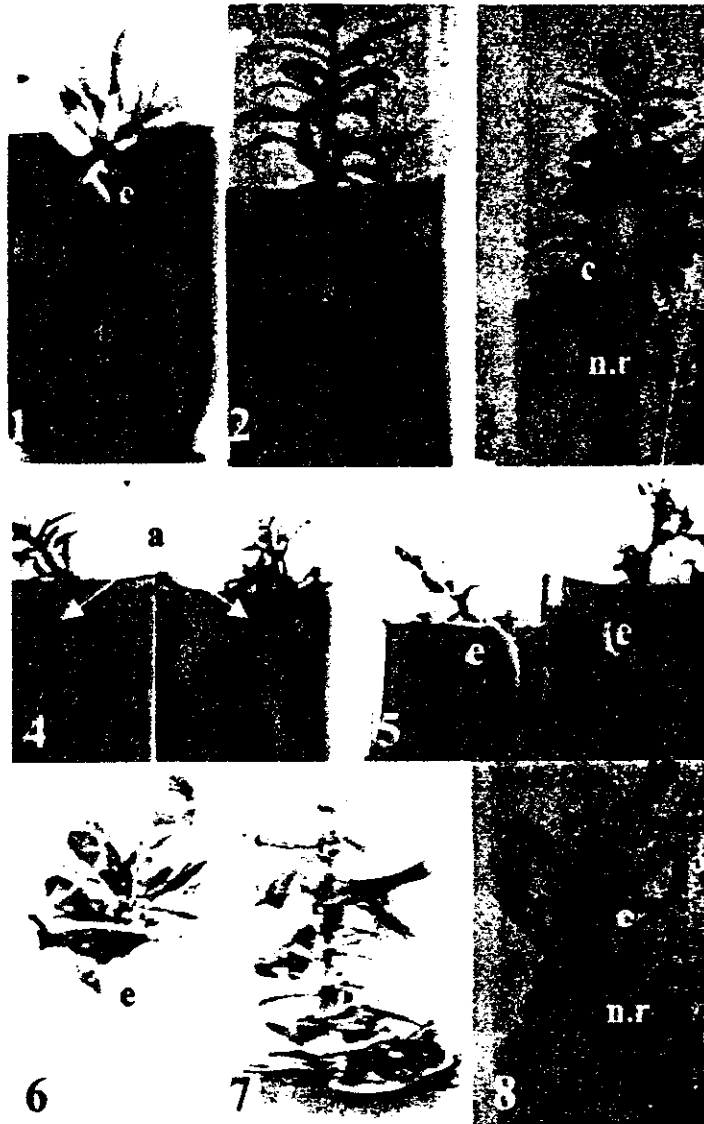
**7.5.1 Bilan**

Les résultats présentés précédemment montrent que le milieu de culture (MS<sub>2</sub>), additionné de l'AIB (1 mg/l) et du charbon actif (1 g/l) s'est révélé très favorable aussi bien pour la qualité des vitropiants et le rendement en bourgeons utilisables que pour leur enracinement (pourcentage plus élevé = 88 %). L'induction de l'enracinement dans l'obscurité entraîne une chute du pourcentage d'enracinement d'environ 25 % par rapport à la combinaison précédente. Le tableau récapitulatif suivant résume les principaux résultats obtenus.

Tableau.15 : Tableau récapitulatif des principaux résultats obtenus

Traitements	Paramètres étudiés			
	% Enracinement	Nb.Noeuds	Brg.Utilisables	Elongation
C <sub>1</sub>	±	+	+	-
C <sub>2</sub>	++	++	++	++
C <sub>3</sub>	+	+	+	±

(-) Absence (±) Faible (+) Moyen (++) Bonne



*a - absence d'enracinement*  
*c - Cal*  
*e - Enracinement*  
*n.r - Néoformation de racines*

- |   |   |
|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Début d'enracinement</li> <li>2. Croissance des racines.</li> <li>3. Racines néoformées</li> <li>4. Absence d'enracinement dans un milieu contenant uniquement le charbon actif (1 g/l).</li> <li>5. Enracinement en présence du charbon actif (1 g/l) associé à 1 mg/l d'AIB.</li> </ol> | <ol style="list-style-type: none"> <li>6. Enracinement sur un milieu contenant un mélange d'auxines (0.25 mg/l ANA et 1 mg/l d'AIB).</li> <li>7. Effet du charbon actif sur la croissance des vitroplants.</li> <li>8. Enracinement sur un milieu contenant un mélange d'auxines (0.5 mg/l ANA et 1 mg/l d'AIB).</li> </ol> |
|---|---|

Plaque 4 : Phase d'enracinement

## 8 Acclimatation des vitroplants

Cette étape consiste à transférer les vitroplants du milieu gélosé vers un substrat qui doit être le plus léger et le moins contaminé possible.

Dans notre cas le substrat utilisé est composé de  $\frac{1}{3}$  de vermiculite et  $\frac{2}{3}$  de tourbe préalablement enrichie (en macro et microéléments de MS). Les vitroplants déjà débarrassés de leur gélose sont placés dans des verres en plastique transparent contenant le substrat préalablement désinfecté (par autoclavage à 120 °C pendant 20 mn). Le tout est ensuite recouvert par un deuxième verre de même type, afin de maintenir une bonne humidité (indispensable pour la réussite de l'acclimatation). Les verres contenant les vitroplants sont disposés dans un récipient dans lequel un niveau d'eau est maintenu en permanence de telle sorte à éviter à la fois le dessèchement et la pourriture des vitroplants (substrat non submergé d'eau).

### a) Taux de reprise des vitroplants

Le taux de reprise est évalué par la formation de nouvelles folioles dans les conditions d'acclimatation. A la première semaine de culture, le taux de reprise des vitroplants est de 35 %. A partir de la troisième semaine, la reprise des vitroplants est de 90%. Les plantules acclimatées s'allongent par la suite normalement en développant de nouvelles folioles vertes, plus larges que celles obtenues in vitro, signe de leur bonne adaptation aux nouvelles conditions (Fig.58).

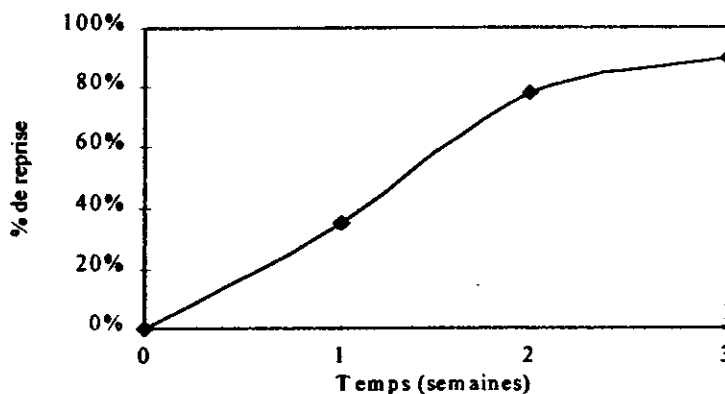


Fig.58 : Evolution du taux de reprise des vitroplants acclimatés

### b) Nombre moyen de folioles par vitroplant

En phase d'acclimatation, les vitroplants ayant repris développent en moyenne  $2.45 \pm 0.95$  folioles et ce, dès la première semaine. Ce nombre augmente avec le temps pour atteindre  $14.60 \pm 1.95$  folioles après deux semaines d'acclimatation. Ce nombre double ensuite à partir de la troisième semaine de culture (Fig.59).

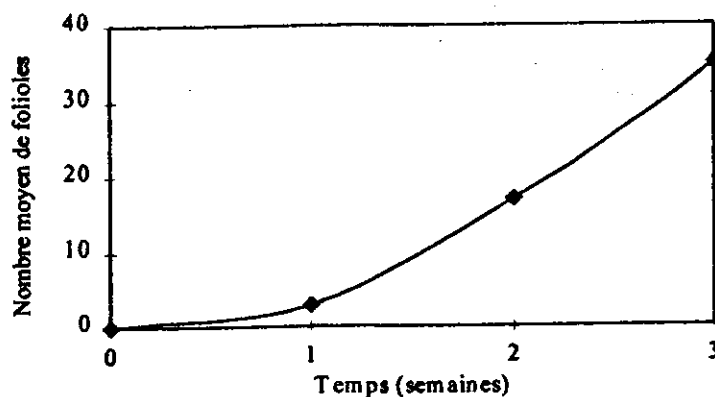


Fig.59 : Evolution du nombre moyen de folioles produites par vitroplants

### c) Elongation moyenne des vitroplants

La formation de nouvelles folioles est accompagnée d'une élévation des tiges qui se développent rapidement selon une dominance apicale. En effet, dès la première semaine de culture, les vitroplants ayant repris s'allongent en moyenne de  $15 \pm 0.96$  mm pour atteindre  $65 \pm 1.45$  mm à la troisième semaine de culture (Fig.60). Signalons que dans certains cas les bourgeons situés au niveau de la partie basale du vitroplant se développent pour donner des ramifications primaires de 2 à 3 mm.

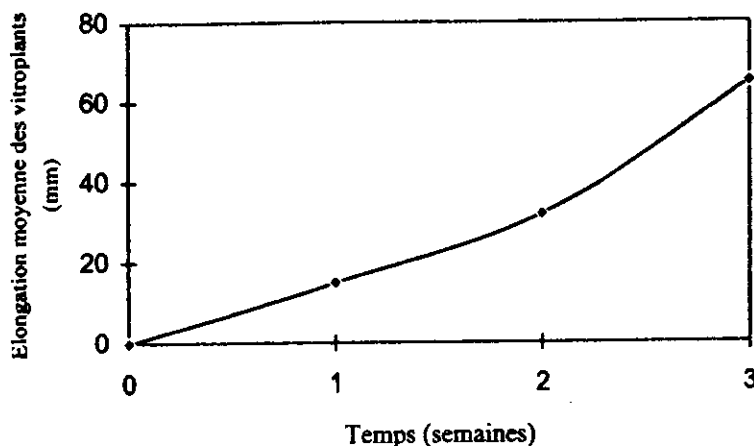
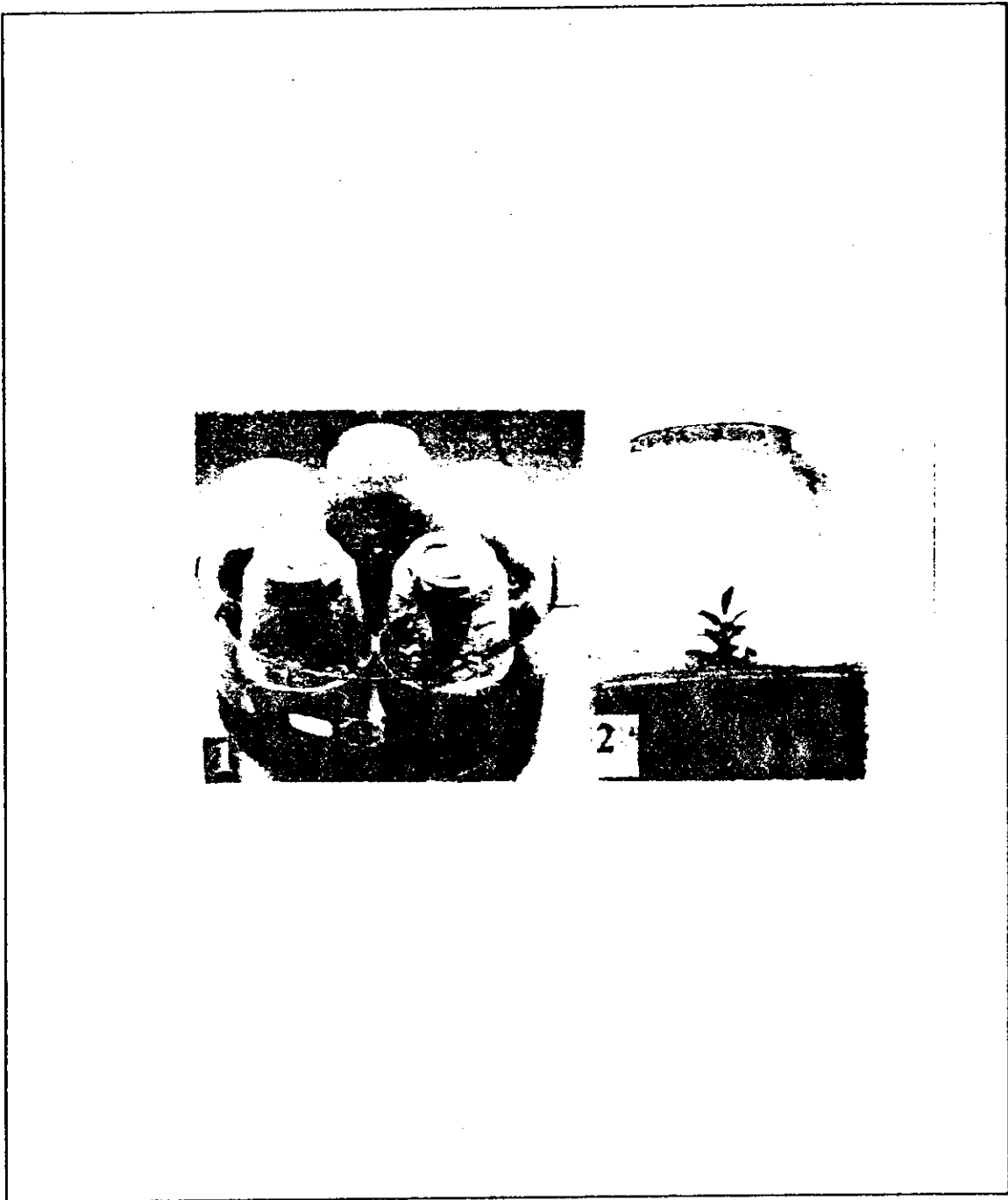


Fig.60 : Evolution de l'élongation moyenne des vitroplants en fonction du temps

## 8.1 Bilan

L'acclimatation des vitroplants, demeure plus que jamais la phase-clé de la micropropagation. Pour l'arganier, les vitroplants acclimatés ne posent aucun problème particulier. Les jeunes plantules mettent généralement deux à trois semaines pour s'adapter aux nouvelles conditions de culture. Ainsi, ils se développent en produisant de nouvelles folioles vertes et plus larges (planche.5, Photos.1 &2).

A travers les résultats obtenus, il ressort que les vitroplants d'arganier présentent de bonnes aptitudes à l'acclimatation (90 % de réussite).



1. Vitroplants en début de sevrage	2. Vitroplants acclimatés, développement de nouvelles folioles.
------------------------------------	---

Planche.5 : Phase d'acclimatation

 **Discussion générale** 



## 1. Germination

La présente étude a mis en évidence la difficulté de germination des graines d'arganier *in vitro*. Cette difficulté est probablement due aux téguments épais et durs induisant la dormance (PRENDERGAST, 1991).

L'utilisation directe des embryons extraits de la graine (Noix) présente un intérêt particulier pour la production de vitroplants par :

- Evitement de la dormance induite par les téguments.
- Rapidité de germination des embryons en moyenne une semaine
- Production de vitrosemis groupés et homogènes ce qui permet de lancer un programme de micropropagation à grande échelle.

L'étude définit en outre, les conditions optimales de culture permettant d'obtenir 100 % de germination des embryons et donnant des plantules morphologiquement normales (sans anomalie, ni vitrification). Parmi les différents milieux testés, la solution KNOP (1865) sans charbon actif, s'est avérée la plus appropriée à cet égard. Ceci va d'ailleurs dans le sens des recommandations de nombreux auteurs qui préconisent cette même solution pour la germination de graines d'autres espèces végétales ligneuses (DEBERGA *et al.*, 1981; MONTEUUIS *et al.*, 1988).

Au stade de germination, les embryons sont pourvus de tous les éléments nécessaires à leur développement. L'enrichissement du milieu de culture ne devrait théoriquement intervenir qu'après la formation des cotylédons, des premières folioles ainsi que des racines qui assureront la croissance de la plantule par l'utilisation et l'assimilation des éléments présents dans le substrat et dans l'atmosphère.

## 2. Callogenèse

Les résultats obtenus, ont montré qu'il est possible d'induire une callogenèse à partir de divers explants prélevés sur des embryons (enveloppe séminale, cotylédon, racine .....etc). Cette callogenèse est cependant irrégulière, d'où des dimensions variables des cals produits. Ces derniers se sont également avérés non caulogènes. Ceci indique que la composition minérale et hormonale des milieux testés n'est pas optimale (MAIZA; 1980 et KHELIFI-SLAOUI *et al.*, 1996).

En effet, en absence de références bibliographiques sur la callogenèse chez l'arganier, les combinaisons testées (2,4-D et BAP) dans le milieu MS (1962) n'ont pas conduit à un bourgeonnement néoformé, qui présente un grand intérêt pour la recherche des variants somaclonaux.

Il n'en demeure pas moins, que le travail effectué a mis en évidence des aptitudes callogènes de l'arganier. Ceci constitue une base de travail pour les recherches dans ce domaine.

### 3. Phase de multiplication par élongation - fragmentation

A l'instar des autres espèces ligneuses, la maîtrise de la composition minérale et hormonale du milieu est indispensable pour la micropropagation conforme de l'arganier.

Ce mode de multiplication est basé sur un phénomène biologique connu, qui est la stimulation du fonctionnement des méristèmes préexistants par la suppression de la dominance apicale.

Les résultats obtenus montrent l'importance de la solution minérale et de la BAP (cytokinine de synthèse) pour la multiplication de l'arganier :

- Concernant la solution macro-minérale : Sur le milieu MS non modifié, non seulement la croissance des pousses est insuffisante (nombre de nœuds, élongation des entres-nœuds faible et présence de cal), mais aussi il y a l'apparition du phénomène de vitrification. Cette dernière entraîne encore plus les possibilités de multiplication (GASPAR *et al.*, 1984; KEVERS *et al.*, 1984). Dans ce cas, il est généralement recommandé de diluer la solution macro-minérale de MS et/ou de réduire au demi ou au quart la concentration du nitrate d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (ZRYD, 1988; SLAOU, 1990). En effet, dans notre cas l'application de ces deux recommandations (Milieu de culture MS<sub>2</sub>) s'est montré très positif à la fois par la diminution voir l'élimination du phénomène de vitrification que par une meilleure croissance des vitroplants (meilleur taux de multiplication).
- Concernant la BAP, les résultats obtenus sur le milieu MS, montrent qu'il est indispensable d'enrichir le milieu en BAP, celle-ci favorise la production de bourgeons axillaires, qui varie en fonction des concentrations utilisées :
  - Aux plus faibles concentrations : 1.88 et 2.44 bourgeons par explant.
  - Aux concentrations intermédiaires : 4.58 bourgeons par explant.
  - Aux plus fortes concentrations : 9.23 bourgeons par explant.

L'utilisation de la BAP en présence de MS modifié (MS<sub>1</sub>), les résultats montrent que celle-ci est toujours indispensable pour le déclenchement des bourgeons axillaires qui varie en fonction des concentrations de BAP :

- Aux plus faibles concentrations : 7.12 bourgeons par explant.
- Aux concentrations intermédiaires : 9.68 bourgeons par explant.
- Aux plus fortes concentrations : 12.46 bourgeons par explant.

#### 4. Phase de multiplication hyper-ramification associée à une élongation - fragmentation

La multiplication par hyper-ramification est une technique couramment utilisée pour la micropropagation des résineux (KHELIFI, 1986; KHELIFI, 1990) rarement utilisée chez les angiospermes (DUHAUX *et al.*, 1991).

Chez l'arganier, cette technique s'est avérée parfaitement adaptée aussi bien pour améliorer le taux de multiplication que pour pallier aux problèmes de callogenèse, causés par l'utilisation de la BAP. L'association de la méthode de multiplication par hyper-ramification associée à la multiplication par élongation - fragmentation permet d'amplifier le nombre de bourgeons produits par un même vitrosemis (jusqu'à 15 bourgeons en une génération).

Pour provoquer l'hyper-ramification du vitrosemis, il est indispensable d'éliminer son bourgeon apical, ce qui aura pour effet de déclencher le développement des bourgeons axillaires qui se trouvent directement à l'aisselle des cotylédons. Ces bourgeons évoluent simultanément en pousses allongées (jusqu'à 17 pousses par vitrosemis), qui à leur tour seront fragmentées en autant de microboutures qu'il y a de nœuds. Ainsi, au lieu qu'un vitrosemis, donnent en moyenne 5 bourgeons en 7 semaines, il donnera 13 bourgeons en 3 semaines de culture.

#### 5 Enracinement

La rhizogenèse *in vitro* est influencée par de nombreux facteurs tels que : génotype, l'âge physiologique du plant mère, l'origine des explants, le type de régulateurs de croissance utilisés (JARVIS et BOOTH, 1981). D'autres facteurs peuvent interagir pour jouer également sur l'enracinement des vitroplants. Chez le merisier (*Prunus avium*) par exemple, les meilleurs résultats sont obtenus soit avec de l'AIB à la température de 19°C ou avec l'ANA à une température de 25°C (CORNU et CHAIX; 1981).

Dans notre cas, les résultats obtenus montrent qu'il existe réellement des interactions entre les différents facteurs étudiés. En effet, les meilleurs taux d'enracinement (88 %) sont obtenus en combinant le milieu MS<sub>2</sub> additionné de 1 mg/l d'AIB, 1 g/l de charbon actif et exposé à la lumière (16h/jour). Les autres combinaisons donnent des résultats nettement inférieurs.

De nombreuses études montrent que les facteurs précédents (l'obscurité, charbon actif, l'AIB) sont favorables séparément ou combinés pour l'enracinement *in vitro* de nombreuses espèces ligneuses.

L'induction de la rhizogenèse dans l'obscurité, s'est avérée dans de nombreux cas défavorable (taux d'enracinement réduit de 25 %).

## **6 Acclimatation**

Dans nos conditions expérimentales (substrat, humidité), l'acclimatation des vitroplants d'arganier, ne pose aucun problème. Le taux de reprise est de 90% dans ces conditions. Les vitroplants marquent un arrêt de croissance durant la première semaine, à la suite duquel ils se mettent à développer de nouvelles folioles vertes et de plus grande taille (adaptation aux nouvelles conditions).

La croissance des jeunes plantules caractérisée par la dominance du bourgeon apicale, est déclenchée. Le développement des ramifications des (bourgeons axillaires) intervient par la suite.

Au bout de six semaines, les vitroplants acclimatés atteignent en moyenne 80 mm et peuvent être élevés en serre avant de les transplanter au champ.



**Conclusion et recommandations**



## Conclusion et Recommandations

Malgré les intérêts que présente l'arganier, il demeure néanmoins menacé dans son milieu et fragilisé par les pressions anthropiques. C'est pour quoi il est indispensable de mettre en place des axes de développement de cette espèce surtout dans son milieu naturel où il peut jouer un rôle important.

Au Maroc, l'arganeraie est considérée comme l'unité de gestion durable de ces écosystèmes, pour cela, on lui a conféré le statut de réserve de la biosphère de l'arganier. Par contre en Algérie, la surexploitation de l'arganeraie menace continuellement cet écosystème, ce qui justifie, aujourd'hui, la nécessité de le protéger en mettant en place des textes législatifs interdisant son exploitation par les riverains, en attendant que des modèles de protection et de développement soient établis et qui peuvent s'articuler autour des différents points suivants :

- Etudes éco-sociologique de l'arganeraie : Cette étape constituerait le point de départ des recherches sur les interactions entre l'homme, l'animal et le végétal.
- La connaissance et la maîtrise des mécanismes de la régénération naturelle et artificielle afin d'assurer la pérennité de l'espèce.
- La mise au point d'un modèle de gestion capable d'assurer la production pastorale de l'arganeraie.

Concernant le présent travail, cette étude nous a permis de mettre en place un protocole complet de la micropropagation de l'arganier à travers ses différentes phases. Et si on est arrivé à produire des vitroplants de bonne qualité ceci ne doit pas nous empêcher d'affiner la technique de multiplication (la composition minérale et hormonale du milieu de culture a titre d'exemple). Les recherches actuelles sur l'induction du bourgeonnement chez les espèces ligneuses montrent que la substitution de la BAP par le thidiazuron, améliorent le nombre et la qualité des bourgeons induits. Ainsi, les travaux de HUETTEMAN et PREECE (1993) sur les espèces forestières, montrent que l'utilisation du thidiazuron à faibles concentrations (inférieures à  $1\mu\text{M}$ ) induit le maximum de bourgeons axillaires. Cependant, à de plus fortes concentrations (supérieures à  $1\mu\text{M}$ ) les explants manifestent une formation de bourgeons néoformés. D'autres auteurs considèrent que la substitution de la BAP par la zéatine améliore la croissance caulinaire (BADJI *et al.*; 1991).

En plus des régulateurs de croissance, d'autres facteurs peuvent améliorer le coefficient de multiplication. Comme le signale DUHAUX *et al.*(1991), le remplacement du saccharose par le maltose 30 à 60 g/l, réduit les effets de callogenèse et augmente le nombre de pousses.

Pour l'arganier, en plus de ces derniers, d'autres facteurs tels que les gélifiants du milieu de culture (Agarose et la gélatine), la composition vitaminique, .....etc peuvent être étudiés.

---

Concernant le sevrage, les vitroplants obtenus présentent un taux de reprise très satisfaisant, reste à étudier leurs comportements au moment de la transplantation qui est généralement considérée comme phase critique pour l'arganier (le choc de transplantation et la fente de semis engendrée par le *Fusarium oxysporum*) (ZAHIDI et BANI-AAMEUR; 1998).

Le présent travail constitue un point de départ pour la réhabilitation de l'arganier dans son aire naturelle et le moyen le plus rapide pour propager cette espèce, néanmoins un travail de vulgarisation et de sensibilisation doivent être entrepris pour assurer la pérennité de l'espèce.

 **Références bibliographiques** 



## Références bibliographiques

---

- AYAD A., 1989 - Présentation générale de l'arganeraie, in Formation Forestière Continue, Thème l'Arganier, Station de Recherches Forestières, Rabat, 13 -17 Mars 1989. 15 p.
- BADJI S., MERLIN G., N'DIAYE I., MAIRONE Y., DOIRE P., PALMA B., COLLONA J.B., GESLOT A. et NEVILLE P., 1991 - Multiplication végétative *in vitro* d'*Acacia senegal* (L.) Will. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. pp : 303 - 308. groupe d'étude de l'arbre. Paris, France.
- BARAKAT M.N., EL - LAKANY M.H., 1992 - Clonal propagation of *Acacia saligna* by shoot tip culture . *Euphytica* (2) 59 (2- 3 ) pp : 103- 107.
- BEAUCHESNE G., 1981 - Les milieux minéraux utilisés en culture *in vitro* et leur incidence sur l'apparition de boutures d'aspect pathologique. C.R. Acad. Agric. Paris. 67 pp : 1389 - 1397.
- BENCHAKROUN F., 1989 - L'agroforesterie en zones arides : système efficace pour la lutte contre la désertification. Cas de l'arganeraie du Souss, Actes du Symp. d'Agadir sur la lutte contre la désertification, *Ass. Ilgh*, Tome II pp : 431 -437.
- BERGER K., SCHAFFNER W. 1995 - *In vitro* propagation of the leguminous tree *Swartzia madagascariensis*. *Plant cell tissue and organ culture*. 40 (3) pp: 289 - 291.
- BLJOT C., 1980 - Multiplication végétative *in vitro* par néoformation de bourgeons et d'embryons somatiques. *in la multiplication végétative des plantes supérieures*. Ed. INA - Paris, pp : 133 -157.
- BONGA J.M., DURZAN D.J. 1982 - Tissue culture in forestry. Ed Nijhoff et Nunk Publ. 226 p.
- BORNMAN CH., VOGELMANN TC., 1984 - Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine- induad adventitious bud Formation and vitrification in *Picea abies*. *Physiol Plant*. 61 pp : 505- 512.
- BOUDJENANE R., 1995 - Etude expérimentale de la germination de la graine d'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) et approche du comportement des plants. Thèse d'ing. Agro., *inst. sup. for. agro.*, 76 p.
- BOUDY P., 1952 - Guide forestier en Afrique du Nord, 505p., La Maison Rustique, Paris.
- BOUKHABZA M. et PICHON-PRUM N., 1988 - L'arganier, ressource économique et médicinale pour le Maroc. *Phytotherapy* pp : 27 , 93 -107.
- BROWN C.L., 1980 - Production of woody biomass and cloning of superior genotypes. Plants as energy transducers : Systems and applications. *Symp. South Sect. Am. Soc. Plant Physiol*. pp : 185 -192.
- CHALUPA V., 1979 - *In vitro* propagation of some broadleaved forest trees. *Comm. Inst. For. Czech*. 11 pp : 159 -170.

## Références bibliographiques

- CHALUPA V., 1983.- in vitro propagation of willows (*Salix Spp*) European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) and Black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Biol. Plant.* 25 pp : 305 - 307.
- CHALUPA V., 1984 -In vitro propagation of Oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill). *Biologica Plantarum* (Praha), 26 (5) pp : 374 -377.
- CHANG S.H., DONALD D.G., 1992 - in vitro organogenesis and plantlet formation of *Panlownia elongata*. *South African Forestry Journal* 163, pp : 27- 29.
- CHARROUF M., 1984 - Contribution à l'étude chimique de l'huile d'*Argania spinosa* (L.).(Sapotaceae). Thèse Sciences. Univ. Perpignan. 178 p.
- CHEN C.F., CHEN C., CHIEN J., WANG H., CHANG H., HSD H., OU Y., HO T., et LU T., 1978 - Obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell. *Agr. Proc. Symp. Plant. Tissue culture*, Sci. Press. Peking, pp : 11 - 12.
- CHEVALER A., 1953 - L'Argan, les marmulanos et les Noyer, arbres d'avenir en Afrique du Nord, en Macaronésie et dans les régions semi - désertiques au globe si on les protège et si on les améliore, *Rev. Int. Bot. Appli. Agr. Trop.*, pp : 363 -364.
- CORCHETTE M.P., DIEZ J.J., VALLET T., 1993 - Micropropagation of *ulmus primila* (L.) from mature trees. *Plant Cell Reports* 12 (9) pp : 534 - 536.
- CORNU D., CHAIX C., 1981 - Multiplication par culture in vitro de Merisiers adultes (*Prunus avium*) application à un large éventail de clones. *Colloque International sur la culture in vitro des essences forestières AFOCEL*. pp : 71 - 79.
- DAGNELIE P., 1975 - Théorie et méthodes statistiques, application agronomiques, V 2, Ed. Presse Agronomique de Gembloux, 451 p.
- DAS P., SAMANTARAY S., ROBERTS A.V., ROUT G.R., 1997 - In vitro somatic embryogenesis of *Dalbergia sisoo* Roxb - a multipurpose timber-yielding tree. *Plant cell Reports*. 16 (8) pp : 578 - 582.
- DE PONTEVES E., BOURBOUZ A., et NARDJISSE H., 1990 - Occupation de l'espace, Droit coutumier et législation forestière dans le terroir de l'arganeraie septentrionale au Maroc. *Cah. Rech. Dévl.* 26 pp : 28 - 43.
- DEBERGA PC , HARBAOUI , R LEMEUR 1981 - Micropropagation of globe artichoke (*Cynara scolymus*) evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potential. *Physio. plant* 53 pp : 181- 187.
- DEL PERUGIA J., 1970 - Aménagement sylvo pastoral de la forêt d'arganiers. Proposition 121 pp : 175 - 180.
- DUCHOUX E. 1988 - Organogenèse et multiplication végétative chez les arbres. pp 59 -68 in ZRYD J.P., : Culture de cellules, Tissus et organes végétaux. Fondements théoriques et utilisations pratiques. Ed. Press. Polytechnique. Ramade. Paris, 308 p.

## Références bibliographiques

---

**DUHAUX E., SOUGOUFARA B., PHELPE M., 1991** - Apport des techniques de culture in vitro dans les programmes d'amélioration des arbres fixateurs d'azote. Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides. pp : 205 - 213. groupe d'étude de l'arbre . Paris, France.

**DUHOUX E., DAVIES D. 1985** - Callogénèse à partir de bourgeons cotylédonaire d'*Acacia albida* et influence du saccharose sur la Rhizogénèse. *Plant. Physiol.* 5 pp : 124 - 128.

**DUPIN., 1949** - L'arganier, survivant de la flore tertiaire, providence du Sud marocain. Dir. Agric.Com. For. Serv. Elev. Essaouira, 12 p.

**DURZEN D.J., LOPUSHANSKI S.M., 1975** - Propagation of american elm via cell suspension cultures. *Can. J. For. Res.* 5 pp : 273 -277.

**EHRIG F.G., 1974** - *Die Arganie, charakter, ökologie und wirtschaftliche Bedeutung eines Tertiärreliktes in Marokko*, Petermanns Géogr. Mitteil., 118 (2) pp : 117-125, Gotha.

**EL MOUSSADIK A et PETIT R. J., 1996** - Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Marocco. *Molecular Ecology* , 5 pp : 547 - 555.

**EL-MAZZOUDI H et ERRAFIA M., 1977** - Contribution à l'étude de la germination des noix d'argan (*Argania spinosa*) par des prétraitements chimiques, *Ann. Rech. For.*, Tome 17, pp 59 - 66, Rabat.

**EMBERGER L., 1924** - A propos de la distribution géographique de l'arganier, *Bull. Soc. Sc. Nat. Maroc*, Tome IV, n° 7, pp 151 - 153, I.S.C., Rabat.

**EMBERGER L., 1925** - Les limites naturelles climatiques de l'arganier, *Bull. Soc. Sc. Nat. Maroc*, Tome V, n° 4-5, pp : 94 - 97, I.S.C., Rabat.

**FARINES M., SOULIER J., CHARROUF M et CAVE A., 1984** - Etude de l'huile des graines d'*Argania spinosa* (L.). *Rev. Franç. des corps gras* : 31(11) pp : 443-448.

**FAVRE J.M., 1981** - Rhizogénèse et bouturage pp : 51 -76 in CHAUSSAT R. et BIGOT C., La multiplication végétative les plantes supérieures. Ed. Gauthier-Villars. Paris, 277 p.

**FAVRE J.M., JUNKER I , 1988** - Variation in expression of episodic growth on in vitro cultured shoots of Oak (*Quercus robur* L.) *Int. Symp. On forest. Tree Physiology*, Septembre 1988. 8 p.

**FU M.L., 1978** - Plantlets from *Platanus* tissue culture. In Ed. TA Thorpe 167 p.

**GASPAR TH., KEVERS C., DEBERGH P., MAENE L., PAQUES M., BOXUS TH., 1984** - Vitrification : morphological, physiological and ecological aspects. *Cell and tissue culture in forestry V I* pp : 152 -166.

**GAUTHERET R., 1940** - Nouvelles recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'*Ulmus campestris* cultivé in vitro. *CR. Acad. Sci. Paris.* 210 pp : 744 - 746.

## Références bibliographiques

---

- GORET W., 1988 - Avancement des travaux de recherche sur l'extraction de l'huile d'argan au niveau du ménage. In journées d'étude sur l'arganier. Essaouira (Maroc) 23 -24 juin 1988, 5 p.
- HELLER R., 1953 - Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. vég.* 14 pp : 1-223.
- HUETTEMAN C.A., PREECE J.E., 1993 - Thidiazuron : a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell. tissue and organ culture.* 33 (2) pp : 105- 119.
- HUHTINEN D., 1978 - Callus and plantlet regeneration from anther culture of *Betula pendula* Roth. In TA Thorpe Ed 169 p.
- HUHTINEN O., YAHYAOGU Z., 1974 - Das frühe blühen von aus kalluskulturen herangezogenen pflänzchen bei der birke (*Betula pendula* Roth). *Silvae Genet.* 23 pp : 32 - 34.
- JARVIS BC , BOOTH A., 1981 - Influence of indole butyric acid boron, myo-inositol, vitamin D<sub>2</sub> and seedling age on adventitious root development in cuttings of *Phaseolus*. *Physiol Plant* 53 pp : 213- 218.
- KAPAUN J.A., CHAN ZONGMING 1997 - Plant regeneration from leaf tissues of Siberian elm. *Hortscience.* 32 (2) pp : 301 -302.
- KEVERS C., COUMANS M., COUMANS-GILLES M.F., et GASPAR T.H., 1984 - Physiological and biochemical events leading to vitrification in plants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 61 pp : 69 - 74.
- KHELIFI L., 1990 - Protoplastes d'organes et de Cals de vitrosemis de mélèze (*Larix decidua* Mill.) : Préparation et culture, Élément de cytologie et de physiologie respiratoire. Mémoire de Thèse Doct. Université de Nancy I. 215 p.
- KHELIFI L., 1986 - Contribution à la mise au point d'une méthode de vitropropagation du mélèze hybride (*Larix x Eurolepis* HENRY) à partir de graines. Mémoire de D.E.A. Université de Nancy I. 63 p.
- KHELIFI L., MORSLI A. et KHELIFI-SLAOUI M., 1996 - Premiers résultats sur l'obtention *in vitro* de germination d'arganier "*Argania spinosa* (L.) Skeels" *Ann. Agr. LNA.*, Vol. 7, n° 1 & 2 pp : 120 - 126.
- KHELIFI-SLAOUI M., ZIANE N., et KHELIFI L., 1996 - Essai de micropropagation du Citrus troyer : *Citrus sinensis* L. x *Poncirus trifoliata* L.(Raf.) *Ann. Agr. LNA.*, Vol.17, n° 1 & 2 pp : 109 - 119.
- KNOP P., 1865 - Quantitative wassersuchung über den ernährungsprozess der pflanzen. *landw versuchs stat* Vol. 7, pp : 93 -107.
- LAUREDET L., et HAFFINER V., 1991 - Incidence de l'âge des plants - mères sur la culture d'apex d'*Hevea*. Relation avec les phytohormones. *Culture in vitro, illustration de quelques recherches.* CIRAD.pp : 15 - 17.

## Références bibliographiques

- LEWALLE J., 1991 - L'arganier. Un arbre exceptionnel. *Magazine R.A.M.* 53 pp : 12 - 14.
- LUCCHESINI M., MENSUALI -SODI A., 1996 - In vitro regeneration from different type of explants from oleaster (*Elaeagnus angustifolia L.*) seedling. *Gartenbauwissenschaft.* 62 (6) pp : 276 - 280.
- MAIRE R., 1939 - Les arganiers de Bani -Snassen, *Botaniska Notiser*, pp : 477-484.
- MAIZA F.; 1980 - Analyse des aptitudes organogénétiques de plusieurs variétés de Citrus en vue d'aboutir à leur multiplication végétative in vitro, Thèse doctrat 3<sup>ème</sup> cycle. 76 p.
- Mc COWN B., AMOS R., 1980 - Initial trials with commercial micropropagation of birch selections. *Proc.Intl. Plant.Prop. Soc.* 29 pp : 387 - 393.
- MEDOROS M., TRENJILLO I., 1994 - Micropropagation of Pistachio : *Pistacia vera L.* *Plant. Tissue. Cult.* 4 (2) pp : 111 - 116.
- MIEGE J., 1945 - Les cultures vivrières en Afrique Occidentale. Etude de leur répartition géographique. *Cahier d'Outre-Mer*, VII pp : 25 - 50.
- MIEGE J., 1954 - Nombres chromosomiques et répartition géographique de quelques plantes tropicales et équatoriales. *Rev. Cyt. Biol. Vég.* XV (4) pp : 312 - 348.
- MONMARSON S., MICHAUX- FERRIERE N., TEISSON C., 1991 - Premiers résultats sur l'embryogenèse somatique chez le *Carica papaya*. *Culture in vitro, illustration de quelques recherches.* CIRAD. pp : 7 - 8.
- MONTEUUIS O , BONM. C., et DOREEN K.S.G., 1988 - Propagation du teck par Culture in vitro. *Bois et Forêts des tropiques* n° 255 (1) pp : 19 - 27.
- MORTON J.F., et VOSS G.V., 1987 - The Argan tree (*Argania sideroxylon*, Sapotaceae) a desert source of edible oil. *Economic Botany*, 41(2):pp : 221-233.
- MURASHIGE T., SKOOG F., 1962 - a revised meduim for rapide growth an bioassays with tobacco tissus culture. *Physiol. Plant.* 15 pp : 473 -497.
- NITSCH J.P., NITSCH C., 1956 - Auxine dependent growth of excised *Helianthus tuberosus*. *Tissu. Am. J. Bot.* 43 , 839p .
- NOUAIM R., CHAUSSOD R., 1993 - L'arganier. Flamboyant N°spécial pp : 8 - 15 p.
- NOUAIM R., et CHAUSSOD R., 1992 - L'arganier. Flamboyant N°21 pp : 3 - 8 p.
- NOUAIM R., CHAUSSOD R., EL ABOUDI A., SCHNABEL C., PELTIER J.P., 1991 - L'arganier : Essai de synthèse des connaissances sur cet arbre. *Physiologie des arbres et arbustes en zones arides et semi-arides*, pp : 373 - 388. groupe d'étude de l'arbre . Paris, France.
- NOUAIM R., CHAUSSOD R., MANGIN G., MUSSILLON P., 1990 - L'arganier : Système racinaire et microflore. In : Colloque « *ligneux des zones arides* » Nancy, France.

Références bibliographiques

- NOUGARIDE A., SILVEIRA C.E., RONDET P., 1996 - In nature dormant buds and in vitro dormant -like buds of *Fraxinus excelsior* L. *Protoplasma* 190 pp : 16 - 24.
- PALMA B., COLONNA J.P., GESLOT A. et NEVILLE J., 1991 - Multiplication végétative in vitro d'*Acacia senegal* (L.) willd. groupe d'Etude de l'Arbre, Physiologie des arbres et d'étude de l'Arbre, *Physiologie des arbres et Arbustes en zone, arides et semi - arides* pp : 303- 309.
- PEDROTTI E.L., CORNU D., 1991 - Bud formation from roots of micropropagated *Prunus avium* L. *Plantlets acta Horticulturae*. 289 pp : 141 -142.
- PELTIER J.P., 1973 - Contribution à la flore du bassin versant de l'oued Souss (1<sup>er</sup> fascicule) *Bull. Soc. Sci. Nat.Phys. Maroc*. 53.pp : 23 - 29.
- PELTIER J.P., 1976 - La végétation du Haut Souss (de la cuvette d'Aouzioua au jbel n'Bougzoul). *Bull. inst. Sci. Rabat*. 1 pp : 119 - 145.
- PELTIER J.P., 1977 - La végétation du massif du Kardous (Anti-Atlas Occidental). *Bull. inst. Sci. Rabat*. 2 pp : 5 - 32.
- PELTIER J.P., 1982 - La végétation du bassin versant de l'Ouest Souss (Maroc), Thèse de doctorat d'Etat Es-Science, Univ. Sc. Méd. Grenoble, 201 p. + div.tab. et cart. h.t., Grenoble.
- PELTIER J.P., 1983 - Les séries de l'arganeraie steppique dans le Souss (Maroc), *Ecologia Mediterranea*, Tome IX, fasc. 1, 77-88, Univ d'Aix-Marseille, Fac. Sci. Tech. Saint-Jérôme, Marseille.
- PEYERIMHOFF, 1944 - Carte forestière de l'Algérie et de la Tunisie. Gouvernement de l'Algérie 70 p.
- PLATTERBORZE A., 1976 - Premier essai du bouturage de l'arganier à partir d'arbre adulte, *Rapport Station de Recherches forestières du Maroc*, 8 p.
- PRENDERGAST H.D.V, 1991 - Conservation à long terme des semences de l'arganier. *Argania spinosa*, in colloque international « *L'arganier recherche et perspectives* » Agadir (Maroc), pp : 11-15, Mars 1991.
- RAHMANI M., 1989 - L'huile d'argan : un produit alimentaire et diététique de qualité. Formation forestière continue, *Publ. Stat. Rech. For.*, pp : 8-25, Rabat.
- RANCILLAC M., KLINGUER A., KLINGUER S., MILLET B., 1996 - Preliminary investigations on somatic embryogenesis from leaf discs of red oak (*Quercus rubra* L.). *Plant Growth Regulation*. 20 (1) pp : 67 -73.
- RANDOJEVIC L., 1978 - in vitro induction of androgenic plantlets in *Aesculus hippocastanum*. *Protoplasma* 96 pp : 369 - 374.
- RIEUF P., 1962 - Les champignons de l'arganier, *Cah. Rech. Agri. Maroc*, 15, 8-15.
- RIVERA NUNEZ D. et RUIZ LIMINANA J.B., 1987 - *Argania spinosa* (L.) Skeels (Sapotaceae) subspontanea en la peninsula Iberica. *Anales del Jardin Botánico de Madrid*. 44

## Références bibliographiques

: 173 -173.

RUSSELL J.A., et Mc COWN B.H., 1986 - techniques for enhanced release of leaf protoplasts in *Populus*. *Plant. Cell. Report.* 5 : 284 - 287.

SAHOO Y., PATINAIK S.K., CHAND P.K., 1997 - Plant regeneration from callus cultures of *Morus indica* L. Derived from seedlings and mature plants. *Scientia horticulture.* 69 (1/2) : 85 - 98.

SANDRET F., 1957 - Etude préliminaire des glucides et du latex de la pulpe du fruit d'argan. *Bull. Soc. Chimie Biol.* 39 : 619 -631.

SINGH A.K., SURI S.S., RAMAWAT K.G., SONIE K.C., 1997 - Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Commiphora wightii*, a woody medicinal plant. *Gartenbauwissenschaft.* 62 (1) : 44 - 47.

SIRIL E.A., DHAR U., 1997 - A highly efficient in vitro regeneration methodology for mature Chinese tallow tree (*Sapium sebiferum* Roth.). *Plant cell reports.* 16 (1/2) : 82 - 87.

SKOLMEN R.G., MAPES M.O., 1976 -. *Acacia koa* Gray plantlets from somatic Cells tissue. *J. Hered.*, 67 : 114 - 115.

SLAOUI M., 1991 - Préparation et culture de protoplastes à partir de différents types de matériel chez le chêne pédonculé (*Quercus robur* L.) : Feuilles de semis -feuilles et cal de vitroplants . Comparaison de deux clones d'âge et de provenance différentes.Thèse. Doct. Nancy I. 220 P.

SMITH J., 1882 - A dictionary of popular names of the plants which furnish the naturel and acquired wants of Man. In all matters of domestic and general economy. Ed. Macmillan & Co (London). 24 p.

STREETS R.J., 1962 - Exotic forest trees in the British cammonwealth. Ed Champion. *Clarendon Press Oxford.* 187 P.

TAPATI DAS A., 1996 - Micropropagation of *Salmaalma malabrica* (DC) Scott & Endl. *Indian journal of experimental Biology.* 34 (12) :1283 - 1286.

TOMAR U.K., GUPTA S. C., 1988 - In vitro plant regeneration of leguminous trees (*Albizia ssp*). *Plant Cell Reports.* 7 (6) 385- 388.

TREGUBOV V.,1963 - Etude des groupements végétaux du Maroc oriental méditerranéen, *Bull. Mus. Hist. Nat., Marseille, Tome XXIII, 121-194, Imp. Municipale, Marseille.*

TROUP R.S.,1932 - Exotic forest trees in the British Empire. *Clarendon Press Oxford.*

VIDALI H. 1984 - La culture in vitro et des applications horticoles. *Technique et Documentation (Lavoisier)* 143 p.

VIEITEZ A.M, et VIEITEZ E., 1980 - Plantlet formation from embryonic tissue of chestnut grown in vitro. *Physiol. Plant.* 50: 127 - 130.

VIEITEZ E., VIEITEZ A.M et BROWN A., 1981 -vegetative propagation of chestnut. *For.Sci.* 4 : 241 - 411.

## Références bibliographiques

---

WOODS A., 1985 - The potential for the in vitro propagation of a number of economically important plants for the arid areas, In « Plants for arid land »- Proc. Kew int. conf. economic plants for the arid land. Royal Botanic Gardens, Kew. 23 - 27 July 1984. Wicken *et al.*, Ed.. 333 - 342.

ZAHIDI A et BANI - AAMEUR F., 1998 - Argan seedling damping-off under nursery conditions : effects of mother-tree genotype, Kernel origin and seedling age. *Ecologia mediterranea*. 24 (1), 27 - 32.

ZITAN A., 1989 - Eléments de réflexion sur l'agroforesterie au Maroc. In : *la forêt marocaine, droit, économie, écologie, Actes des journées d'étude SOMADE*. 15 -16 Avril 1988, Casablanca, Afrique Orient, Editeur. 49 -75.

ZRYD J.P., 1988 - Culture de cellules et organes végétaux. Fondement théorique et utilisations pratiques. Ed. Presses polytechniques Romandes. Suisse. 308 P.



## **Annexe I : Milieux de culture**

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

MS : Murashige et Skoog (1962).

MS<sub>s</sub> : Milieu de MS modifié par Slaoui (1990).

MS<sub>2</sub> : Milieu de MS modifié par nous même.

Composition	MS	MS <sub>s</sub>	MS <sub>2</sub>	KNOP
<b>Macro-éléments (mg/l)</b>				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	412.5	412.5	
KNO <sub>3</sub>	1900	950	950	250
Mg SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	370	185	185	250
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	440	220	220	500
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	85	85	250
<b>Micro-éléments (mg/l)</b>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	6.2	6.2	
MnSO <sub>4</sub> , 4 H <sub>2</sub> O	22.3	22.3	22.3	
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	8.6	8.6	8.6	
KI	0.83	0.83	0.83	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	
Ca Cl <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	0.025	0.025	0.025	
<b>Vitamines (mg/l)</b>	<b>MS</b>	<b>GRESSHO FF et DOY</b>	<b>MS</b>	
Inositol	-		-	
Acide nicotinique	0.5		0.5	
Pyridoxine HCl	0.5		0.5	
Thiamine	0.1		0.1	
Biotine	-		-	
D. Ca. Panthothénate	-		-	
Riboflavine	-		-	
Acide ascorbique	-		-	
Chlorure de choline	-		-	
Cystéine chlorhydrate	-		-	
Glyséine	2		2	
<b>Complément en Azote (µM)</b>				
Asparagine	/	33.3	33.3	
Glycine	/	26.6	26.6	
Glutamine	/	34	34	
<b>Fe EDTA</b>				
Na EDTA	37.25	37.25	37.25	
Fe SO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	27.85	27.85	27.85	
Saccharose (g/l)	20	20	20	
Agar (g/l)	7	7	7	
pH	5.6 - 5.7	5.6 - 5.7	5.6 - 5.7	

## **Annexe II : Glossaire**

- **AIA** : Acide indolacétique (auxine) (PM : 175.2).
- **AIB** : Acide indolbutyrique (auxine) (PM : 203.4).
- **ANA** : Acide naphthalacétique (auxine) (PM : 186.2).
- **Cal** : est le tissu de néoformation produit par l'explant initial
- **Callogenèse** : néoformation d'un cal.
- **Caulogenèse** : genèse d'axes caulinaires.
- **Dédifférentiation cellulaire**: retour progressif de cellules différenciées vers l'état méristématique.
- **Différentiation cellulaire**: perte progressive de caractères cytologiques et physiologiques des cellules embryonnaires et acquisition des caractéristiques des cellules adultes, éventuellement liée à la spécialisation.
- **Explant** : fragment d'organe végétal excisé et mis en culture *in vitro*.
- **Kinétine** : 6 - furfurylaminopurine (cytokinine).
- **Néoformation** : formation des structures nouvelles : tissus, méristèmes, embryoïds. La néoformation est l'aboutissement d'une dédifférentiation puis différenciation.
- **Organogène** : qui produit des organes ou est capable d'en former.
- **Organogenèse** : formation des organes. L'organogenèse végétative se situe essentiellement au niveau des méristèmes.
- **Rhizogenèse** : formation de racines.
- **Vitrification** : trouble physiologique fréquemment rencontré chez les plants cultivés *in vitro*, les feuilles des plantes vitrifiées sont larges, épaisses, translucides, ridées et/ou bouclées et facilement cassables. La translucidité et les malformations sont apparemment dues à une déficience chlorophyllienne et à l'hyperhydratation générale des cellules (turgescence).
- **Vitrosemis** : des semis obtenus *in vitro*.
- **Zéatine** : 6-4-hydroxy-3-méthyl-2-énylaminolpurine (cytokinine) (PM : 219.3).

## Résumé

Il est question dans le présent travail, de mettre au point, pour l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels), une méthode de micropropagation capable de produire des vitroplants directement utilisables. Parmi les travaux existant sur l'arganier, on ne dispose d'aucun article qui traite cet aspect. Pour cela le passage par la culture du matériel végétal juvénile demeure incontournable.

En effet, l'utilisation directe d'embryons sur un milieu de culture KNOP (1865), se traduit par une entrée rapide en germination, ce qui permet d'avoir des vitrosemis groupées et homogènes directement utilisables en multiplication.

Concernant la phase de multiplication, plusieurs paramètres ont été étudiés (Milieux de culture, hormones de croissance et les méthodes de multiplication) ainsi, la nouvelle technique de multiplication par Hyper-ramification permet :

- D'obtenir directement des pousses allongées utilisables pour le cycle suivant.
- D'éviter le problème de callogenèse à la base des explants.
- De maintenir un stock permanent en microboutures.

Le milieu de culture MS<sub>2</sub> additionné de l'AIB (1 mg/l) et du charbon actif (1 g/l) s'est révélé très favorable pour l'enracinement des vitroplants d'arganier (88 %). Les vitroplants acclimatés ne posent aucun problème, les vitroplant d'arganier présentent de bonnes aptitudes à l'acclimatation (90 % de réussite).

**Mots clés :** *Argania spinosa* (L.) Skeels, L'arganier, micropropagation, vitroplants, Embryons, vitrosemis, Hyper-ramification, Enracinement, Acclimatation.

## Summary

It is question in the present work, to develop a micropropagation methods of argan tree, (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Among existing researchs on argan tree, no work has been published on such an aspect, for this purpose, the culture of the juvenile organ is necessary.

Indeed, use of direct embryos on a KNOP (1865) growing medium, give a rapid germination, what allows the obtention the grouped and homogeneous vitroseedling directly usable in multiplication.

Concerning the phase of multiplication, several parameters have been studied (growing medium, growth regulator and multiplication technics) thus, the new technique of multiplication by High - ramification allows :

- To obtain directly of lengthened shoots for the cycle following.
- To avoid the callogenesis problems.
- To maintain a permanent stock of micrografts

The growing medium MS<sub>2</sub>, supplied by 1 mg/l AIB and 1 mg/l of chaoal actif, seemed to be optimum vitroplants rhizogenesis. The argan tree plants, present good aptitudes to acclimatation (90 % of success).

**Key words :** *Argania spinosa*, argan tree, micropropagation, vitroplants, Embryos, vitroseedlings, High-ramification, rhizogenesis, Acclimatation.

## المادة:

إن السؤال المطروح في العمل الراهن، هو كيفية وضع طريقة للتكاثر الدقيق (المجمري) لشجر البربر (*Argania spinosa* (L.) Skeels) تسمح بإنتاج فسائل قابلة للإستعمال المباشر.

من بين الأبحاث التي تتناول شجر البربر، لم نجد أي مقال يتناول هذه الحالة، من أجل ذلك فالقيام بزراعة فسائل وتربية تصبح وسيلة لا مناص منها.

في واقع الأمر فالإستعمال المباشر للأجنة في الوسط الزراعي (KNOP) (1865)، يتخرج بالدخول السريع في الإنتاش، مما يسمح بالحصول على فسائل متجمعة ومتجانسة للإستعمال المباشر في التكاثر.

فيما يخص مرحلة التكاثر، عدة ثوابت درست (وسط الزرع، هرمونات النمو و طرق التكاثر) كذلك دراسة طريقة جديدة للتكاثر والجسامة بطريقة التفريع (التشعب) المفروط والتي تسمح:

- بالحصول المباشر على نمو متطاوول للنباتات قابلة للإستعمال في الدورة التالية.

- بتجنب مشكلة تكون الكلب في قاعدة الفسائل.

- بالحفاظ على مخزون دائم من الفسول الدقيقة (الصغيرة).

إن وسط الزرع MS<sub>2</sub> المرتبط ب AIB (1 مغ / ل) والقحم النشيط (الفعال) (1 غ / ل) كشف بأنه مناسب (لائق) لتجذير فسائل شجرة البربر (88%) وذلك أبزوت (قدمت) فسائل شجرة البربر قابليتها للتأقلم (90% من نسبة النجاح).

الكلمات الجوهرية:

*Argania Spinosa* (L.) Skeels، شجرة البربر، التكاثر الدقيق (المجمري)، الفسائل، الأجنة، الزرع في وسط مصطنع،

التفريع (التشعب) المفروط، التجذير، التأقلم.